



ISSN 1674-6929

CN 44-1656/R

邮发代号: 46-283

分子诊断与治疗杂志

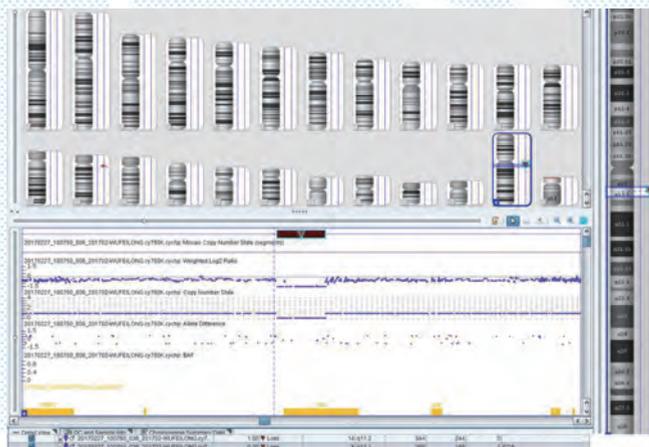
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年7月 第12卷 第7期 总第71期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 7 July 2020



注: CMA 检测结果提示先证者 X 染色体存在约 267 kb 片段缺失 (chrX: 68,801,113-69,068,115), 黑色带三角的矩形条代表缺失区域, 对应的 SNP 探针信号缺失。

图(P854) 先证者染色体微阵列检测结果

Figure(P854) Chromosomal Microarray Analysis result of the proband

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



分子诊断与治疗杂志

二〇二〇年七月

第十二卷 第七期

中山大学

冯磊



冯磊,1974年10月出生,1998年毕业于湖南医科大学医学检验系,获学士学位,2004年毕业于中南大学湘雅医学院,获免疫学硕士学位;2016年毕业于南方医科大学,获临床检验诊断学博士学位。2009至2010年国家公派赴加拿大访问留学1年。

主任技师,现任云南省玉溪市人民医院(昆明医科大学第六附属医院)检验医学科主任。昆明医科大学博士研究生导师,云南省中青年学术和技术带头人后备人才,云南省卫生高层次技术人才,玉溪市中青年学科技术带头人。中华医学会检验分会第十届委员会临床生物化学学组委员,中国中西医结合学会检验医学专业委员会委员分子诊断专家委员会委员,中国医学装备协会检验医学分会第二届委员,世界华人医师协会检验与病理医师协会康复医学检验专家委员会委员,

世界华人医师协会检验病理医师协会会员,中国分析测试协会标记免疫分析专业委员会第一届委员会委员,第一届全国卫生产业企业管理协会实验医学专家委员会青年委员会委员,云南省医师协会第二届检验医师分会副主任委员,云南省免疫学会临床免疫学分会副主任委员,云南省中西医结合学会检验医学专业委员会常务委员,云南省医学会检验分会第八届委员会委员,云南省免疫学会第五届理事会理事,云南省医学会医学细胞生物学分会第二届委员会委员,云南省医院协会临床检验管理第二届专业委员会委员,云南省医学会医学遗传学分会第六届委员会委员,《分子诊断与治疗杂志》第五届编辑委员会编辑委员,玉溪市医学会医学检验专业委员会主任委员。

冯磊主任技师从事临床检验及相关科研工作二十余年,主要研究方向为心血管疾病的实验室诊断及风险评估。承担及完成国家、省部级课题20余项,其中包括国家自然科学基金项目、云南省科技厅应用基础研究项目、云南省科技厅—昆明医科大学应用基础研究联合专项等。荣获云南省政府科技进步三等奖1项、玉溪市政府科技进步一等奖、二等奖、三等奖多项。发表论文90余篇,第一作者或通信作者发表80余篇,SCI收录12篇。目前招收昆明医科大学硕士研究生13名,与南方医科大学联合培养同等学力研究生3名。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020 年 7 月 第 12 卷 第 7 期 总第 71 期 Bimonthly Volume 12 Number 7 July 2020

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

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

地址 广州市天河区天河北路 179 号祥龙大厦 11 楼 (510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2020 年 7 月 18 日
定价 RMB 15.00 元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2020.7.18
Price RMB 15.00



扫码订购《分子诊断与治疗杂志》



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

分子诊断与治疗杂志

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

特颁发此证书。

中国科学院技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2019年11月



分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年7月 第12卷 第7期

目次

述评

冠心病风险评估模型构建的进展 吴孟娜 年士艳 叶丹 等(839)

COVID-19 专栏

新型冠状病毒数字 PCR 检测方法建立 李彤 荆福祥 李宏志 等(843)

新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的性能验证 何吕芬 李沙 利振坤 等(848)

论著

EDA 基因外显子缺失所致外胚层发育不良家系的基因型研究及产前诊断
..... 丁红珂 余丽华 曾玉坤 等(852)

子宫颈癌血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达与病理特征及预后的相关性分析
..... 肖虹 潘晓蕾 赵颖颖 等(856)

不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征
..... 彭亚柏 朱秀云 刘赛云 等(861)

下调 lncRNA HCG18 靶向调控 miR-34a 影响口腔鳞癌 SCC4 细胞增殖、侵袭以及迁移的分子机制
..... 丁延晶 王立新 邱静怡 等(864)

心外科 ICU 患者术后感染血清降钙素原、PSGL-1、sICAM-1 与心肌钙蛋白 I 的变化及意义
..... 赵俊娅 王珂 乔博 等(869)

外周血与骨髓组织髓系来源抑制细胞在多发性骨髓瘤患者诊断中的价值比较
..... 张睿婷 方霁 周雅莹 等(874)

体液免疫功能、血清 sIL-6R 水平和血沉的检测在儿童 CA-MPP 病情变化和疗效评估中的应用
..... 陈建州 吴云刚 张辉(878)

宫颈癌患者血清 E-cad、IFN- γ 、TGF- β 表达意义及对预后的影响
..... 李晓茵 吴雪薇 卢智健 等(882)

LASP1、GSTA3 在鼻咽癌组织中的表达及与复发、转移的关系
..... 杜伟一 陈淑莲 李国强(887)

let-7d-5p 调控 HPV16 阳性宫颈癌细胞侵袭、迁移及凋亡的分子机制
..... 张鹏飞 周保成 周哲 等(892)

RNAi 下调 CCT8 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞转移潜能 朱迎伟 褚旭 邱家勇 等(897)

血清 TK1、VEGF 和 AFP 检测对原发性肝癌诊断及预后评估的价值
..... 胡燕红 顾艳红 王新梅(901)

血清和肽素水平与 PCOS 患者糖代谢相关指标水平的关系研究 张先锋 肖丹 郭佳(905)

GnRH- α 联合 LNG-IUS 对子宫内膜异位症术后患者血清 ENA-78 及 MCP-1 水平的影响
..... 马雪莲 李海燕(910)

miR-155-5p 靶向 *FNDC3B* 基因通过 NF- κ B 信号通路调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡
..... 谢进 舒莉莉 苏虔 等(914)

胃癌患者 TNS1 蛋白、PDK-1 蛋白阳性表达意义及与临床病理特征、预后的相关性
..... 李伟伟 杨庆辉 蔡卫梅(919)

IL-8、IL-6、hs-CRP 在缺血性脑血管病手术前后表达变化及临床价值
..... 任英巧 李占增 伍淑玲 等(923)

大脑后动脉瘤破裂危险多因素及其治疗结果分析 陈解南 周新卫 彭冬红 等(928)

EMT 不孕患者血清 AcrAb、Sp17Ab 水平 唐媛 刘小娟 刘秀丽 等(932)

血清 PTX-3、CTRP9、MIF 水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系
..... 袁大华 杜朴 王玉凯(935)

Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值研究 韩玉华 周俐红 李艳丽(940)

TCT、HR-HPV 配合阴道镜下宫颈活检在宫颈癌临床诊断中的价值 杨东斌(944)

冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后 Hcy、FIB 和 CRP 的变化 戴艺 刘丽 欧燕 等(948)

RDW、DD 联合抗 CCP 抗体检测对 RA 诊断及病情活动的价值分析 杨波 徐磊 贾伟 等(952)

血清 E2、PINP 水平对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值
..... 方兵 程翰林 虞红林 等(956)

体外诊断试剂创新产品临床试验对比方法选择及案例解析 徐超 方丽 李冉(960)

PCT、CRP 在肺炎支原体肺炎患儿中的表达及与 MP-IgM 抗体的关系
..... 纵雪峰 种丽芳 刘道路 等(964)

miR-142-5p 对癫痫发作后神经元损伤的作用机制 赵利 李海燕(968)

综 述

非编码 RNA 在类风湿关节炎中的研究进展 陈宇婷 李琼 隋础阳 等(974)

生长因子在肺动脉高压发病中的作用研究进展 李凯泽 刘广雁 陈建英(978)

基于高通量测序的伴随诊断试剂临床评价方法及运用 高宇 吕允凤(982)

专家风采

冯磊 (封二)

实验室巡礼

玉溪市人民医院检验医学科 (封三)

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 7 July 2020

CONTENTS

COMMENTS

Progress in the construction of a coronary heart disease risk assessment model

WU Mengna, NIAN Shiyan, YE Dan, ZHANG Chunting, FENG Lei (839)

COVID-19 Column

Development of a digital PCR for the detection of SARS-CoV-2

LI Tong, JING Fuxiang, LI Hongzhi, XIN Xiaoxing, ZHAO Jinyin, CHENG Di, QU Shoufang, LIU Qi (843)

Performance verification of a real-time fluorescent RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2

HE Lufen, LI Sha, LI Zhenkun, LI Huan, WANG Licheng, FU Xiaoying, LI Yuanli, CHEN Hai,

CHEN Shaojin, ZHU Xiong (848)

ORIGINAL ARTICLES

Genotyping of a hypohidrotic ectodermal dysplasia family caused by *EDA* gene exon deletion and prenatal diagnosis

DING Hongke, YU Lihua, ZENG Yukun, LIU Ling, YIN Aihua, LU Jian, ZHANG Yan, LAN Feifei (852)

Correlation Analysis of Serum HPV-E7, CD105 and YKL-40 Levels with Pathological Features and Prognosis in Cervical Cancer

XIAO Hong, PAN Xiaolei, ZHAO Liying, XIE Miao (856)

Virological characteristics of overlapping HBV or HIV infection in patients with different genotype HCV infection

PENG Yabai, ZHU Xiuyun, LIU Saiyun, WANG Min, LONG Shoubin, CHENG Wenbing, CAI Kanru, LIU Jiaye (861)

Molecular mechanism of down-regulation of lncRNA HCG18 targeting miR-34a on proliferation, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma SCC4 cells

DING Yanjing, WANG Lixin, QIU Jingyi, YU Riyue (864)

Changes and significance of serum procalcitonin, PSGL-1, sICAM-1 and cardiac troponin I levels in patients with ICU after cardiac surgery

ZHAO Junya, WANG Ke, QIAO Bo, ZHANG Yang (869)

Comparison of the value of myeloid-derived suppressor cells from peripheral blood and bone marrow in the diagnosis of multiple myeloma

ZHANG Ruiting, FANG Ji, ZHOU Yaying, ZHOU Jihao, LIU Yingda (874)

Application of humoral immune function, serum sIL-6R level and erythrocyte sedimentation rate in the evaluation of changes in CA-MPP condition and curative effect in children

CHEN Jianzhou, WU Yungang, ZHANG Hui (878)

The significance of serum E-cad, IFN- γ , TGF- β levels in patients with cervical cancer and its influence on prognosis

LI Xiaoyin, WU Xuewei, LU Zhijian, ZENG Daidi, CHEN Yanya (882)

Analysis of the expression of LASP1 and GSTA3 in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with recurrence and metastasis

DU Weiyi, CHEN Shulian, LI Guoqiang (887)

Molecular mechanism of let-7d-5p regulating invasion, migration and apoptosis in HPV16-positive cervical cancer cells

ZHANG Pengfei, ZHOU Baocheng, ZHOU Zhe, ZHU Meiling, QI Yaozhi (892)

RNAi down-regulates CCT8 to inhibit the metastatic potential of non-small cell lung cancer A549 cells

ZHU Yingwei, CHU Xu, QIU Jiayong, SUN Yuxia, MAO Yimin (897)

The value of serum TK1, VEGF and AFP in diagnosis and prognosis evaluation of primary hepatocellular carcinoma <i>HU Yanhong, GU Yanhong, WANG Xinmei</i>	(901)
Study on relationship between serum Copeptin level and levels of glucose metabolism-related indicators in patients with PCOS <i>ZHANG Xianfeng, XIAO Dan, GUO Jia</i>	(905)
The effect of co-treatment with GnRH- α and LNG-IUS on serum ENA-78 and MCP-1 levels in post-operative patients with endometriosis <i>MA Xuelian, LI Haiyan</i>	(910)
miR-155-5p targeting <i>FNDC3B</i> gene regulates osteoarthritis chondrocyte proliferation and apoptosis through NF- κ B signaling pathway <i>XIE Jin, SHU Lili, SU Qian, XIAO Xiong</i>	(914)
Significance of TNS1 and PDK-1 protein expression in gastric cancer patients and their correlation with clinicopathological features and prognosis <i>LI Weiwei, YANG Qinghui, CAI Weimei</i>	(919)
The expression changes and clinical value of IL-8, IL-6 and hs-CRP before and after operation of ischemic cerebrovascular disease <i>REN Yingqiao, LI Zhanzeng, WU Shuling, LU Yanhui</i>	(923)
Posterior Cerebral Artery Aneurysms rupture risk factor and treatment Outcome <i>CHEN Jienan, ZHOU Xinwei, PENG Donghong, HUANG Zhongqing</i>	(928)
Serum AcrAb and Sp17Ab levels in patients with EMT infertility and their significance <i>TANG Yuan, LIU Xiaojuan, LIU Xiuli, LIU Fang, MA Yue, XIE Jia, LI Xin</i>	(932)
Relationship between serum PTX-3, CTRP9, MIF levels and neurological function and short-term prognosis in patients with ischemic stroke <i>YUAN Dahua, DU Pu, WANG Yukai</i>	(935)
Study on the predictive value of Lp-PLA2, Hcy and S100 β on vascular dementia after ischemic stroke <i>HAN Yuhua, ZHOU Lihong, LI Yanli</i>	(940)
Clinical diagnostic value of TCT, HR-HPV and colposcopy cervical biopsy in cervical cancer <i>YANG Dongbin</i>	(944)
Changes of Hcy, FIB and CRP in patients with coronary heart disease and angina pectoris treated with Guanxinshutong capsules and their correlation <i>DAI Yi, LIU Li, OU Yan, ZHOU Liguo</i>	(948)
Analysis on the value of RDW and DD combined with of anti-CCP antibodies in the diagnosis of RA and in the evaluation of disease activity <i>YANG Bo, XU Lei, JIA Wei, WANG Shuang</i>	(952)
The predictive value of serum E2 and P1NP levels in the risk of osteoporotic lumbar fractures in postmenopausal women <i>FANG Bing, CHENG Hanlin, YU Honglin, CHENG Jie, CAO Jing, LI Yaozheng, HONG Yu</i>	(956)
In vitro diagnostic reagent innovative product clinical trial comparison method selection and case analysis <i>XU Chao, FANG Li, LI Ran</i>	(960)
Expression of procalcitonin and C-reactive protein in children with <i>Mycoplasma pneumoniae</i> pneumonia and its relationship with MP-IgM antibody <i>ZONG Xuefeng, ZHONG Lifang, LIU Daolu, ZHOU Guirong</i>	(964)
Mechanism of miR-142-5p on neuronal damage after epilepsy <i>ZHAO Li, LI Haiyan</i>	(968)

REVIEWS

Research Progress of Non-coding RNA in Rheumatoid Arthritis <i>CHEN Yuting, LI Qiong, SUI Chuyang, JIE Ligang, WU Jing, DU Hongyan</i>	(974)
Recent progress in the research of growth factors in the pathogenesis of pulmonary hypertension <i>LI Kaize, LIU Guangyan, CHEN Jianying</i>	(978)
Clinical evaluation methods and using of companion diagnostic reagents based on next-generation sequencing <i>GAO Yu, LV Yunfeng</i>	(982)

冠心病风险评估模型构建的进展

吴孟娜¹ 年士艳² 叶丹¹ 张春婷¹ 冯磊^{1*}

[摘要] 冠心病(CHD)是一种复杂的多因素疾病,正确识别CHD相关的危险因素、构建CHD风险预测模型是预防和控制心血管病的必要前提。目前国内外已有诸多CHD风险预测模型,但仍存在局限性从而影响了模型的临床适用性。近年来提出了联合危险因素与易感基因构建CHD风险评估模型的新策略,但其对于评估效能的提升作用仍存在争议。本文简要概述国内外CHD风险评估模型研究进展,分析风险评估模型存在的局限性,探讨新危险因素联合易感基因的新策略对CHD评估效能的提升作用。

[关键词] 冠心病;风险评估模型;危险因素;易感基因

Progress in the construction of a coronary heart disease risk assessment model

WU Mengna¹, NIAN Shiyan², YE Dan¹, ZHANG Chunting¹, FENG Lei^{1*}

(1. Department of Laboratory, The Sixth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yuxi, Yunnan, China, 653100; 2. Intensive Care Unit, The Sixth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yuxi, Yunnan, China, 653100)

[ABSTRACT] Coronary heart disease (CHD) is a complex multifactorial disease. It is necessary to correctly identify the risk factors associated with CHD and construct a CHD risk prediction model for the prevention and control of cardiovascular diseases. Although many CHD risk prediction models have been reported, limitations that affect the clinical applicability of the models remain. Recently, a new strategy of combining risk factors and susceptibility genes to construct a CHD risk assessment model has been proposed, but its role in improving the effectiveness of assessment remains controversial. This article summarizes the progress of research in CHD risk assessment models, analyzes the limitations of risk assessment models, and explores the new strategies of combining new risk factors with susceptibility genes to improve the effectiveness of CHD assessment.

[KEY WORDS] Coronary heart disease; Risk assessment model; Risk factor; Susceptibility gene

心血管病死亡已成为城乡居民死亡的首要原因,并向低龄和低收入群体快速蔓延,所带来的医疗费用增长远高于国内生产总值增速,故加强政府主导下的疾病防治已刻不容缓^[1]。动脉粥样硬化性心血管病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)是一种以动脉粥样硬化为基础病理机制,主要包括冠心病(Coronary heart disease, CHD)、卒

中和周围血管病的公共卫生疾病。正确识别心血管病发病相关的危险因素、进行风险评估及危险分层对心血管病的防治有重要作用。

近年来,全基因组关联研究及大规模病例对照研究发现了众多与CHD易感性相关的重要基因,主要从影响脂质代谢、血栓形成、血管舒张及收缩、与炎症反应相关等方面影响CHD的发生发

基金项目:国家自然科学基金(81460326),云南省科技厅—昆明医科大学应用基础研究联合专项[2018FE001(-081)],云南省教育厅科学研究基金(2020Y0140)

作者单位:1. 昆明医科大学第六附属医院检验医学科,云南,玉溪 653100

2. 昆明医科大学第六附属医院重症医学科,云南,玉溪 653100

*通信作者:冯磊, E-mail: fngj2004@163.com

展^[2-3]。为提升预测模型的评估效能,有研究提出联合危险因素与易感基因构建CHD风险评估模型的新策略^[4],但其评估效能仍存在争议。本文欲分析国内外心血管疾病风险评估模型,探讨其存在的局限性以及危险因素联合易感基因的新策略对模型评估效能的提升作用。

1 心血管疾病风险评估模型

1948年美国首先启动了Framingham心脏研究,经多年监测和随访识别出CHD、中风和其他心脑血管疾病的主要危险因素,构建了心脑血管疾病的风险评估模型^[5],为心血管疾病的一级预防提

供了理论依据。由于Framingham心脏研究的预测模型存在较强的地域及人群特异性^[6],主要适用于大部分的美国成年人,各国积极探索适合本国人群的心血管风险评估模型,目前主要风险评估模型如表1所示。

2 目前CHD风险评估模型存在的问题

国内外研究已构建诸多CHD风险评估模型,但这些模型的临床适用性仍存在问题,主要表现为以下几方面。

2.1 模型中纳入的危险因素不足

国内外学者构建的诸多CHD风险评估模型中

表1 心血管疾病风险评估模型比较

Table 1 Comparison of cardiovascular disease risk assessment models

评估模型	开发时间	研究人群	纳入危险因素	事件终点	特点
Framingham 冠心病风险评估 ^[5]	1998	欧洲裔美国人,无CHD男性2 489名,女性2 856名,年龄30~74岁,随访12年	年龄、性别、TC、LDL-C、HDL-C、血压、糖尿病、吸烟	心绞痛、MI、冠状动脉功能不全、冠心病死亡	具有里程碑意义,应用范围广
NCEP ATP III 模型 ^[7]	2001	欧洲裔美国人,无CHD男性2 489名,女性2 856名,年龄30~74岁,随访12年	年龄、血压、吸烟、LDL-C、HDL-C、家族史	MI、CHD 致命事件	由全球最有影响力的血脂干预指南提出
SCORE 计划 ^[8]	2003	欧洲 12 个国家人群,无CHD男性88 080名,女性117 098名,随访270万人/年	年龄、性别、TC、HDL-C、血压、吸烟	致命心血管疾病	分地区建模,考虑了环境因素
QRISK 评分 ^[9]	2007	英国人,无DM和CVD的128万例患者,男性636 753名,女性646 421名,年龄35~74岁	年龄、性别、吸烟、血压、TC/HDL-C、BMI、家族史、社会经济指标、药物治疗	MI 心肌梗死、CHD、中风和短暂性缺血发作	纳入研究人群规模大,对评分系统进行多版更新
Reynolds 风险积分系统 ^[10]	2007	欧洲裔美国人,无DM和CVD男性10 724名,女性24 558名,随访10年	年龄、血压、吸烟、家族史、TC、HDL-C、hs-CRP	MI、缺血性卒中、冠状动脉血运重建、CVD死亡	分性别构建,且纳入hs-CRP、HbA1c作为危险因素
汇总队列方程 ^[11]	2013	非西班牙裔美国黑人、白人,男性10 745名,女性13 881名,年龄40~79岁,随访>12年	性别、年龄、种族、TC、HDL-C、血压、DM、吸烟、降压治疗	致死性及非致死性心血管疾病及脑卒中	按种族和性别分类的预测方法
China-PAR 风险预测模型 ^[12]	2016	中国人,男性10 334名,女性10 986名,年龄35~74岁,随访12.3年	年龄、血压、降压治疗、TC、HDL-C、吸烟、DM、腰围、地域、家族史	MI、CHD死亡以及致死性和非致死性脑卒	结合考虑中国实际情况和疾病谱特点
China-PAR 终生风险评估模型 ^[13]	2018	来自ChinaMUCA(1992-1994)、ChinaMUCA(1998)、ASIA、CIMIC四个队列的12万中国人	年龄、血压、降压治疗、TC、HDL-C、吸烟、DM、腰围、地域、家族史	非致死性MI、CHD死亡以及致死性和非致死性脑卒	针对20~59岁10年中、低危风险人群进行终生风险评估

注:CHD:冠心病;TC:总胆固醇;LDL-C:低密度脂蛋白胆固醇;HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇;MI:心肌梗死;DM:糖尿病;BMI:体质指数;hs-CRP:超敏C反应蛋白;HbA1C:糖化血红蛋白;ChinaMUCA:中国心血管病流行病学多中心协作研究;InterASIA:中国心血管健康多中心合作研究;CIMIC:中国代谢综合征社区干预研究暨中国家庭健康研究

所纳入的危险因素不尽相同。除传统危险因素(年龄、性别、吸烟、血压、糖尿病等),近年国内外学者就CHD危险因子的研究中陆续提出了一些新危险因素,如总胆红素(total bilirubin, TBIL)、同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)等。但新危险因素以及部分传统危险因素如大多数血脂类指标并未得到风险评估模型的普遍认可和采纳。

究其原因,除检测方法不统一和不够严谨的统计分析外,人为干预导致该类指标无法代表疾病发生与发展的初始状态等问题也是导致其临床作用未被认可的原因之一,故需选择能反映ASCVD发生与发展、且目前常规临床干预手段影响较少的指标。同时CHD是一种复杂的多因素疾病,将多个与ASCVD相关的危险因素进行整合后纳入心血管疾病风险评估模型中可提高传统风险评估模型的诊断效能^[14]。检测指标间相关性可能影响结果的准确性,可考虑将存在相关性的指标组合为综合指数,如:TC/(HDL-C+TBIL)比值及LDL-C/(HDL-C+TBIL)等^[15]。

2.2 模型缺乏年龄分层

年龄已被众多评估模型广泛纳入,有必要依据年龄分层构建评估模型。有研究发现,年龄与很多指标存在较强相关性,如糖化血红蛋白^[16],统计分析时产生的混杂因素可能影响结果准确性。且由于ASCVD随年龄增长患病率本身就会升高,研究时需保证病例组和对照组年龄匹配。此外,ASCVD发病已呈年轻化趋势,对早发或青年型ASCVD研究发现,不同年龄段危险因素构成存在差异^[17]。有研究进行了ASCVD传统公认血脂类危险因素在人群中随年龄变化的大数据分析^[18],研究结果发现随着年龄增长,经典血脂指标在男女性水平间关系以及与疾病相关性方面发生改变。

2.3 缺乏个体化的CHD风险评估模型

国际上推出的风险评估模型存在较强的地域及人群特异性^[6]。我国现已有顾东风团队开发了China-PAR十年风险及终生风险评估模型。而我国属于统一的多民族国家,不同民族间可能由于遗传背景、饮食及生活习惯等因素导致风险评估模型存在民族差异性。

近年来提出“精准医疗”旨在为人们提供更精准、高效、安全的预防、诊断及治疗措施,针对基因多态性与CHD发生发展之间的关系是当今国内外学者的一个研究热点。有研究发现,基因易感性与风险评估数学模型间存在一定关联性,将基

因易感性因素与传统危险因素进行有机结合,可能会完善和提高对CHD风险评估的效能^[4]。

3 新危险因素联合易感基因构建CHD风险模型新策略

3.1 CHD危险因素分类

与ASCVD发生、发展相关的危险因素主要可分为以下四大类:①经典不可改变危险因素:年龄、性别、家族史、种族差异等。②经典可改变危险因素:血压、血脂异常、糖尿病、肥胖等。③行为危险因素:吸烟、多食少运动等。④新危险因素:血栓形成相关危险因素^[19],如:D-二聚体;炎症相关危险因素^[20],如:超敏C反应蛋白;促血管平滑肌增生指标^[14],如:HCY;氧化应激类危险因素^[21],如TBIL、 γ -GT;基因易感性指标^[22-24]等。

3.2 CHD发病相关易感基因

现已有研究发现与CHD发生发展相关的基因或基因位点,通过单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测,可进行个体基因风险评估,进而预测CHD风险^[24]。但目前有关CHD发病相关易感基因的研究结果间仍存在争议,可能有以下原因导致结果间存在差异:①种族差异。由于种族间人群所携带的遗传基因存在差异,已有相关文献提出特定基因位点多态性与CHD发病之间的相关性存在种族差异^[25]。②表型差异。在众多CHD相关易感基因中,不同的基因突变可能影响所诱发CHD的临床表型,如性别间差异、发病年龄、疾病严重程度及发展特征等。因此在CHD相关易感基因研究中可将研究对象依据表型分组进行分析。③局限于单个SNP分析。由于单个基因效应微弱且遗传研究中存在基因调控的现象,孤立地研究单个基因及其表达往往无法确切地反应疾病发生发展相关的内在机制,因此有必要对多个基因的SNPs同时进行分析。

3.3 危险因素联合易感基因构建CHD风险模型

从遗传学理论上推测某些易感基因与临床生理、生化指标间可能存在一定关联性,两者在疾病发生与发展中可能存在协同或抑制机制。已有研究将构建的CHD发病风险评估模型^[18]与两个新发现的基因易感性因子^[22-23]进行了联合分析,结果发现易感基因型别与数学模型间确实存在一定关联性^[4],传统危险因素与易感基因联合可能会促进风险模型评估效能的进一步提升。

目前大规模的基因筛查确定了众多与复杂疾病风险相关的基因位点,而单个基因效应微弱且基因间存在调控现象,应当考虑多个DNA变异对发病风险的累积影响。近年有研究计算多基因风险评分(Polygenic risk score, PRS)用于评估个体发病风险^[24],Mars等^[26]评估了PRS对CHD的临床风险评估附加价值,研究结果显示PRS能提高净重新分类改善指数。然而JAMA近期发表的两项研究^[24, 27]提出,传统危险因素仍然是预测CHD发病风险的有力工具,将PRS添加到传统风险评估模型中并未明显提高一般中年白种人群的风险评估效能。由于以上研究均是在白种人群中进行,种族差异性可能导致结果间存在差异,还需在中国人群中进一步验证。

尽管目前各国学者均积极进行全基因组关联研究以明确CHD相关易感基因,但相比单独传统风险评估模型,危险因子联合易感基因构建CHD风险模型的评估效能仍存在争议,未来还需大样本病例对照研究及前瞻性研究的进一步探索。

4 小结与展望

CHD风险评估是心血管疾病一级预防的重要内容,国际上已构建诸多CHD风险评估模型,然而目前国内外所构建模型的临床适用性仍存在争议。通过大量病例对照研究及前瞻性研究,现已提出众多CHD发病相关危险因素。随着全基因组关联研究的发展及应用,为开发更准确的风险评估策略提供了新的方向,有学者提出联合危险因子与易感基因构建CHD风险评估模型的新策略,但其相比传统风险评估模型的效能提升仍存在争议。未来还需针对特定人种或区域人群进行大样本病例对照及前瞻性研究,就进一步探索危险因子联合易感基因的新模型构建策略是否优于传统风险评估模型开展更深入研究。

参考文献

- [1] 中国心血管病报告编写组.《中国心血管病报告2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] Long Y, Zhao XT, Liu C, et al. A Case-Control Study of the Association of the Polymorphisms of MTHFR and APOE with Risk Factors and the Severity of Coronary Artery Disease [J]. *Cardiology*, 2019, 142(3):149-157.
- [3] Akosile W, Voisey J, Lawford B, et al. NLRP3 is associated with coronary artery disease in Vietnam veterans [J]. *Gene*, 2020, 725:144163.
- [4] 冯磊.基于临床生化指标的冠心病预测模型建立及其与基因易感性关联的探索研究[D].南方医科大学,2016.
- [5] Truett J, Cornfield J, Kannel W. A multivariate analysis of the risk of coronary heart disease in Framingham [J]. *J Chronic Dis*, 1967, 20(7):511-524.
- [6] Chia YC, Lim HM, Ching SM. Validation of the pooled cohort risk score in an Asian population - a retrospective cohort study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14:163.
- [7] Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) [J]. *JAMA*, 2001, 285(19):3143-3421.
- [8] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project [J]. *Eur Heart J*, 2003, 24(11):987-1003.
- [9] Collins GS, Altman, DG. An independent external validation and evaluation of QRISK cardiovascular risk prediction: a prospective open cohort study [J]. *BMJ*, 2009, 339:b2584.
- [10] Ridker PM, Buring JE, Rifai N, et al. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score [J]. *JAMA*, 2007, 297(6):611-619.
- [11] Chia YC, Lim HM, Ching SM. Validation of the pooled cohort risk score in an Asian population - a retrospective cohort study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14:163.
- [12] Yang X, Li J, Hu D, et al. Predicting the 10-Year Risks of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Chinese Population: The China-PAR Project (Prediction for ASCVD Risk in China) [J]. *Circulation*, 2016, 134(19):1430-1440.
- [13] Liu F, Li J, Chen J, et al. Predicting lifetime risk for developing atherosclerotic cardiovascular disease in Chinese population: the China - PAR project [J]. *Sci Bulletin*, 2018, 63(12):779-787.
- [14] Feng L, Zhang CF, Nian SY, et al. Screening for suspected coronary heart disease inpatients, using integrated serum biochemical indices [J]. *J Epidemiol Commun Heal*, 2016, 70(2):195-201.
- [15] 余亚仁,李文华,陈静,等.胆红素血脂综合指数和纤维蛋白原水平与冠状动脉病变程度的相关性研究[J].中国循环杂志,2015,30(11):1039-1042.
- [16] Feng L, Nian SY, Zhao Y, et al. Higher HbA1c and/or glucose levels after the association patterns between glycated hemoglobin and fasting glucose levels [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 142(8):353-362.
- [17] Sattar N, Rawshani A, Franzén S, et al. Age at Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus and Associations With Cardiovascular and Mortality Risks [J]. *Circulation*, 2019, 139(19):2228-2223.

(下转第847页)

• COVID-19 专栏 •

新型冠状病毒数字PCR检测方法建立

李彤¹ 荆福祥² 李宏志¹ 邢晓星¹ 赵金银¹ 程迪¹ 曲守方^{3*} 刘琦^{1*}

[摘要] **目的** 研究和建立一种数字PCR检测方法,用于检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的核酸RNA。**方法** 建立使用一步法逆转录聚合酶链扩增法(RT-PCR)的数字PCR检测方法。然后使用假病毒质粒参考品对检测方法的准确性、灵敏度进行评价;使用其他病毒和健康人核酸RNA样本,进行特异性评价;临床新型冠状病毒肺炎患者的核酸RNA进行临床适用性评价,同时与荧光定量PCR方法进行比较。**结果** 建立了新型冠状病毒的数字PCR检测方法,假病毒质粒参考品均能准确检出,灵敏度为50 copies/mL;其他病毒和健康人核酸RNA样本均为阴性;临床新型冠状病毒肺炎患者的核酸RNA均能准确检出。经过比较,数字PCR检测方法检测灵敏度为50 copies/mL,荧光定量PCR法的灵敏度为100 copies/mL。**结论** 本研究建立的新型冠状病毒数字PCR检测方法具有较高准确性、灵敏度、特异性和临床适用性,能够改善临床新型冠状病毒核酸检测的假阴性问题。

[关键词] 新型冠状病毒;严重急性呼吸综合征;数字PCR

Development of a digital PCR for the detection of SARS-CoV-2

LI Tong¹, JING Fuxiang², LI Hongzhi¹, XIN Xiaoxing¹, ZHAO Jinyin¹, CHENG Di¹, QU Shoufang^{3*}, LIU Qi^{1*}
(1. DALIAN JINGTAI Biotechnology Co, Ltd. Dalian, Liaoning, China, 116635; 2. Department of Pathology, Jinxiang Hospital Affiliated to Shandong Jining Medical College, Jining, Shandong, China, 272200; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050)

[ABSTRACT] **Objective** To develop a digital PCR method for the detection of nucleic acid RNA of a novel coronavirus (SARS-CoV-2). **Methods** A digital PCR detection method using one-step reverse transcription polymerase chain amplification (RT-PCR) was developed. Pseudoviral plasmid reference materials were applied to evaluate the accuracy and sensitivity of the method. The specificity was also analyzed using other viral and healthy human nucleic acid RNA samples. The clinical application was evaluated using COVID-19 patient nucleic acid RNA samples and compared with the fluorescence quantitative PCR method. **Results** The pseudoviral plasmid reference materials can be accurately detected with a sensitivity of 50 copies/mL. All nucleic acid RNA samples from COVID-19 patients are positive, and negative from other viruses and healthy people as controls. The sensitivity of the digital PCR detection method is 50 copies/mL, much higher than that of compared with the fluorescent quantitative PCR method (100 copies/mL). **Conclusion** The digital PCR method for the detection of SARS-CoV-2 has high accuracy, sensitivity, specificity and clinical applicability, and can improve the problem of false negatives in clinical detection of novel coronavirus nucleic acids.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; COVID-19; Digital PCR

基金项目:国家科技重大专项宏基因组学快速感染诊断产品和传染病原分类方法开发(2018ZX10305409-002)

作者单位:1. 大连晶泰生物技术有限公司,辽宁,大连 116635

2. 山东省济宁医学院附属金乡医院病理科,山东,济宁 272200

3. 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; 刘琦, E-mail: liuqi@gentalker.com

注:李彤和荆福祥为并列第一作者

2019年12月我国出现一种不明原因的肺炎疫情,2020年1月对肺炎患者样本进行测序,发现该肺炎病原体为一种先前未知的新型冠状病毒-严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, 又称新型冠状病毒)^[1-2]。SARS-CoV-2是现在已知的第7种可以感染人的冠状病毒。PENG ZHOU 和 J-F CHAN 等^[3-4]通过全基因组测序发现 SARS-CoV-2 全基因组水平有 79.5% 以上与 SRAS-CoV 几乎相同,与蝙蝠冠状病毒的同源性达 96.0%,且证实与 SARS-CoV 相同是通过与细胞表面血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)受体结合方式进入宿主细胞^[5]。新型冠状病毒有极强传染性和传播力,临床表现为发热、乏力等全身症状,伴有干咳和呼吸困难等,可迅速发展为重症肺炎、呼吸衰竭、急性呼吸窘迫综合征等。冠状病毒主要通过直接接触分泌物或经气溶胶、飞沫传播^[6]。目前主要采用荧光定量 PCR 技术进行检测,优点是快速且检测结果比较准确^[7]。但是目前受到检测样品类型限制,荧光定量 PCR 对咽拭子样品核酸检测存在一定比例的假阴性,因此在实际检测中对于病原检测的灵敏度和特异性具有更高要求。

数字 PCR(Digital PCR, dPCR)技术是一种新的核酸检测和定量方法,与传统定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qPCR)技术不同,数字 PCR 采用绝对定量的方式,不依赖于标准曲线和参照样本,直接检测目标序列的拷贝数^[8-9]。由于这种检测方式具有比传统 qPCR 更加出色的灵敏度、特异性和精确性,数字 PCR 迅速得到广泛的应用,在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达微量微小差异鉴定方面表现出的优势已被普遍认可。而且其在基因表达研究、microRNA 研究、基因组拷贝数鉴定、癌症标志物稀有突变检测、致病微生物鉴定、转基因成分鉴定、高通量测序文库精确定量和结果验证等诸多方面也具有的广阔应用前景,已经受到越来越多的关注^[10-12]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本

样本 RNA 来自 3 例临床诊断为新型冠状病毒肺炎患者核酸 RNA 提取样本。人基因组 RNA,来自于 100 个正常人的基因组 RNA 等体积混合而

成,由大连晶泰生物技术有限公司提供。新型冠状病毒假病毒质粒合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,该假病毒质粒含有完整的 *Orf1ab* 基因序列。

1.1.2 试剂与仪器

QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司;HiScript III Reverse Transcriptase 逆转录酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司;QS 3D Digital PCR V2 MMX 1.5ML Kit 和 QS 3D DQPCR V2 20K CHIP 购自美国赛默飞公司。新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)购自华大生物科技(武汉)有限公司。

数字 PCR 仪使用 Thermo Fisher 公司的 QuantStudio™ 3D 数字 PCR 系统。荧光定量 PCR 仪使用上海宏石公司的 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计与合成

根据已公布新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的基因组序列,利用 DNASTar 和 Primer5.0 软件设计扩增特异性引物及探针,新型冠状病毒 *Orf1ab* 基因上游引物:1AB-F:5'-CAAGGTAAACCTTTGGAATTTG-3';新型冠状病毒 *Orf1ab* 基因下游引物:1AB-R:5'-TTGTCCTCACTGCCGT-3';新型冠状病毒 *Orf1ab* 基因探针:1AB-P:5'-FAM-TGC-CACTTCTGCTGCTCTTCAACC-BHQ1-3'。

根据 GenBank 中登陆的人基因组 *ACTB* 基因序列,利用 DNASTar 和 Primer5.0 软件设计扩增特异性引物及探针,内参基因 *ACTB* 上游引物:ACTB-F:5'-GTCTTCCCCTCCATCGTG-3';内参基因 *ACTB* 下游引物:ACTB-R:5'-GTACTTCAGGGTGAGGATGC-3';内参基因 *ACTB* 探针:ACTB-P:5'-VIC-AATCCTTCTGACCCATGCCACC-BHQ2-3'。引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 数字 PCR 反应体系和条件

PCR 反应为一步法逆转录聚合酶链扩增法(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)。新型冠状病毒 *Orf1ab* 基因上游引物、下游引物、新型冠状病毒 *Orf1ab* 探针、*ACTB* 内参基因的上游引物、下游引物、*ACTB* 内参基因探针按照其在数字 PCR 体系中的浓度分别为 450、450、450、450、450、225 nM 的最适比例进行混合,配置成 20X 的引物探针混合液。PCR 反应体系为:QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2(2×)

7.3 μL ; 新型冠状病毒引物探针混合液(20 \times) 0.7 μL ; HiScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μL) 2 μL ; RNA 模板 4.5 μL 。将以上配置好的体系加入到数字 PCR 芯片中(QuantStudio™ 3D Digital Chip v2),并用矿物油覆盖芯片,密封好并确保无泄漏。再把芯片放到 PCR 仪器(例如, ProFlex™ PCR System)中,进行 PCR 反应,PCR 反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$, 50 min; 96 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 57 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec, 39 个循环; 57 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用分析软件: QuantStudio™ 3D Analysis Suite™ Software 对数字 PCR 反应结果进行分析。

1.2.3 荧光定量 PCR 反应体系和条件

荧光定量 PCR 检测使用新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法),反应体系及条件按照说明书要求设置。

1.2.4 准确性和灵敏度试验

新冠假病毒质粒合成于上海生工生物,该假病毒质粒含有完整的 *Orflab* 基因序列。将人基因组 RNA、假病毒质粒按照一定比例进行混合分别形成假病毒含量为 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、100、50、25 copies/mL 的参考品。将上述的假病毒参考品作为模板进行实验,评价该方法的准确性和灵敏度。根据检测拷贝数和理论拷贝数做标准曲线和线性回归系数 R^2 值。

1.2.5 特异性试验

参照核酸提取试剂盒说明书方法提取猪流行性腹泻病毒 PEDV、猪传染性胃肠炎病毒 TGEV、风疹病毒 RV、甲型流感病毒 H1N1 的核酸,利用建立的数字 PCR 检测方法进行扩增,同时提取的健康人样本的核酸做为阴性对照,评价该方法的特异性。

1.2.6 精密度试验

选取 50、500 copies/mL 浓度水平的参考品分批次重复检测 10 次,得到重复检测结果,统计浓度对数值的变异系数(CV,%)。

1.2.7 数字 PCR 检测方法与荧光定量 PCR 检测方法对比试验

采集确诊的 3 例临床新型冠状病毒肺炎患者 RNA 样本,同时利用建立的数字 PCR 检测方法与新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行检测,分别得到荧光定量 PCR 结果和数字 PCR 病原体拷贝数结果。

将人基因组 RNA、假病毒质粒按照一定比例进行混合分别形成假病毒含量为 500、300、150、

100、75 和 50 copies/mL 假病毒参考品。将参考品利用新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行荧光定量 PCR 检测,其中 100、75 和 50 copies/mL 参考品重复检测 25 次。确定新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)检测灵敏度,将其结果与数字 PCR 检测方法比较。

2 结果

2.1 准确性和灵敏度

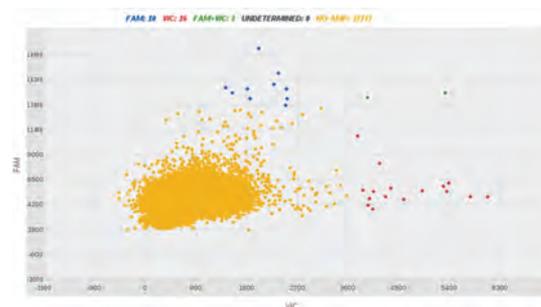
不同含量假病毒参考品进行数字 PCR 检测,根据数字 PCR 检测病毒含量与理论病毒含量进行拟合,其线性回归系数 R^2 为 0.998 8,表明在该条件下,新冠假病毒的理论值病毒含量和实际检测病毒含量呈现出很好的线性关系,显示建立的数字 PCR 检测方法具有很好的准确性。见表 1。

表 1 假病毒参考品准确性的数字 PCR 检测结果

Table 1 Results of accuracy for pseudoviral reference by digital PCR

样本名称(copies/mL)	新冠假病毒含量检测结果(copies/mL)
假病毒含量参考品- 1×10^5	1.31×10^5
假病毒含量参考品- 1×10^4	0.8652×10^4
假病毒含量参考品- 1×10^3	1.281×10^3
假病毒含量参考品-100	170.71
假病毒含量参考品-50	70.18

25 次重复实验的结果为 50 copies/mL 的假病毒参考品 23 次均能准确检出,而 25 copies/mL 的假病毒参考品只有 3 次能准确检出。结果表明新冠假病毒数字 PCR 检测方法的灵敏度为 50 copies/mL,见图 1。



注:新型冠状病毒 *Orflab* 基因扩增显示 FAM 信号(蓝色),人基因组内参 *ACTB* 基因扩增显示 VIC 信号(红色),两个基因都有扩增显示为绿色,黄色表示孔中无扩增。

图 1 50 copies/mL 假病毒参考品数字 PCR 检测结果
Figure 1 Result of 50 copies/mL pseudoviral reference by digital PCR

2.2 特异性

经序列同源性比对,所选用的引物和探针与其他的人冠状病毒、流感病毒等呼吸道病毒无同源性。对病原体 PEDV、TGEV、RV、H1N1 的核酸与健康人群核酸样本进行特异性评价,结果均为阴性,显示较好的特异性,见图 2。

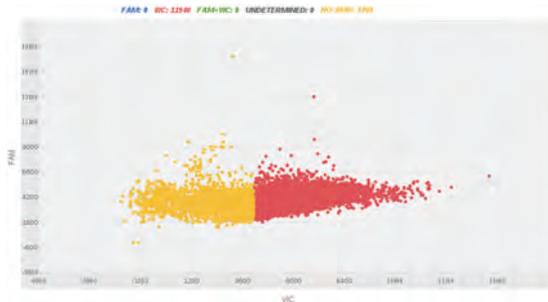


图2 健康人群核酸样本数字PCR检测结果

Figure 2 Result of nucleic acid samples from healthy people by digital PCR

2.3 精密度

选取浓度为 50、500 copies/mL 水平的参考品分批次重复检测 10 次,根据检测结果统计出浓度对数值的变异系数(CV,%)为 5.97% 和 1.99%,建立的数字 PCR 方法有良好的精密度。

2.4 两种检测方法对比

采集 3 例临床新型冠状病毒肺炎患者 RNA 样本,利用数字 PCR 检测方法进行检测,结果均为阳性。与国家药品监督管理局已经批准上市的新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)的检测结果进行平行比较,见表 2。

表2 两种方法检测结果比较

Table 2 Comparison results of 2 detection methods

样本编号	荧光定量 PCR 检测 (Ct 值)	荧光定量 PCR 检测结果	数字 PCR 定量结果 (copies/mL)	数字 PCR 检测结果
样本 RNA-1	27.25	阳性	1.37×10 ⁴	阳性
样本 RNA-2	27.31	阳性	1.21×10 ⁴	阳性
样本 RNA-3	27.11	阳性	1.52×10 ⁴	阳性

检测结果显示 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)只能检测到 100 copies/mL 以上病毒含量的样本,与试剂盒说明书中标注的检测灵敏度一致,见图 3。而数字 PCR 灵敏度和准确性实验结果显示数字 PCR 检测方法的灵敏度可达到 50 copies/mL,高于荧光定量 PCR 方法的灵敏度(100 copies/mL)。

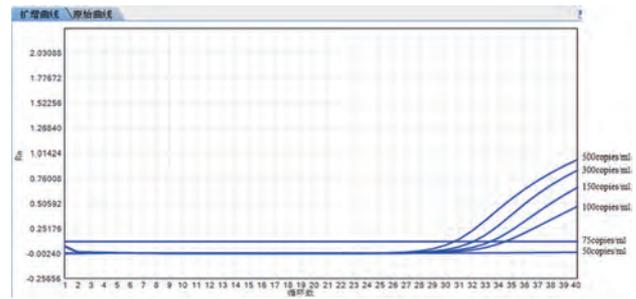


图3 样本 RNA-1 稀释样本荧光定量 PCR 检测结果

Figure 3 Fluorescence quantitative PCR test results of RNA-1 diluted samples

3 讨论

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 传染性强,临床症状不典型,给临床诊断和疫情防控带来很大困难,快速又精确的诊断对新冠肺炎的防控至关重要。病原学是诊断新型冠状病毒感染的金标准,但由于其存在窗口期、灵敏度低、程序复杂等缺陷,难以在此次疫情中得到广泛应用,而病毒的核酸检测也是确诊 COVID-9 的金标准,其灵敏度更高。定量检测可以动态检测病毒感染的程度从而观察疗效,因此核酸检测在 COVID-9 的诊断及疫情的防控中担任不可或缺的角色。而数字 PCR 技术具有更高的检测灵敏度和准确度,能够更好的满足临床诊断需求。

本研究建立了一种数字 PCR 检测方法,使逆转录和 PCR 扩增过程一步完成,减少了开盖污染的风险。选取新型冠状病毒 SARS-CoV2 的高保守区域 *Orflab* 基因进行引物与探针设计保证了特异性和准确性,通过实验结果可以看出本研究建立的数字 PCR 检测方法具有很好的灵敏度、准确性、特异性及临床适用性,可以用于临床新型冠状病毒的快速检测,为新型冠状病毒感染的诊断及流行病学调查提供了有效的工具。

利用 3 例临床新型冠状病毒肺炎患者 RNA 样本进行检测,均能准确检出,表明建立的数字 PCR 检测方法具有较好的临床适用性。与国家药品监督管理局已经批准上市的新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)检测结果进行平行比较,结果显示建立的数字 PCR 检测方法具有更高的灵敏度,可以改善现阶段荧光定量 PCR 法检测试剂盒的假阴性问题。

参考文献

- [1] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (8): 727-733.
- [2] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. *Eur Surveill*, 2020, 25(3).
- [3] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [4] Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human - pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [5] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565-574.
- [6] 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)[S]. 2020.
- [7] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (6): 1292-1305.
- [8] Vynck M, Trypsteen W, Thas O, et al. The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology [J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20 (5): 437-447.
- [9] Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 79-88.
- [10] WATANABE M, KAWAGUCHI T, ISA S, et al. Ultrasensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(15): 3552-3560.
- [11] PERSAUD D, GAY H, ZIEMNIAK C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(19): 1828-1835.
- [12] BECK J, BIERAU S, BALZER S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1732-1741.
-
- (上接第 842 页)
- [18] Feng L, Nian SY, Tong ZW, et al. Age-related trends in lipid levels: a large-scale cross-sectional study of the general Chinese population [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(3): e034226.
- [19] Gregson J, Kaptoge S, Bolton T, et al. Cardiovascular Risk Factors Associated With Venous Thromboembolism [J]. *JAMA Cardiology*, 2019, 4(2): 163-173.
- [20] Liberale L, Montecucco F, Tardif JC, et al. Inflamm-aging: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 748-758.
- [21] 张鑫, 唐其柱, 马振国, 等. 血清胆红素水平与冠心病严重程度度的关系 [J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(2): 138-142.
- [22] Feng L, Nian SY, Hao YL, et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the Stromal Cell-Derived Factor 1 Gene Is Associated with Coronary Heart Disease in Chinese Patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 11054-11063.
- [23] Feng L, Nian SY, Zhang JH. The GG genotype of telomerase reverse transcriptase at genetic locus rs2736100 is associated with human atherosclerosis risk in the Han Chinese population [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85719.
- [24] Mosley JD, Gupta DK, Tan J, et al. Predictive Accuracy of a Polygenic Risk Score Compared With a Clinical Risk Score for Incident Coronary Heart Disease [J]. *JAMA*, 2020, 323 (7): 627-635.
- [25] Fan Q, Zhu Y, Zhao F. Association of rs2230806 in ABCA1 with coronary artery disease: An updated meta-analysis based on 43 research studies [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (4): e18662.
- [26] Mars N, Koskela JT, Ripatti P, et al. Polygenic and clinical risk scores and their impact on age at onset and prediction of cardiometabolic diseases and common cancers [J]. *Nat Med*, 2020, 26(4): 549-557.
- [27] Elliott J, Bodinier B, Bond TA, et al. Predictive Accuracy of a Polygenic Risk Score-Enhanced Prediction Model vs a Clinical Risk Score for Coronary Artery Disease [J]. *JAMA*, 2020, 323(7): 636-645.

新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的性能验证

何吕芬 李沙 利振坤 李欢 王立程 符晓莹 黎元莉 陈海 陈少金 朱雄*

[摘要] **目的** 对实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸进行方法学评价。**方法** 依据 ISO15189 和 CNAS-GL039 性能评价文件及厂家声明,对本法精密度、准确度、检测下限、特异性和抗干扰能力进行验证。**结果** RT-PCR 试剂检测 SARS-CoV-2 核酸结果的精密度均小于允许变异度,准确性和重复性的符合率均为 100%,检测下限为 1.0×10^3 copies/mL,内源性抗干扰能力 $CV < 5\%$,与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体等无交叉反应。**结论** RT-PCR 检测方法灵敏度高,重复性好,抗干扰力强,检测下限和特异性均符合要求,可用于临床检测。

[关键词] 新型冠状病毒;性能验证;实时荧光聚合酶链反应

Performance verification of a real-time fluorescent RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2

HE Lvfen, LI Sha, LI Zhenkun, LI Huan, WANG Licheng, FU Xiaoying, LI Yuanli, CHEN Hai, CHEN Shaojin, ZHU Xiong*

(Department of Central Laboratory, People's Hospital of Sanya, Sanya, Hainan, China, 572000)

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the performance of a real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) method for the detection of SARS-CoV-2 nucleic acid. **Methods** To verify the precision, accuracy, lower detection limit, specificity and anti-interference ability of this method, according to ISO 15189 and CNAS-GL039 evaluation documents and manufacturer's declaration. **Results** Precision of RT-PCR reagent of SARS-CoV-2 nucleic acid detection was less than the allowable variability, the accuracy and repeatability coincidence rates were 100%, the lower detection limit was 1.0×10^3 copies/mL, the endogenous anti-interference ability CV was $< 5\%$, there was no cross reaction with other pathogens of the same infection site or similar infection symptoms. **Conclusions** The RT-PCR detection method has high sensitivity, good repeatability, strong anti-interference ability, the lower detection limit and specificity meet the requirements. Therefore, it can be used for clinical detection.

[KEY WORDS] SARS-CoV-2; Performance verification; Real-time fluorescent polymerase chain reaction

2019年12月以来,湖北省武汉市陆续发现多起新型冠状病毒[后来更新为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)]感染后引起新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)的病例,随后疫情迅速蔓延至全国各省市。SARS-

CoV-2属于 β 属冠状病毒,有包膜,颗粒呈圆形或椭圆形,常为多形性,直径60~140 nm。其基因特征与严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)有明

基金项目:海南省自然科学基金青年基金项目(818QN326);三亚市医疗卫生科技创新项目(2019YW20)

作者单位:海南省三亚市人民医院中心实验室,海南,三亚 572000

*通信作者:朱雄, E-mail: zhuxiong6@163.com

显区别。目前研究显示 SARS-CoV-2 与蝙蝠 SARS 样冠状病毒 (bat-SL-COVZC45) 同源性达 85% 以上^[1]。该病作为急性呼吸道传染病已纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,按甲类管理。随着对疾病认识的不断深入,我国先后发布了《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》及《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案》等规范性文件,并已进行了多次更新^[2-3]。

病原学检测是诊断 COVID-19 的金标准。由于病毒测序技术对人员、设备要求较高^[4],因此采用 RT-PCR 技术检测核酸是目前确诊 SARS-CoV-2 最为广泛的方法。ISO15189 是国际医学界普遍承认并遵照执行的关于医学实验室质量和能力方面要求的国际标准。2019 年 2 月 15 日最新发布的 CNAS-GL039^[5] 文件由中国合格评定国家认可委员会制定,是对 CNAS-CL02:2012《医学实验室质量管理能力和认可准则在分子诊断领域的应用说明》中有关分子诊断相关检验程序进行性能验证实验所做的具体解释和指导。

1 材料与方法

1.1 临床样本

选取 2020 年 1 月 25 日至 2020 年 2 月 24 日在三亚市人民医院检测的 SARS-CoV-2 核酸阳性和阴性样本所有患者均已鉴知情同意书及通过医院伦理委员会。

1.2 试剂与仪器

核酸提取或纯化试剂盒(批号:2019004)、2019 新型冠状病毒(*ORF1ab/N*)核酸检测试剂盒(批号:20200123)、DA3200 核酸提取仪,均购自中山大学达安基因股份有限公司;ABI 7500 型 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher Scientific。

1.3 检测方法

按试剂盒说明书操作,扩增反应条件为:50℃ 15 min;95℃ 15 min;94℃ 15 s;55℃ 45 s;共 45 个循环,在 55℃ 采集荧光信号。

1.4 判断标准

根据试剂盒要求,结果判断标准如下:①如果检测样本在 *ORF1ab* 和 *N* 基因通道无扩增曲线或 Ct 值 >38,判为 SARS-CoV-2 阴性;②如果检测样品在 *ORF1ab* 和 *N* 基因通道 Ct 值 ≤38,且有明显的扩增曲线,判为 SARS-CoV-2 阳性;③如果检测样品在 *ORF1ab* 或者 *N* 基因通道 Ct 值 ≤38,另一通道

无扩增曲线,建议复检,复检结果与原结果一致,判为 SARS-CoV-2 阳性。

1.5 性能验证方法及指标

1.5.1 精密度评估

选取 4 例咽拭子,其中 SARS-CoV-2 核酸阳性 3 例(S1、S2、S3),阴性 1 例(S4)。批内精密度试验,在同一批试验中重复检测 20 次;批间精密度试验,重复测定 5 次,连续测定 4 d,共计测定 20 次。要求变异系数(CV)≤5%,阴阳性符合率均 >95%,则精密度符合要求。

1.5.2 准确度评估

选取经海南省 COVID-19 诊断专家组确诊为 COVID-19 患者的咽拭子 10 例和三亚市疾控中心已确认的 5 例咽拭子(SARS-CoV-2 阳性 3 例、阴性 2 例)进行检测,分析结果的一致程度,阴阳性符合率 >95%,则准确度符合要求。

1.5.3 最低检测下限评估

将 1 例 SARS-CoV-2 核酸浓度为 2.33×10^6 copies/mL 的咽拭子样本分别稀释为 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 copies/mL,核酸提取后,进行双重实时荧光 RT-PCR 反应体系的灵敏度测试,初步测试该方法的灵敏度范围,再进一步各进行 10 个重复测试确定最低检测下限,计算各浓度检出率,100% 检出率的最小值为检测下限。

1.5.4 特异性评估

将冠状病毒(OC43、NL63、229E、HKU1)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、人巨细胞病毒、MERS 冠状病毒样颗粒、SARS 冠状病毒样颗粒分别加入到 SARS-CoV-2 阴性的咽拭子样本中,同时各以 1 例阴性和阳性样本为阴阳性对照,各重复检测 3 次。可接受性能标准:不应出现阳性扩增曲线或 Ct 值。

1.5.5 内源性干扰评估

选取 1 例 SARS-CoV-2 核酸阳性的咽拭子样本分成 4 份,各 200 μL,每份样本加入正常人红细胞 0、6、10、12 μL,红细胞浓度分别是 0%、3%、5%、6%,提取核酸后进行复孔扩增,重复 5 次,要求变异度(CV)≤5%,并评判符合性。

1.6 统计学方法

采用 Excel 和 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计算计量资料的均数、方差、标准差和 CV 值。

2 结果

2.1 精密度验证

批内精密度试验中, SARS-CoV-2 样本阳性 3 例(S1、S2、S3), 重复测定 20 次, *ORF1ab* 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 23.19、30.06、33.87, 其变异系数 CV 分别是 1.21%、1.52%、1.49%; *N* 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 23.19、29.07、33.11, 其变异系数 CV 分别是 1.34%、1.54%、1.46%。批间精密度试验中, SARS-CoV-2 样本阳性 3 例(S1、S2、S3), 重复测定 5 次, 连续测定 4 d, *ORF1ab* 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 23.30、30.01、33.98, 其变异系数 CV 分别是 2.05%、1.97%、2.05%; *N* 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 23.16、28.96、33.07, 其变异系数 CV 分别是 2.09%、1.92%、1.91%。精密度试验的阴性、阳性符合率均为 100%, 所有通道的 Ct 值的变异系数 CV < 5%, 精密度符合性能验证标准。

2.2 准确性验证

15 例样本进行检测结果显示: 13 例为 SARS-CoV-2 阳性, *ORF1ab* 基因通道的 Ct 值为 22.40~35.62, *N* 基因通道的 Ct 值为 21.31~37.25, Ct 值均 < 38, 且有明显的扩增曲线; 2 例阴性, 在 *ORF1ab* 和 *N* 基因通道均无扩增曲线。与海南省 COVID-19 诊断专家组和三亚市疾控中心的结果一致, 阳性和阴性样本符合率均为 100%, 其准确性符合性能验证标准。

2.3 最低检测下限

浓度为 10 倍差梯度 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3$ copies/mL) 的 SARS-CoV-2 样本, *ORF1ab* 和 *N* 基因检测通道均有明显扩增曲线, 且 Ct 值均 < 38; 1×10^2 copies/mL SARS-CoV-2 样本, 双基因通道虽然存在荧光信号和扩增曲线, 但 *ORF1ab* 和 *N* 基因 Ct 值分别是: 38.23、40.75, 见图 1。因此, 采用浓度为 1×10^3 、 5×10^2 、 2×10^2 copies/mL 的 SARS-CoV-2 样本, 各重复测试 10 次。 1×10^3 copies/mL SARS-CoV-2 样本双基因通道的 Ct 值均 < 38, 检出率均为 100%, 见图 2; 5×10^2 copies/mL SARS-CoV-2 样本双基因通道虽然存在荧光信号和扩增曲线, 但 *ORF1ab* 和 *N* 基因检出率分别是 90%、80%。见图 3。

2.4 特异性验证

除 SARS-CoV-2 阳性样本有扩增曲线外, 其它均无扩增曲线, 表明该检测体系具有较好的特异性, 见图 4。

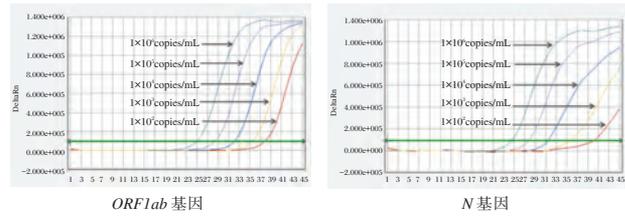


图 1 双重实时荧光 RT-PCR 体系灵敏度测试扩增曲线
Figure 1 Amplification curves of dual real-time fluorescent RT-PCR system sensitivity

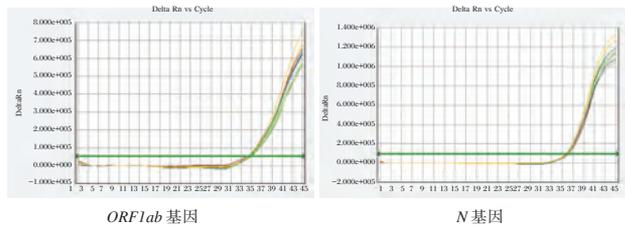


图 2 1×10^3 copies/mL SARS-CoV-2 样本双重实时荧光 RT-PCR 扩增曲线
Figure 2 Dual real-time fluorescence RT-PCR amplification curves of 1×10^3 copies/mL SARS-CoV-2 samples

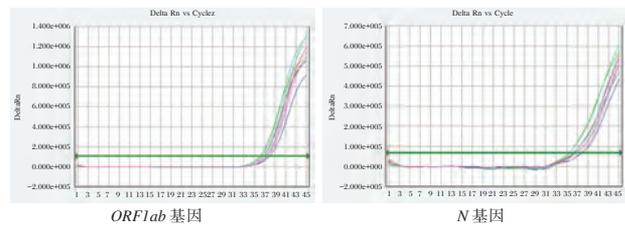


图 3 5×10^2 copies/mL SARS-CoV-2 样本双重实时荧光 RT-PCR 扩增曲线
Figure 3 Dual real-time fluorescence RT-PCR amplification curves of 5×10^2 copies/mL SARS-CoV-2 nucleic samples

2.5 内源性干扰

红细胞浓度分别为 0%、3%、5%、6% 的 SARS-CoV-2 的阳性样本, 复孔扩增, 重复 5 次, *ORF1ab* 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 32.10、33.44、

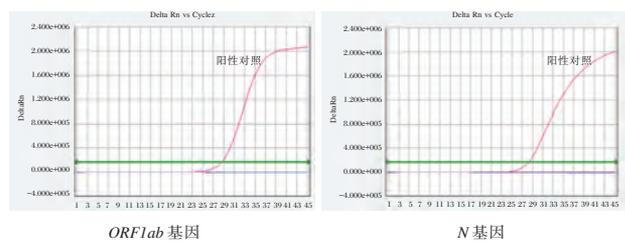


图 4 双重实时荧光 RT-PCR 反应特异性扩增曲线
Figure 4 Amplification curves of dual real-time fluorescent RT-PCR reaction specificity

32.94、30.68,其变异系数 CV 分别是 1.37%、2.57%、2.29%、2.00%; N 基因通道的 Ct 值的平均值分别是 30.81、32.03、31.56、29.18,其变异系数 CV 分别是 1.03%、2.72%、2.05%、0.88%。所有通道 Ct 值的变异系数 $CV < 5%$,符合率均为 100%,表明不存在明显的内源性干扰,验证结果通过。

3 讨论

分子生物学方法敏感性高,特异性强,已逐渐成为病毒检测的主要方法。RT-PCR 是最常用的分子生物学检测方法之一,广泛应用于临床疾病的诊断、疗效评估和预后检测^[6-8]。依据 ISO15189 和 CNAS-GL039 性能评价,新试剂和新项目应用于临床检测前必须对其检测体系进行严格的方法学评价和性能验证,定性项目至少对准确度、检测下限、特异性及抗干扰能力进行验证。

检测系统良好的精密度是进行其他方法学验证实验的前提^[9-10]。本研究结果显示,精密度试验的阴性和阳性符合率均为 100%,*ORF1ab* 和 N 基因通道的 Ct 值的 CV 值均小于 5%,表明试剂盒重复性高,随机误差小。内源性抗干扰能力 CV 值均小于 5%,表明试剂盒抗干扰能力良好。与冠状病毒(OC43、NL63、229E、HKU1)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、人巨细胞病毒等无交叉反应,因条件限制,未能获取 MERS-CoV 和 SARS-CoV,使用 MERS 和 SARS 冠状病毒样颗粒进行实验,尚不能说明与 MERS-CoV 和 SARS-CoV 无交叉反应,但试剂厂家前期的研发结果显示:与 MERS-CoV 和 SARS-CoV 无交叉反应。因此,RT-PCR 检测方法灵敏度高,重复性好,抗干扰力强,检测下限和特异性均符合要求,可用于临床检测。

SARS-CoV-2 核酸结果受多因素影响,如采样标本是否合格、操作是否规范、检测试剂盒本身敏感性等问题,临床上若出现鼻、咽拭子阴性而流行病学史、症状或影像学表现高度疑似 COVID-19 的患者,建议同时采下呼吸道样本进行核酸检测,选择不同的检测试剂,或者增加检测次数^[11-12]。

综上所述,本研究依据 ISO 15189 和 CNAS-GL039 文件,对 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒进行性能验证,严把质量控制关,有助于规范 SARS-CoV-2 实时荧光 RT-PCR 检测的实验室质量管理,提高 SARS-CoV-2 检测结果的可靠性、稳定性和准确性。

参考文献

- [1] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565-574.
- [2] 国家卫生健康委员会办公厅. 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版).
- [3] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎防控方案(第六版).
- [4] 袁易,王铭杰,张欣欣. 第三代测序技术的主要特点及其在病毒基因组研究中的应用[J]. *微生物与感染*, 2016, 11 (6): 380-384.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明: CNASCL02-A039 [S]. 中国合格评定国家认可委员会, 2019-02-15.
- [6] 余学高,邓间开,何小洪,等. HBV DNA 高敏检测试剂盒的性能验证和临床应用评价[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(02): 111-116.
- [7] Tan NK, Carrington D, Pope CF. Verification of the Roche cobas® 6800 PCR 200 μ l and 500 μ l protocols for the quantification of HIV-1 RNA, HBV DNA and HCV RNA and evaluation with COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan® assays [J]. *J med microbiol*, 2018, 67: 1711-1717.
- [8] 蒋玲丽,王雪亮,王华梁,等. 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸方法学性能验证程序的探讨[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, (5): 321-325.
- [9] 伊洁,吴洁,肖艳,等. ABI7900 实时荧光 PCR 系统检测腺病毒 DNA 性能验证[J]. *中国医学装备*, 2020, 17(1): 13-16.
- [10] Carolina IC, Juan CR, Marcelo R, et al. Comparative Study and Analytical Verification of PCR Methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease [J]. *J Mol Diagn*, 2017, 19 (5): 673-681.
- [11] World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. (2020-01-17) [2020-02-06]. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-insuspected-human-cases-20200117>.
- [12] 白浪,王铭,唐小琼,等. 对新型冠状病毒肺炎诊疗中的热点问题的思考[J]. *华西医学*, 2020, 35(2): 125-131.

EDA 基因外显子缺失所致外胚层发育不良家系的基因型研究及产前诊断

丁红珂 余丽华 曾玉坤 刘玲 尹爱华 卢建 张彦 兰菲菲*

[摘要] 目的 分析X连锁少汗型外胚层发育不良患儿的致病基因,为先证者家庭提供遗传咨询和产前诊断。方法 利用高通量测序技术检测先证者的相关致病基因,依据检测结果的缺失提示,进一步采用染色体微阵列技术检测缺失范围。根据染色体微阵列的缺失区域设计断点PCR引物,对包含断点的PCR产物进行Sanger测序确定缺失范围,并验证先证者母亲基因型,结合基因诊断结果对家系第三胎进行产前分子诊断。结果 高通量测序发现先证者EDA基因第一外显子编码区缺失。染色体微阵列检测到X染色体存在约267 kb片段缺失,包含EDA基因第一外显子。断点PCR产物Sanger测序发现先证者存在267 808 bp半合子缺失,母亲为杂合缺失携带者。胎儿产前分子诊断结果未发现存在该区域缺失。结论 EDA基因第一外显子及上下游区域的缺失是导致先证者临床表现的主要原因,结合多种分子检测手段有助于明确因拷贝数目变异所致的遗传性疾病,并通过断点PCR的方法对该家系进行了快速的携带者验证及产前诊断,为该家庭的临床诊断和遗传咨询提供了遗传学证据。

[关键词] 少汗型外胚层发育不良; EDA基因第一外显子; 高通量测序; 染色体微阵列分析; 拷贝数变异

Genotyping of a hypohidrotic ectodermal dysplasia family caused by EDA gene exon deletion and prenatal diagnosis

DING Hongke, YU Lihua, ZENG Yukun, LIU Ling, YIN Aihua, LU Jian, ZHANG Yan, LAN Feifei*

(Medical Genetic Center, Guangdong Women and Children Hospital, Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] Objective To analyze the disease gene in a X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia child for genetic counseling and prenatal diagnosis. Methods The proband's associated pathogenic gene was identified by the next generation sequencing and the deletion range was further detected by chromosomal microarray according to the NGS detection results. PCR primers were designed to look for the breakpoint according to deletion area suggested by CMA. Fracture site was verified by Sanger sequencing using PCR products. Genotype of the proband's mother was verified and prenatal molecular diagnosis was performed for the third fetus of the proband's mother according to the genetic diagnosis results. Results High-throughput sequencing revealed that the coding region of the first exon of the proband EDA gene was deleted. The chromosome X has a 267 kb deletion fragment by CMA detection including the EDA gene exon 1. Sanger sequencing of breakpoint PCR products found that the proband has a 267808 bp hemizygous deletion and his mother is a carrier of heterozygotic deletion. The deletion area was not found in the fetus of the proband's mother by prenatal molecular diagnosis. Conclusion The deletion of the first exon of the EDA gene and the upstream and downstream regions are the main reasons leading to the clinical manifestations of probands. Combining multiple molecular detection methods helps to clarify the genetic diseases caused by copy number

基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(B2017057)

作者单位:广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州511442;广东省妇幼保健院妇幼代谢与遗传病重点实验室,广东,广州511442

*通信作者:兰菲菲, E-mail: shuyue88@163.com

variation, and through the method of breakpoint PCR to carry out rapid carrier verification and prenatal diagnosis of the family, to provide genetic evidence for the family's clinical diagnosis and genetic counseling.

[KEY WORDS] Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia; *EDA* exon 1; Next-Generation Sequencing; Chromosomal Microarray Analysis; Copy Number Variation

外胚层发育不良(Ectodermal dysplasia, EDs)是一种遗传性人类疾病,会影响外胚层起源的结构,是一组临床和先天异质性的疾病,其特征是两个或两个以上的外胚层结构发育障碍,包括头发、牙齿、指甲或汗腺的异常,这类疾病降低了患者的生活质量。还有其他外胚层结构可能与EDs有关,如乳腺、甲状腺、胸腺、垂体前叶,肾上腺髓质,中枢神经系统,黑色素细胞,外耳,泪腺和导管,结膜,角膜和睑板腺^[1]。研究报道的已有200多种EDs类型^[1-2],最常见的表型是无汗或少汗型外胚层发育不良(HED/EDA)。尽管存在常染色体隐性和显性形式,但X连锁隐性遗传是该病最常见的遗传方式,在普通人群中,每17 000个新生儿中就有一个患有此病^[3]。

*EDA*基因(OMIM ID: 300451)是X-连锁少汗型外胚层发育不良1型(OMIM ID: 305100, 中文名称来源于CHPO数据库: <http://chinahp.org/>)的主要致病基因。人类*EDA*基因有5种转录本,其中最长的转录本编码由391个氨基酸组成的跨膜蛋白,其余4个转录本,编码缺少胶原结构域的截短蛋白^[4]。Kere等报道了*EDA1*基因的定位克隆,他们从一个成年人的汗腺cDNA文库中鉴定出一个代表全长转录本的cDNA,该转录本由2个外显子组成。推测基因产物是135个残基的蛋白质,预计包含一个跨膜结构域。该基因表达于角质形成细胞、毛囊、汗腺,表达的*EDA1*蛋白通过*EDA*受体在皮肤附件的形成过程中起至关重要的作用。Kere等还在几例*EDA*患者中,发现了*EDA1*基因的缺失和突变^[5]。Srivastava等克隆了小鼠的“Tabby”(Ta)基因,并鉴定出3种不同的转录亚型,分别编码391、177和220个氨基酸。所有转录本都具有共同的第1外显子,与人*EDA*的前132个氨基酸显示88%的同源性^[6],这提示第1外显子对于野生蛋白功能的发挥具有中重要作用。本文通过先证者家系致病基因的检测和缺失断裂位点的验证及胎儿的产前诊断,为先证者母亲生育健康孩子提供遗传咨询。

1 材料与方法

1.1 研究对象

患儿,男,13岁,足月顺产,临床表现为皮肤干燥,

少汗(脚底可少量出汗),毛发稀少(无眉毛,睫毛稀少),牙齿发育不良(共出牙4颗),具有外胚层发育不良的特殊面容。患儿母亲孕3产3,曾生育一名男婴出生后不明原因夭折。患儿母亲未见明显异常。

1.2 标本采集

经签署知情同意书及广东省妇幼保健院医学伦理委员会审批,采集先证者及其父母外周血2 mL(EDTA抗凝)进行相关分子遗传学检测。经过知情同意,母亲于孕13周时在超声引导下进行绒毛穿刺抽取术抽取胎儿绒毛。使用德国Qiagen公司生产的Qiaamp DNA Blood Mini Kit提取试剂盒进行基因组DNA提取。

1.3 方法

1.3.1 高通量测序

先证者DNA进行与外胚层发育不良的相关基因高通量测序,由广州嘉检医学检测公司完成。高通量测序结果分析包含相关的*EDA*、*EDAR*、*ABCC9*、*DSP*、*EVC2*等38个基因,630个编码区,99 981个碱基,平均覆盖深度183+/-89×,大于10×覆盖区间占99.4%,大于20×覆盖区间占98.9%。参考序列版本号:GRCh37/hg19。

1.3.2 高通量测序CNV计算

使用CASAVA v1.7(美国,Illumina公司)软件将原始图像转换为碱基序列并按样本特异的DNA条码进行拆分。拆分后的序列数据由NextGENe软件(SoftGenetics, State College, PA)进一步处理进行比对。删除低质量的reads(Phred分数<Q25)。每个外显子的平均覆盖率使用特定捕获基因的bed文件数据中提取。通过分析检测到的可能具有拷贝数变化的外显子会被自动描绘出来,以供进一步验证。检测CNV的脚本存放于<https://sourceforge.net/projects/cnvanalysis>。

1.3.3 染色体微阵列分析(Chromosomal Microarray Analysis, CMA)

使用美国Affymetrix公司生产的CytoScan750 k芯片和扩增、杂交试剂盒进行CMA检测。参照Infinium HD Assay标准操作流程进行操作,检测结果使用Chromosome Analysis Suite(Ch AS; version 2.1)软件进行分析。结果判读参照DGV、

ISCA、OMIM、DECIPHER 等数据库。

1.3.4 断裂位点 PCR 检测

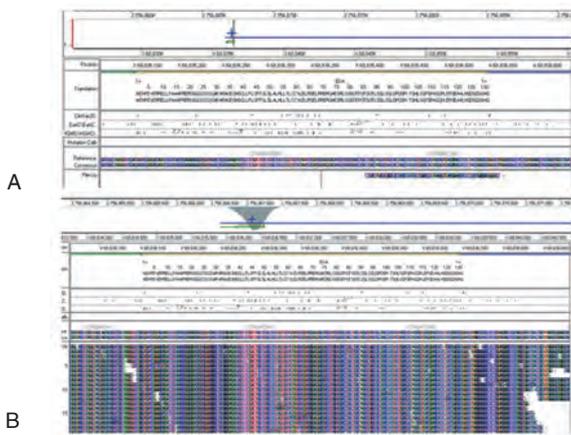
根据 CMA 检测结果提示的 CNV 缺失区域,设计多对引物,其中引物 LFS2-LR1 配对扩增出 1 061 bp 片段,上游引物 5'-GTCAGGCAGGCT-TACTACCCA-3',下游引物 5'-ACCAGACAATG-TATACGTTAAGTGC-3'。同时用 LFS2-LR1 扩增 200 例正常对照。将 1 061 bp 扩增产物进行 Sanger 测序,通过序列比对分析,判断 *EDA* 基因第一外显子缺失断裂位点的准确位置。

2 结果

2.1 分子遗传学检测结果及分析

2.1.1 高通测序结果

未发现 38 个相关基因的致病/疑似致病点突变。数据分析发现先证者 *EDA* 基因第一外显子编码区(396 bp)信号缺失,正常对照可检测到序列信息(图 1)。



注:A. 家系先证者 NGS 提示的 *EDA* 基因第一外显子缺失信号图; B. 正常男性 NGS 提示的 *EDA* 基因第一外显子区域信号图。

图 1 高通量测序提示 *EDA* 基因第一外显子信号缺失
Figure 1 Absent signal of the *EDA* gene exon 1 detected by next generation sequencing

2.1.2 染色体微阵列分析

CMA 检测结果发现 X 染色体存在约 267 kb 片段缺失(chrX:68,801,113-69,068,115),其中包含了 *EDA* 基因第一外显子及上下游区域(图 2)。

2.1.3 断点 PCR 检测

LFS2-LR1 引物对在先证者及其母亲样本中扩增出 1 061 bp 片段,正常对照未扩增出相应片段(图 3)。并对包含可疑断点的 PCR 产物进行了 Sanger 测序,提示先证者 *EDA* 基因缺失范围为 chrX:68,800,768-69,068,576,缺失片段总长 267 808 bp,包

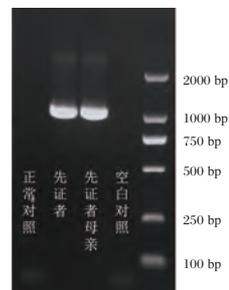


注:CMA 检测结果提示先证者 X 染色体存在约 267 kb 片段缺失(chrX:68,801,113-69,068,115),黑色带三角的矩形条代表缺失区域,对应的 SNP 探针信号缺失。

图 2 先证者染色体微阵列检测结果

Figure 2 Chromosomal Microarray Analysis result of the proband

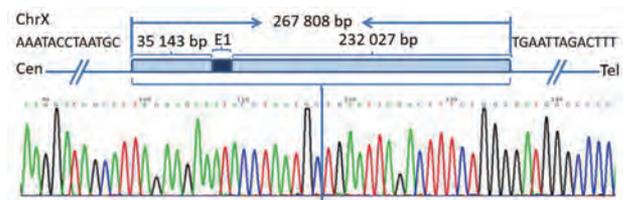
含了 *EDA* 基因上游 35 143 bp,第一外显子 638 bp 以及第一内含子区域的 232 027 bp(图 4)。



注:从左往右,第一泳道为正常对照,未扩增出相应的条带;第二泳道为先证者条带,PCR 片段长度为 1 061 bp;第三泳道为先证者母亲条带,PCR 片段长度为 1 061 bp;第四泳道为空白对照。

图 3 断点 PCR 检测电泳图

Figure 3 Electrophoretogram results of the breakpoint PCR detection



注:蓝色矩形框表示缺失区域,包含 *EDA* 基因第一外显子 E1(深蓝色矩形框)及其上游的 35 143 bp 和下游的 232 027 bp,缺失片段总长为 267 808 bp。断点两边的 DNA 序列分别是上游的 5'-AAATACCTATGC-3'和下游的 5'-TGAATTAGCTTT-3'。测序图的蓝色线条位置为断裂点。

图 4 *EDA* 基因缺失范围示意图和包含断点的 PCR 产物测序图

Figure 4 The diagram of the *EDA* gene deletion fragments and the PCR products sequencing result containing breakpoint

2.2 产前诊断结果

对胎儿绒毛DNA进行断裂位点PCR检测,未发现先证者的1 061 bp片段,同时对胎儿进行CMA检测,未发现异常。提示胎儿未遗传来自母亲的EDA基因第一外显子拷贝数缺失。胎儿分娩后随访结果,女婴,生长发育无异常,8个月大出牙2颗,头发生长正常。

3 讨论

少汗型外胚层发育不良(Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia, HED)的发病机制与编码皮肤附件分化相关信号通路上的基因突变有关,可导致牙齿发育不全或其他外胚层结构缺陷^[1, 3]。EDA基因包括8个外显子,编码391个氨基酸^[7],是HED最常见的致病基因,目前报道有200多个突变^[8],以编码区的单碱基突变居多^[9]。

近年来EDA基因CNV也有报道^[10-13]。本文利用高通量测序检测技术发现先证者EDA基因第一外显子编码区信号缺失,结合先证者典型的HED表型,提示EDA上游区域存在CNV可能。通过CMA检测提示存在大片段缺失,为寻找精确缺失范围,通过断点PCR扩增,发现先证者存在约267 kb的缺失片段,包含了EDA基因第一外显子及其上下游区域,遗传自母亲。该CNV使野生蛋白丢失了转录翻译起始区,推测无法正常产生野生型EDA蛋白。野生蛋白的破坏情况以及是否存在新的转录本需要更进一步的实验研究。有研究指出非等位基因同源重组和复制机制在解释多种生殖系和体细胞重排事件中发挥了重要作用^[14]。本实验发现该家系CNV断点上下游存在一些repeat masker序列,这些同源性较高的序列很可能是通过上述机制介导了CNV的发生。

本次实验明确先证者的可能致病原因及其母亲为携带者后,经过充分知情告知,对家系第三胎进行CMA和断裂位点PCR检测,未发现胎儿携带该缺失区域,胎儿出生后未见异常。该病表型严重的成年男性患者生存质量较差,少数EDA基因突变的女性携带者有轻微症状^[15]。本研究明确了先证者HED表型的病因,并且找到了缺失CNV的精确断裂位点,可以快速进行家系其他成员的检测,为先证者母亲提供了准确的遗传咨询和产前诊断信息,丰富了我国X连锁的HED患者EDA基因外显子的缺失数据库,为该疾病筛查、诊断和产前诊断提供遗传学参

考数据,并为可能的EDA基因第一外显子缺失的发生机制提供了研究基础。

参考文献

- [1] Reyes-Real J, Mendoza-Ramos MI, Garrido-Guerrero E, et al. Hypohidrotic ectodermal dysplasia: clinical and molecular review[J]. Int J Dermatol, 2018, 57(8): 965-972.
- [2] Wohlfart S, Hammersen J, Schneider H. Mutational spectrum in 101 patients with hypohidrotic ectodermal dysplasia and breakpoint mapping in independent cases of rare genomic rearrangements[J]. J Hum Genet, 2016, 61(10): 891-897.
- [3] Trzeciak WH, Koczorowski R. Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update[J]. J Appl Genet, 2016, 57(1): 51-61.
- [4] Bayes M, Hartung AJ, Ezer S, et al. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats[J]. Hum Molec Genet, 1998, 7(11): 1661-1669.
- [5] Kere J, Srivastava AK, Montonen O, et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein [J]. Nature Genet, 1996, 13(4): 409-416.
- [6] Srivastava AK, Pispá J, Hartung AJ, et al. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains[J]. Proc Nat Acad Sci, 1997, 94(24): 13069-13074.
- [7] 卢守义, 高清平, 张笑雨, 等. EDA基因在4个少汗型外胚层发育不全家系中的检测及分析[J]. 国际口腔医学杂志, 2017, 44(3): 288-293.
- [8] Sala-Alanis JC, Wozniak E, Mein CA, et al. Mutations in EDA and EDAR genes in a large Mexican Hispanic cohort with hypohidrotic ectodermal [J]. Ann Dermatol, 2015, 27(4): 474-477.
- [9] Güven Y, Bal E, Altunoglu U, et al. Turkish Ectodermal Dysplasia Cohort: From Phenotype to Genotype in 17 Families [J]. Cytogenet Genome Res, 2019, 157(4): 189-196.
- [10] 赵凯, 喻康, 王凤, 等. 外胚层发育不良患者基因突变分析及功能验证[J]. 上海口腔医学, 2019, 28(3): 268-274.
- [11] 黄祖洲, 张蓉, 韩萌萌, 等. 一个X连锁少汗型外胚层发育不良家系EDA基因突变分析[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(2): 244-248.
- [12] 梁如佳, 刘芳. 少汗型外胚层发育不良一家系EDA基因突变分析[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(9): 682-684.
- [13] Escoufflaire C, Rebours E, Charles M, et al. A de novo 3.8-Mb inversion affecting the EDA and XIST genes in a heterozygous female calf with generalized hypohidrotic ectodermal dysplasia[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 715.
- [14] Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, et al. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements [J]. Curr Opin Genet Dev, 2012, 22(3): 211-220.
- [15] Shen L, Liu C, Gao M, et al. Novel mutation of EDA causes new asymmetrical X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia phenotypes in a female[J]. J Dermatol, 2019, 46(8): 731-733.

子宫颈癌血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达与病理特征及预后的相关性分析

肖虹* 潘晓蕾 赵丽颖 谢苗

[摘要] 目的 探讨子宫颈癌血清人乳头瘤病毒(HPV-E7)、CD105、人类软骨糖蛋白3(YKL-40)水平表达与病理特征及预后的相关性。方法 选取2013年4月至2018年4月本院120例子宫颈癌患者作为观察组,另选取同期健康体检者52例作为对照组。比较两组血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达及与病理特征相关性,并分析血清各指标与预后关联性。结果 观察组血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);血清 HPV-E7 水平与子宫颈癌患者 TNM 分期、淋巴结转移、脉管浸润显著相关($P<0.05$);血清 CD105 水平与子宫颈癌患者肿瘤直径、淋巴结转移、脉管浸润显著相关($P<0.05$);血清 YKL-40 水平与子宫颈癌患者 TNM 分期显著相关($P<0.05$);随访1年,死亡者 HPV-E7、CD105、YKL-40 高表达率高于生存者($P<0.05$); HPV-E7、CD105、YKL-40 高表达者1年生存率低于低表达者($P<0.05$)。结论 血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 表达水平在子宫颈癌患者中增高,且其表达水平与宫颈癌病理特征和预后存在一定相关性。

[关键词] 子宫颈癌;人乳头瘤病毒 E7; CD105; 人类软骨糖蛋白3; 病理特征; 卡普兰-迈耶曲线

Correlation Analysis of Serum HPV - E7, CD105 and YKL - 40 Levels with Pathological Features and Prognosis in Cervical Cancer

XIAO Hong*, PAN Xiaolei, ZHAO Liying, XIE Miao

(Department of obstetrics and gynecology, Beijing university of Chinese medicine fangshan hospital, Beijing, China, 102400)

[ABSTRACT] Objective To explore the correlation between the expression of cervical cancer serum human papillomavirus (HPV) E7, CD105 and human cartilage glycoprotein 3 (YKL - 40) levels with pathological features and prognosis. Methods A total of 120 patients with cervical cancer from our hospital from April 2013 to April 2018 were selected as the observation group, in addition, 52 healthy people were selected as the control group during the same period. The serum levels of HPV-E7, CD105 and YKL-40 in the two groups were measured and compared, and the correlations between serum indicators and prognosis were analyzed. Results Serum HPV-E7, CD105, and YKL-40 levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). Serum HPV-E7 level was significantly related to TNM stage, lymph node metastasis, and vascular invasion in patients with cervical cancer ($P<0.05$). Serum CD105 level was significantly correlated with the tumor diameter, lymph node metastasis, and vascular invasion in patients with cervical cancer ($P<0.05$). Serum YKL-40 level was significantly related to the TNM stage of patients with cervical cancer ($P<0.05$). After one year follow-up, the high expression rates of HPV-E7, CD105, and YKL-40 in the deceased were higher than those in the surviving ($P<0.05$). The one-year survival rate of HPV-E7,

基金项目:北京中医药科技发展基金项目(JJ2018-17)

作者单位:北京中医药大学房山医院妇产科,北京 102400

*通信作者:肖虹, E-mail: xuxiu200800@163.com

CD105, and YKL-40 high-expression patients was lower than that of low-expression patients ($P<0.05$).

Conclusion Serum HPV-E7, CD105, YKL-40 expression levels increased in patients with cervical cancer, and their expression levels have a certain correlation with cervical cancer pathological features and prognosis.

[KEY WORDS] Cervical cancer; Human papilloma virus E7; CD105; Human cartilage glycoprotein 3; Pathological characteristics; Kaplan-Meier curve

流行病学调查显示,子宫颈癌患病人数居女性恶性肿瘤的第2位,我国每年新发病例约13万,占全球发病总人数的28.0%,近年来其发病率呈明显增长、年轻化趋势^[1-2]。子宫颈癌发病机制较为复杂,目前研究已证实, $\geq 90.0\%$ 的子宫颈癌是由高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)持续感染所致^[3],而高危型HPV持续感染会诱导HPV-E7蛋白表达上调,激活致癌过程^[4]。同时,相关研究显示,新生血管是实体肿瘤生长、浸润、转移的重要基础,可为肿瘤生长提供营养物质,促进肿瘤细胞扩散^[5],而CD105作为实体恶性肿瘤新生血管标志物,与肿瘤组织增殖、浸润、转移具有一定关联性^[6]。人软骨糖蛋白39(human cartilage glycoprotein 39, YKL-40)也已被证实成胶质细胞瘤、卵巢癌等多种恶性肿瘤细胞中呈异常高表达^[7]。然而关于血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平对子宫颈癌患者预后的预测价值仍需相关循证支持。为此,本研究尝试分析血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平在子宫颈癌患者中的表达及与病理特征、预后的相关性。详情如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2013年4月至2018年4月本院120例子宫颈癌患者作为观察组,另选取同期健康体检者52例作为对照组。其中观察组年龄45~68岁,平均 50.91 ± 2.59 岁;体质量45~61 kg,平均 53.93 ± 2.42 kg;肿瘤直径2.5~4.9 cm,平均 3.72 ± 0.35 cm;病理类型:104例鳞癌,16例非鳞癌;组织分化程度:38例高分化,82例中低分化;TNM分期:76例I~II期;44例III~IV期;淋巴结转移38例;脉管浸润50例;对照组:年龄43~65岁,平均 51.33 ± 2.70 岁;体质量44~60 kg,平均 54.15 ± 2.39 kg。两组基本资料(年龄、体质量)均衡可比($P>0.05$)。本研究经本院医学伦理委员会批准。

纳入标准:①观察组均经阴道镜检查或宫颈

活组织检查病理切片证实为子宫颈癌;②对照组未出现阴道流血、阴道排液等子宫颈癌相关临床表现;③两组临床资料完整,患者及家属均签署知情同意书。排除标准:①处于急性炎症期或淋巴系统疾病者;②近1周有止血、抗纤溶或抗凝药物使用史者;③合并肝肾等重要脏器器质性病变者;④重度失语症或精神行为异常者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

取3 mL空腹静脉血,离心12 min,3 000 r/min,分离血清,采用酶标仪以酶联免疫吸附法检测血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平,仪器购自北京亚欧德鹏科技有限公司(型号:DP-6100),试剂盒购自北京荣志海达生物科技有限公司,批号:国械注进20153403567,严格按照仪器、试剂盒说明书操作。

1.2.2 治疗方法

观察组均根据临床分期、淋巴结转移、浸润深度等病理特征选择合理、针对性治疗方案。

1.3 观察指标

①比较两组血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平。②分析血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平与子宫颈癌病理特征(年龄、浸润深度、病理类型、分化程度、肿瘤直径、TNM分期、淋巴结转移、脉管浸润)相关性。③随访1年,失访5例,生存者70例,死亡者45例,比较不同预后患者血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平表达。④根据随访1年后血清HPV-E7、CD105、YKL-40水平平均值分为高表达者与低表达者。分析HPV-E7、CD105、YKL-40高低表达的生存价值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件分析处理数据,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, KM)分析生存价值,以Log-rank检测,采用斯皮尔曼进行相关性分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平比较

观察组血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 1。

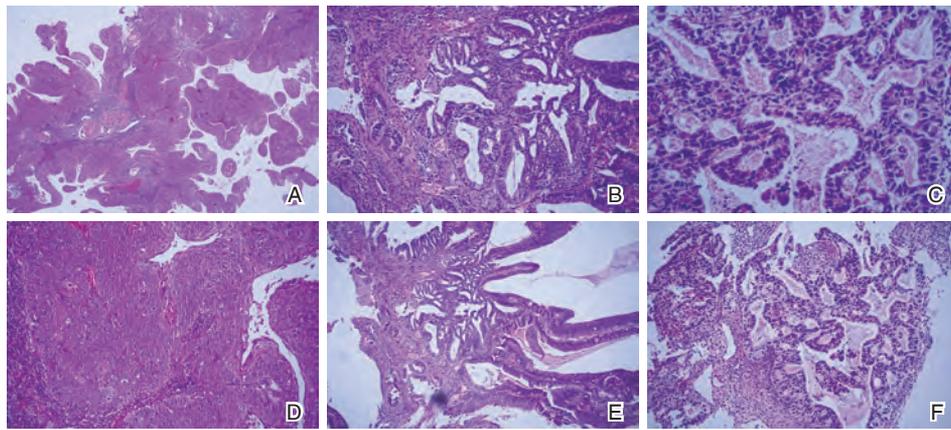
2.2 年龄和子宫颈癌病理特征与血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 的相关性

血清 HPV-E7 水平与子宫颈癌患者 TNM 分

表 1 两组血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum HPV-E7, CD105 and YKL-40 levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HPV-E7 (U/L)	CD105 (pg/mL)	YKL-40 (ng/mL)
观察组	120	43.74±7.28	78.32±9.14	194.38±52.69
对照组	52	24.92±2.84	25.33±3.62	74.51±25.37
t 值		18.032	40.402	15.620
P 值		<0.001	<0.001	<0.001



注:A为宫颈鳞状细胞癌(×10);B为宫颈腺癌(×10);C为宫颈腺癌(×10);D为宫颈鳞状细胞癌(×20);E为宫颈腺癌(×20);F为宫颈腺癌(×20)。

图 1 宫颈鳞状细胞癌及宫颈腺癌病理图(HE)

Figure 1 Pathological picture of cervical squamous cell carcinoma and cervical adenocarcinoma (HE)

期、淋巴结转移、脉管浸润显著相关($P < 0.05$);血清 CD105 水平与子宫颈癌患者肿瘤直径、淋巴结转移、脉管浸润显著相关($P < 0.05$);血清 YKL-40

水平与子宫颈癌患者 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),见表 2。

表 2 年龄和子宫颈癌病理特征与血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of age and cervical cancer pathological characteristics with serum HPV-E7, CD105, YKL-40

病理特征	n	HPV-E7 (U/L)	t 值	P 值	CD105 (pg/mL)	t 值	P 值	YKL-40 (ng/mL)	t 值	P 值	
年龄(岁)	<50 岁	59	42.15±7.41	2.025	0.045	79.84±9.02	1.844	0.068	182.69±50.12	2.312	0.023
	≥50 岁	61	45.28±9.37			76.85±8.74			205.69±58.41		
浸润深度	≤1/2	32	39.84±13.47	1.753	0.082	72.15±18.74	2.062	0.041	178.41±49.84	2.040	0.044
	>1/2	88	45.16±15.12			80.57±20.14			200.19±52.36		
肿瘤直径(cm)	≤4 cm	81	41.17±16.12	2.360	0.020	75.41±13.28	3.302	0.001	186.54±52.41	2.249	0.026
	>4 cm	39	49.08±19.27			84.36±15.14			210.66±60.17		
病理类型	鳞癌	104	44.15±9.41	1.248	0.215	78.67±9.31	1.053	0.295	196.28±55.41	0.974	0.332
	非鳞癌	16	41.08±7.26			76.05±8.98			182.03±47.82		
组织分化程度	高分化	38	41.12±7.41	2.240	0.027	73.25±15.37	2.298	0.023	175.26±56.74	2.411	0.017
	中低分化	82	44.95±9.25			80.67±16.93			203.24±60.19		
TNM 分期	I~II 期	76	34.89±11.25	9.245	<0.001	75.41±17.62	2.296	0.023	184.85±42.14	3.097	0.003
	III~IV 期	44	59.03±17.34			83.35±19.31			210.84±47.85		
淋巴结转移	有	38	67.85±19.41	14.477	<0.001	138.41±10.14	45.291	<0.001	209.41±50.16	2.329	0.022
	无	82	32.57±7.25			50.47±9.78			187.41±47.16		
脉管浸润	有	50	60.14±15.29	13.548	<0.001	132.85±9.74	46.378	<0.001	205.17±49.25	2.117	0.036
	无	70	32.03±6.98			53.06±8.97			186.67±45.69		

2.3 不同预后患者血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达

随访1年,失访5例。根据预后情况分为生存者、死亡者。死亡者 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平高于生存者差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.4 生存分析

KM 曲线分析,随访1年, HPV-E7、CD105、YKL-40 高表达者1年生存率低于低表达者($\chi^2_1=12.952, P_1=0.000, \chi^2_2=4.971, P_2=0.026, \chi^2_3=11.999, P_3=0.001$),见图2。

表3 不同预后患者血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 水平表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of serum HPV-E7, CD105 and YKL-40 in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HPV-E7(U/L)	CD105(pg/mL)	YKL-40(ng/mL)
生存者	70	28.41±7.26	45.62±8.69	175.69±47.25
死亡者	45	70.41±20.14	152.47±15.84	221.42±50.16
t 值		15.942	48.632	4.495
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

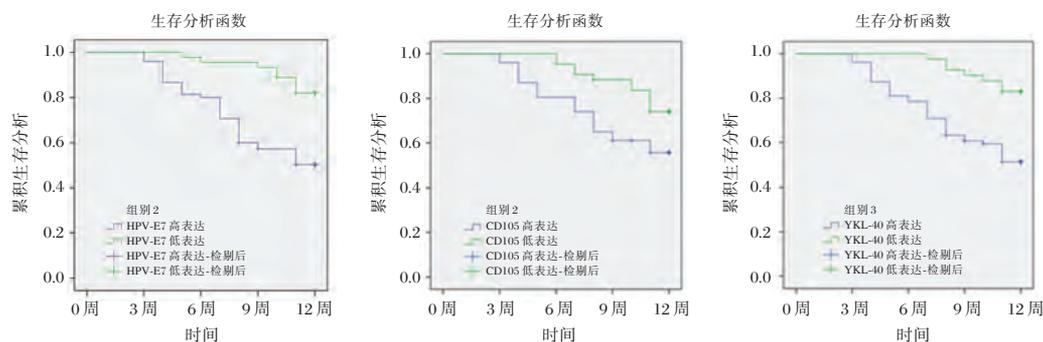


图2 生存曲线

Figure 2 Survival curve

3 讨论

研究认为,子宫颈癌是一个多因素、多基因、多环节参与的渐进过程^[8-9]。癌抗原 125、癌抗原 19-9、鳞状上皮细胞癌抗原等是既往临床针对子宫颈癌患者常用血清标志物^[10],但其灵敏度及特异度较差,难以提供有效指导。因此寻找新的血清指标,有助于为子宫颈癌治疗及防治提供新方向。

HPV-E7 水平上调一定程度会反馈刺激细胞增殖相关基因的表达,引发上皮细胞的细胞周期失衡,异常增殖癌细胞^[11-13]。通过 Spearman 相关性分析,HPV-E7 可逐渐上调 Notch 受体表达,导致子宫颈癌细胞系增殖,同时通过依赖 SIRT1 的 VEGF-Notch-Hes 信号,对血管生成发挥直接或间接调控作用,介导新生血管形成,参与子宫颈癌微环境形成,从而促进肿瘤生长,调控子宫颈癌 TNM 分期、淋巴结转移、脉管浸润,加速子宫颈癌恶

化。进一步经 Log-rank 检验表明,HPV-E7 水平上调会明显提高病死率,证实了血清 HPV-E7 水平可作为预测子宫颈癌患者生存状况的潜在有效指标。

CD105 是表达在血管内皮细胞表面上转化生长因子 β 家族受体蛋白,在肿瘤新生血管内皮细胞中过度表达^[15]。CD105 通过结合 III 型转化生长因子 β 受体,抑制转化生长因子 $\beta 1$ 在内皮细胞中的信号传导,增强内皮型一氧化氮合酶活性,迅速升高一氧化氮浓度,进而促进肿瘤细胞增殖相关基因表达,同时 CD105 高表达会阻断 TGF- β /ALK5 信号通路信号转导,异常增殖血管内皮细胞,加快新生血管生成,促使肿瘤组织血液供应转变为灌注供应,进而增加子宫颈癌患者肿瘤直径,促进淋巴结转移,加重脉管浸润,从而为肿瘤细胞侵袭、转移提供新途径。可见检测 CD105 表达可从某种角度判断肿瘤侵袭性,为子宫颈癌淋巴结转移、脉管浸润风险预测提供科学指导。进一步对比可知,

CD105 高表达率对子宫颈癌预后评估具有一定参考价值。

YKL-40 参与细胞增殖、分化、凋亡及血管内皮细胞重塑与迁移过程,有助于促进新生小血管生成^[16]。对比研究发现,血清 YKL-40 水平在肿瘤坏死因子- α 、核转录因子、白细胞介素 6 等调控下,通过细胞内外信号传导,可激活磷酸肌醇 3 激酶与有丝分裂蛋白激酶信号传导系统,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞有丝分裂、增殖、分化,提示 YKL-40 具有成为子宫颈癌新的肿瘤标志物的潜力,可为子宫颈癌临床分期提供循证支持。最后,通过 K-M 曲线进一步证实,血清 YKL-40 水平升高会增加子宫颈癌死亡风险,有力佐证了血清 YKL-40 可能作为子宫颈癌预后的有效独立预测因子,为临床对症治疗提供新靶点。

综上所述,血清 HPV-E7、CD105、YKL-40 表达水平在子宫颈癌患者中增高,且其表达水平与宫颈癌病理特征和预后存在一定相关性。

参考文献

- [1] 李萍萍,李斌,王亚婷,等.新辅助化疗对 I b2 和 II a2 术后无病理高危因素的子宫颈癌患者预后的影响[J].中华妇产科杂志,2018,53(4):248-256.
- [2] Cezar - Dos - Santos F, Ferreira RS, Okuyama NCM, et al. FOXP3 immunoregulatory gene variants are independent predictors of human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(8):2013-2025.
- [3] 何江耀,赵任龙,果海娜.HR-HPV 合并 UU 感染状况及与宫颈上皮内瘤变的相关性研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(4):262-267.
- [4] 顾青,赵艳.HPV E7 蛋白在宫颈疾病筛查中的临床意义[J].检验医学与临床,2019,16(6):762-764+767.
- [5] 耿彤瑶,贾世峰,李秀福,等.宫颈癌中 CD31+细胞源 VDR 的表达与血管生成的关系[J].中国妇幼保健,2019,34(5):1154-1157.
- [6] 严枫枫.灵芝胶囊对伴 HPV 感染宫颈癌患者肿瘤组织 CD105 蛋白及 miR-21 表达的影响[J].中国生化药物杂志,2017,37(3):131-134.
- [7] 陆衡.YKL-40 分子对卵巢癌 SKOV-3 细胞体外迁移能力和化疗敏感性的影响[D].山东大学,2017:1-81.
- [8] 中华预防医学会疫苗与免疫分会.子宫颈癌等人乳头瘤病毒相关疾病免疫预防专家共识(简版)[J].中华预防医学杂志,2019,53(12):1218-1235.
- [9] Yang YK, Xi WY, Xi RX, et al. MicroRNA-494 promotes cervical cancer proliferation through the regulation of PTEN [J]. Oncol Rep, 2015,33(5):2393-401.
- [10] Wongprate M, Ishida W, Phuthong S, et al. Genetic Polymorphisms of the Human Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and Cervical Cancer Susceptibility among Northeast Thai Women [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020, 21(1):243-2401.
- [11] Wang HY, Park S, Kim S, et al. Use of hTERT and HPV E6/E7 mRNA RT-qPCR TaqMan assays in combination for diagnosing high-grade cervical lesions and malignant tumors [J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143(3):344-351.
- [12] Peta E, Sinigaglia A, Masi G, et al. HPV16 E6 and E7 up-regulate the histone lysine demethylase KDM2B through the c-MYC/miR-146a-5p axis[J]. Oncogene, 2018,37(12):1654-1668.
- [13] 王家建,董婕,邓再兴,等.HPV E6、E7 mRNA 联合 HPV 16 型和 HPV 18/45 型分型检测作为子宫颈癌机会性筛查方法的探讨[J].中华妇产科杂志,2019,54(5):301-306.
- [14] Martinez LM, Labovsky V, Calcagno ML, et al. CD105 Expression on CD34-Negative Spindle-Shaped Stromal Cells of Primary Tumor Is an Unfavorable Prognostic Marker in Early Breast Cancer Patients [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0121421.
- [15] Qian H, Yang L, Zhao W, et al. A comparison of CD105 and CD31 expression in tumor vessels of hepatocellular carcinoma by tissue microarray and flow cytometry [J]. Exp Ther Med, 2018,16(4):2881-2888.
- [16] Wennström M, Surova Y, Hall S, et al. The Inflammatory Marker YKL-40 Is Elevated in Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer's but Not Parkinson's Disease or Dementia with Lewy Bodies [J]. PLoS One, 2015, 10(8):e0135458.

· 论 著 ·

不同基因型 HCV 感染患者重叠 HBV 或 HIV 感染的病毒学特征

彭亚柏 朱秀云 刘赛云 王敏 龙寿斌 程文兵 蔡侃儒 刘甲野*

[摘要] **目的** 评估重叠乙型肝炎病毒(HBV)或人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的丙型肝炎患者丙型肝炎病毒(RNA)病毒载量与单纯丙型肝炎患者的差异。**方法** 选取2017至2020年间本院1 292例行丙肝基因分型的慢性丙肝患者,以其中行HCV RNA及HBV和HIV检测的397例丙型肝炎患者为研究对象,应用罗氏Cobas TaqMan试剂,对HCV RNA进行测定,并用PCR-荧光探针法检测HCV基因分型。**结果** HCV基因型中1b型比例最高,3a型比例最低。HCV重叠HBV或HIV感染率分别为9.1%与6.3%,6a型重叠HBV感染发生率最高,3a型重叠HIV感染发生率最高。2a型未见重叠HBV或HIV感染病例。1b型未重叠HBV感染患者HCV RNA滴度显著高于重叠HBV感染患者($P<0.05$)。在1b型、6a型及3a型,未重叠HIV感染患者与重叠HIV感染患者,其HCV RNA的滴度差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 重叠HBV感染的1b型患者HCV RNA滴度会降低;重叠HIV感染的患者,HCV RNA滴度无变化。

[关键词] 乙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒;人体免疫缺陷病毒;重叠感染;病毒学特征

Virological characteristics of overlapping HBV or HIV infection in patients with different genotype HCV infection

PENG Yabai, ZHU Xiuyun, LIU Saiyun, WANG Min, LONG Shoubin, CHENG Wenbing, CAI Kanru, LIU Jiaye*

(Institute of Hepatology, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518112)

[ABSTRACT] **Objective** To assess the difference in viral load of HCV RNA in patients with hepatitis C who overlap HBV or HIV infection and patients with hepatitis C alone. **Methods** A total of 1 292 chronic hepatitis C patients with HCV genotyping in our hospital from 2017 to 2020 were selected, and 397 patients with hepatitis C who were tested for HCV RNA, HBV and HIV were selected as the research subjects. Roche Cobas TaqMan reagent was used to carry out the determination and detect the HCV genotyping by PCR-fluorescence probe method. **Results** Among HCV genotypes, the proportion of type 1b is the highest, and the proportion of type 3a is the lowest. HCV overlapping HBV or HIV infection rates were 9.1% and 6.3%, respectively. Type 6a overlapping HBV infection had the highest incidence, and type 3a overlapping HIV infection had the highest incidence. There was no overlapping HBV or HIV infection in type 2a. The HCV RNA titer of patients with type 1b non-overlapping HBV infection was significantly higher than that of patients with overlapping HBV infection ($P<0.05$). In type 1b, type 6a and type 3a, there was no statistically significant difference in HCV RNA titer between patients with non-overlapping HIV infection and patients with overlapping HIV infection ($P>0.05$). **Conclusions** HCV genotype 1b has a positive correlation with HCV RNA load for patients co-infection with HCV/HBV, and has not significant correlation with HCV RNA for patients co-infection with HCV/HIV.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; Hepatitis C virus; HIV Co-infection; Virological characteristics

基金项目:国家自然科学基金(81803299)

作者单位:深圳市第三人民医院肝病研究所,广东,深圳 518112

*通信作者:刘甲野, E-mail:liujiaye1984@163.com

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)和乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染慢性化程度高,可导致肝硬化和肝癌,是严重威胁人类健康的主要传染病^[1-4]。HBV与HCV存在相似的传播途径,所以HBV/HCV重叠感染较常见。同样的,HCV与HIV(Human immunodeficiency virus, HIV)两者共有的传播方式也容易造成这两种病毒共感染。有研究显示HCV和HBV均为嗜肝病毒,两者重叠感染后HCV RNA水平与单纯丙型肝炎患者无明显差异,但加速了肝脏疾病的进行性恶化,更易形成肝硬化和肝癌^[5-8]。但也有研究认为HCV和HBV重叠感染后也会存在相互抑制的现象^[9]。慢性HCV感染重叠HIV时,与单独HCV感染者相比,其血液中存在更高的HCV RNA滴度,HIV可促进HCV对肝脏的攻击,从而加速了肝细胞的损伤^[10],同时HCV/HIV重叠感染患者,其发生机会性感染及死亡率也高于未重叠感染HIV患者^[11]。HCV存在众多基因型,但不同基因型HCV发生HBV或HIV重叠感染时的病毒学特征研究较少。故本文拟研究不同基因型HCV重叠HBV或HIV感染时,HCV的病毒学特征。

1 对象和方法

1.1 一般资料

选取2017至2020年于本院就诊筛查HCV基因型的1292名患者,以其中既完成HCV RNA,又进行HBV和HIV检测的丙肝患者为研究对象,共入组397名符合条件的丙肝患者。所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:混合基因型感染;合并其他病毒性急性肝炎;排除同时合并HBV和HIV。本研究已通过本院伦理委员会批准通过。

1.2 方法

采用PCR荧光探针法(泰普生物科学有限公司)检测HCV基因分型,按照HCV基因分型检测试剂盒说明书中的标准判定分型结果。使用罗氏Cobas TaqMan试剂检测HCV RNA载量,同时依据检测试剂盒说明书中的标准判定结果。对于乙肝五项及HIV的检测,均使用酶联免疫法,根据要求判定阴性或阳性结果。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18软件进行数据分析,计数资料用n(%)表示,不符合正态分布的计数资料,用中位数、四分位距描述,采用中位数和(25%、75%分位

数)表示,统计分析采用 χ^2 检验或非参数检验,以中位数(25%、75%分位数)表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对所有进行基因分型检测的丙肝患者的基因型构成特点进行分析

2017至2020年期间筛选的1292名丙肝患者中,共检测出5种基因型,分别为1b型、6a型、2a型、3b型、3a型,其所占比例如图1。结果显示1b型比例最高,3a型比例最低,除2a型外,其余基因型中男性患者高于女性患者。

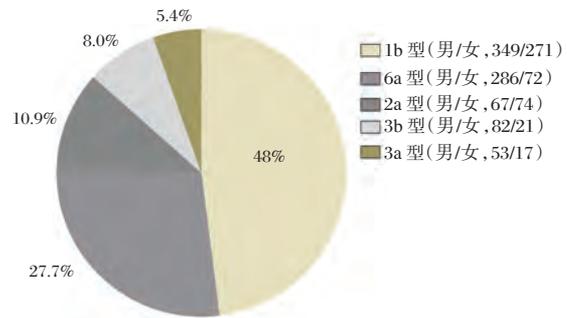


图1 检测的丙肝患者的基因型构成特点

Figure 1 Proportion of genotype in patients with Hepatitis C infection

2.2 对丙肝患者不同基因型中重叠HBV或HIV特征进行分析

符合入组的397例丙肝患者。丙肝重叠HBV或HIV感染率分别为9.1%(36/397)与6.3%(25/397)。见表1。

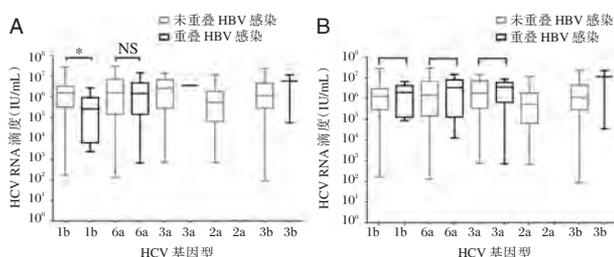
表1 丙肝患者不同基因型中HBV或HIV共感染率
Table 1 Prevalence of co-infection with HBV or HIV in Hepatitis C patients stratified by HCV genotype

基因型	n	重叠HBV比率	重叠HIV比率
1b	189	11(5.8)	9(4.8)
6a	110	22(20.0)	6(5.5)
2a	41	0(0.0)	0(0.0)
3b	31	2(6.4)	2(6.4)
3a	26	1(3.8)	8(30.8)
合计	397	33(9.1)	25(6.3)

2.3 分析重叠HBV或HIV感染后不同基因型的HCV病毒载量的变化

未重叠HBV感染与重叠HBV感染的1b型HCV RNA滴度的中位数(25%、75% IQR)分别为

1.55×10^6 (3.12×10^5 , 3.25×10^6) IU/mL 和 2.64×10^5 (6050 , 9.41×10^5) IU/mL, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相似的, 对于 6a 型, 其分别是 1.52×10^6 (1.44×10^5 , 7.11×10^6) IU/mL 和 1.48×10^6 (1.45×10^5 , 4.81×10^6) IU/mL, 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而对于 3a 型、3b 型、2a 型, 其重叠 HBV 感染的样本量少, 未进行统计。同样地, 未重叠 HIV 感染与重叠 HIV 感染的 1b 型 HCV RNA 滴度的中位数 (25%, 75% IQR) 分别为 1.27×10^6 (2.80×10^5 , 3.04×10^6) IU/mL 和 1.99×10^6 (1.28×10^5 , 4.26×10^6) IU/mL, 相似的, 对于 6a 型及 3a 型, 其分别是 1.46×10^6 (1.44×10^5 , 6.86×10^6) IU/mL 和 3.44×10^6 (1.29×10^5 , 8.08×10^6) IU/mL, 1.84×10^6 (3.48×10^5 , 7.31×10^6) IU/mL 和 3.60×10^6 (6.61×10^5 , 6.03×10^6) IU/mL。在 1b 型、6a 型及 3a 型, 未重叠 HIV 感染与重叠 HIV 感染, 其 HCV RNA 的滴度在两组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而对于 3b 型、2a 型, 由于其重叠 HIV 感染的样本量少, 未进行统计 (图 2)。



注: * $P < 0.05$; NS: 差异无统计学意义; A: 不同 HCV 基因型重叠 HBV 感染; B: 不同基因型重叠 HIV 感染。

图 2 重叠 HBV 或 HIV 感染后不同基因型的 HCV 病毒载量的差异

Figure 2 The difference of HCV viral load in different genotypes after superimposed HBV or HIV infection

3 讨论

HCV 是一种单股线性正链黄病毒^[12], 基因易变异, 目前至少可分为 6 个基因型及多个亚型, 其中 1 型、2 型、3 型、6 型是我国常见的四种 HCV 基因型。对于这些基因型还有不同亚型的存在, 我国以 1b 型、2a 型常见, 6a 型是我国南方地区流行的 HCV 主要亚型^[13]。不同基因型 HCV 病毒的致病力和对抗病毒治疗的反应不同, 而分析合并 HIV 或 HBV 的 HCV 感染者的基因型分布对于共感染者的 HCV 病毒学特征及抗病毒治疗可提供重要的依据。

付^[14]等人对广东省丙型病毒性肝炎的流行概况和流行特征中发现, 深圳市报告丙型肝炎病例数位于全省第三位。本研究显示深圳地区慢性 HCV 感染以 1b 及 6a 型为常见基因型, 慢性 HCV 感染者重叠 HBV 或 HIV 感染率对于不同基因型其重叠感染率不同。有研究显示虽然 HCV 1b 型最为常见, 但对于 HBV 易感性来说, 与其他基因型相比, 无明显易感性增强的表现。邓^[15]的一项研究显示, HCV 重叠 HIV 感染者与 HCV 感染者其感染的 HCV 基因型构成比存在差异, HCV/HIV 重叠感染中 HCV 基因型以 6a 型为主, 2a 型未见重叠感染。故 HCV 重叠感染 HBV 或 HIV 的基因型分布特点不同于 HCV 基因型分布特点。

HCV 与 HBV 在体内共存较常见, 均为嗜肝病毒, 有研究显示两者重叠感染后更易发生免疫系统紊乱, 这种改变可能表现为相互干扰或抑制现象^[6,9]。但合并感染时是否存在 HBV 对不同基因型 HCV 感染者病毒载量的影响鲜有报道^[9,16]。本研究发现重叠 HBV 或 HIV 感染后不同基因型的 HCV 病毒载量与单纯 HCV 感染组不同。丁^[17]的一项研究显示, HCV 重叠 HBV 感染者 HCV RNA 滴度与单纯 HCV 感染者的病毒载量无明显差异, 但是丁未对 HCV 感染者的不同基因型重叠感染 HBV 后进行分析。同时 Jamma^[18]应用新的细胞生物模型也显示出两种病毒在同一肝细胞内复制而互不影响, 进一步验证了丁的实验结果。但也有研究发现 HCV 对 HBV 存在抑制作用, 其强弱与 HCV 基因型有关, 表现出 1b 型强于基因 3a 和 1a 型^[19], 本研究未探讨 HCV 对 HBV 的作用。总之, 本研究发现对于不同 HCV 基因型, HBV 对 HCV 作用的表现形式也不一样。

HCV 和 HIV 共有的血液传播方式, 使两者发生重叠感染机会增加, 对于 HCV 重叠 HIV 感染后, HIV 对不同基因型 HCV 感染者病毒载量变化的研究甚少。但是此两项研究均未探讨对于不同 HCV 基因型重叠感染 HIV 后, HIV 是否表现为一样的作用。由于 HCV 基因型的分布存在地域差异, 不同地区的研究其 HCV 基因型分布特点不一样, 焦的研究是地区是中国北方, 本研究地是中国南方。本研究的主要不足为部分基因型样本量少, 无法进行统计计算, 未来需要全国范围各个区域的多中心研究来验证和补充我们的结论。

(下转第 886 页)

下调 lncRNA HCG18 靶向调控 miR-34a 影响口腔鳞癌 SCC4 细胞增殖、侵袭以及迁移的分子机制

丁延晶* 王立新 邱静怡 余日月

[摘要] **目的** 研究下调长链非编码 RNA(lncRNA)人类白细胞抗原复合体 18(HCG18)靶向调控 miR-34a 影响口腔鳞癌细胞增殖、侵袭以及迁移的分子机制。**方法** Realtime PCR 方法测定 HCG18 在口腔鳞癌 CAL27、SCC4、HB96 细胞和正常口腔黏膜 NOK 细胞中的表达变化。在口腔鳞癌 SCC4 细胞中转染 HCG18 shRNA, Realtime PCR 方法测定下调效果, MTT 测定各细胞增殖变化, Transwell 小室测定各细胞侵袭和迁移能力变化, Western blot 测定各细胞中 N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达变化。生物信息学软件发现 HCG18 与 miR-34a 可能互为靶向关系, 利用荧光素酶系统鉴定二者靶向关系。将 miR-34a inhibitor、inhibitor control 和 HCG18 shRNA 分别共转染到口腔鳞癌 SCC4 细胞中, 利用上述方法测定各细胞增殖、迁移和侵袭能力变化。**结果** HCG18 在口腔鳞癌 CAL27、SCC4、HB96 细胞中的表达水平高于正常口腔黏膜 NOK 细胞, 并且口腔鳞癌 SCC4 细胞中 HCG18 表达水平最高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。转染 HCG18 shRNA 可以下调口腔鳞癌 SCC4 细胞中 HCG18 表达水平, 降低细胞增殖、迁移和侵袭能力, 促进细胞中 E-cadherin 蛋白表达, 抑制细胞中 N-cadherin 蛋白表达。HCG18 靶向负调控 miR-34a 的表达。与共转染 inhibitor control 和 HCG18 shRNA 后的细胞相比, 共转染 miR-34a inhibitor 和 HCG18 shRNA 后的细胞增殖、迁移和侵袭能力升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 下调 HCG18 靶向调控 miR-34a 抑制口腔鳞癌 SCC4 细胞增殖、侵袭以及迁移。

[关键词] 口腔鳞癌; 迁移; HCG18; 增殖

Molecular mechanism of down-regulation of lncRNA HCG18 targeting miR-34a on proliferation, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma SCC4 cells

DING Yanjing*, WANG Lixin, QIU Jingyi, YU Riyue

(Department of Stomatology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing, China, 100038)

[ABSTRACT] **Objective** To study the molecular mechanism of down-regulation of lncRNA HCG18 targeting miR-34a on the proliferation, invasion and migration of OSCC cells. **Methods** The expression of HCG18 in CAL27, SCC4, HB96 cells and cells of normal oral mucosa NOK was determined by real time PCR. HCG18 shRNA was transfected into SCC4 cells, the down regulation effect was determined by real time PCR, MTT was used to detect the proliferation of each cell line, Transwell chamber was used to measure the invasion and migration of cells. Western blot was performed to determine the expression of N-cadherin and E-cadherin. Bioinformatics analysis revealed that HCG18 and miR-34a may have a targeting relationship with each other. Luciferase system was used to identify the targeting relationship between HCG18 and miR-34a. MiR-34a inhibitor, inhibitor control and HCG18 shRNA were co-transfected into Scc4 cells, the cell proliferation, migration and invasion were measured by the above methods. **Results** The expression level of HCG18 in

基金项目: 国家自然科学基金项目(81571814)

作者单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院口腔科, 北京 100038

*通信作者: 丁延晶, E-mail: bailijunyi@163.com

CAL27, SCC4, HB96 cells was higher than that in NOK cells in normal oral mucosa, and the highest in SCC4 cells. Transfection of HCG18 shRNA can down regulate the expression of HCG18 in oral squamous cell carcinoma SCC4 cells, reduce the ability of cell proliferation, migration and invasion, promote the expression of E-cadherin protein, and inhibit the expression of N-cadherin protein. HCG18 negatively regulates the expression of miR-34a. Compared with the cells co-transfected with inhibitor control and HCG18 shRNA, the cell proliferation, migration and invasion ability increased after co-transfected with miR-34a inhibitor and HCG18 shRNA, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Down-regulation of HCG18 targets miR-34a to inhibit the proliferation, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma SCC4 cells.

[KEY WORDS] Oral squamous cell carcinoma; Migration; HCG18; Proliferation

长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于 200 nt 的非编码 RNA, 其最初被人们认为没有生物学作用, 后续研究发现, lncRNA 参与调控基因印记、mRNA 剪切、表观遗传学等过程, 并且通过对基因多方面调控影响细胞的生长、转移^[1]。研究表明, lncRNA 与肿瘤的进展有关, 其异常表达往往与肿瘤转移程度等具有密切关系^[2]。lncRNA 人类白细胞抗原复合体 18 (human leucocyte antigen complex group 18, HCG18) 与多种疾病的病理进程有关^[3]。HCG18 在非小细胞肺癌等肿瘤中高表达, HCG18 表达上调与肿瘤患者的预后和转移有关, 下调 HCG18 可以抑制肿瘤的细胞恶性增殖和转移^[4]。miR-34a 是近些年来备受关注的 miR-34 家族成员, 其在肝癌、口腔癌等肿瘤中表达下调, 上调其表达可以抑制肿瘤细胞恶性表型^[5]。通过细胞转染的方法下调细胞中 HCG18 表达, 探讨下调 HCG18 对口腔鳞癌细胞增殖和迁移的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

口腔鳞癌 CAL27、HB96 细胞购自上海慧颖生物科技有限公司; miR-34a inhibitor、inhibitor control、HCG18 shRNA、HCG18 shRNA、miR-34a mimics、mimics control 均由上海吉玛制药技术有限公司构建合成; 口腔鳞癌 SCC4、HB96 细胞购自上海美轩生物科技有限公司; N-cadherin 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology; 正常口腔黏膜 (Normal Oral Keratinocyte, NOK) 细胞购自上海艾研生物科技有限公司; E-cadherin 抗体购自美国 Proteintech Group; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 HCG18 在口腔鳞癌细胞中的表达检测

采用 Realtime PCR 方法测定, 步骤如下: 收集口腔鳞癌 CAL27、SCC4、HB96 细胞和正常口腔黏膜 NOK 细胞, 提取细胞总 RNA, 提取方法按照 Trizol 操

作说明进行。逆转录反应体系为: 1 μ L 的 RT Enzyme Mix I、1 μ L 的 Random 6 mers、4 μ L 的 5 \times Prime Script Buffer、1 μ L 的 Oligo dT Primer, 最后添加 RNase-free H₂O 至 20 μ L。收集 cDNA, 用 SYBR 进行 PCR 反应, PCR 反应程序为: 预变性 (95 $^{\circ}$ C 30 s), 变性 (95 $^{\circ}$ C 5 s), 退火延伸 (60 $^{\circ}$ C 60 s), 一共 40 个循环。结果按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.3 细胞转染及下调效果测定

按照 Lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染。把转染 HCG18 shRNA 和 shRNA control 的细胞设置为 sh-HCG18 和 sh-NC 组, 把没有转染的细胞设置为 Control 组。细胞转染后 48 h, 用 Real-time PCR 方法测定 HCG18 表达, 步骤同 1.2。

1.4 下调 HCG18 对口腔鳞癌细胞增殖影响检测

采用噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 方法测定。

1.5 下调 HCG18 对口腔鳞癌细胞迁移和侵袭影响检测

采用 Transwell 小室测定, 侵袭实验前用基质胶包被, 迁移实验前省略包被步骤, 其余步骤相同, 简述如下: 以不含血清的细胞培养液将 Control、sh-NC、sh-HCG18 组细胞悬浮, 然后吸取 200 μ L 的细胞种植到小室的上室中, 同时在下室中加入 500 μ L 的含血清细胞培养液, 放在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。甲醇固定, 结晶紫染色。放在显微镜下随机选取 5 个视野计数细胞穿膜数目, 结果取平均值即为细胞侵袭或迁移数目。

1.6 下调 HCG18 对口腔鳞癌细胞中 N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达影响检测

采用 Western blot 方法测定, 步骤简述如下: 提取 Control、sh-NC、sh-HCG18 组细胞总蛋白, 每个孔内蛋白上样量均为 40 μ g; 电泳电压为 90 V 恒压电泳 0.5 h, 然后以 120 V 恒压电泳 2 h。将 NC 膜裁剪成与分离胶大小相同, 在 60 V 恒压条件下

转膜,转膜装置在4℃条件下进行,转膜时间设置为60 min。5%脱脂奶粉的封闭;一抗结合过夜;二抗孵育2 h。以电化学发光(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)方法显色。结果用mage J分析条带的OD值,把GAPDH作为内参。

1.7 HCG18靶基因预测以及鉴定

生物信息学软件(starbase)预测 HCG18 的靶基因,发现 miR-34a 与 HCG18 有互补结合位点。用荧光素酶报告系统鉴定靶向关系。分别将野生型(WT)和突变型(MUT)HCG18 荧光素酶报告载体与 miR-34a mimics 和 mimics control 共转染到口腔鳞癌细胞中,48 h后,检测其荧光素酶活性变化。WT 和 MUT 荧光素酶报告载体均由湖南丰晖生物科技有限公司构建。收集 Control、sh-NC、sh-HCG18 组细胞,U6 为内参,以 Realtime PCR 方法测定 miR-34a 表达变化,步骤同 1.2。

1.8 miR-34a inhibitor 对下调 HCG18 的口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭影响检测

在口腔鳞癌细胞中分别共转染 miR-34a inhibitor、HCG18 shRNA 和 inhibitor control、HCG18 shRNA,设置为 sh-HCG18+Anti-miR-34a、sh-HCG18+Anti-NC 组,按照 1.4、1.5、1.6 中方法测定细胞增殖、迁移、侵袭以及 N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达变化。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本 *t* 检验,多组比较采用方差分析,组间比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔鳞癌细胞和正常口腔细胞中 HCG18 表达差异

HCG18 在口腔鳞癌 CAL27、SCC4、HB96 细胞

中的表达水平均高于正常口腔黏膜 NOK 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 HCG18 在口腔鳞癌细胞和正常口腔黏膜细胞中 HCG18 表达差异比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of HCG18 expression in oral squamous cell carcinoma cells and normal oral mucosa cells ($\bar{x} \pm s$)

细胞	HCG18 水平
NOK	1.00±0.09
CAL27	1.69±0.12
HB96	2.41±0.23
SCC4	2.94±0.21
F 值	215.60
P 值	<0.001

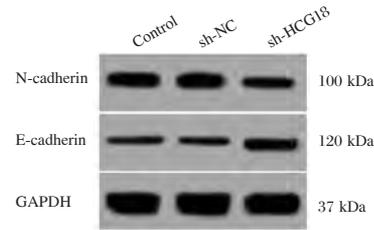


图 1 Western blot 测定 N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达
Figure 1 western blot analysis of the expression of N-cadherin and E-cadherin

2.2 HCG18 shRNA 对口腔鳞癌 SCC4 细胞增殖、侵袭和迁移影响

转染 HCG18 shRNA 后的口腔鳞癌 SCC4 细胞中 HCG18 表达水平降低,细胞增殖能力下降,细胞迁移以及侵袭数目均下降,细胞中 N-cadherin 蛋白表达水平下降,E-cadherin 蛋白表达水平升高。见图 1 和表 2。

2.3 HCG18 靶向调控 miR-34a

生物信息学软件预测 miR-34a 和 HCG18 结合位点,WT 和 miR-34a mimics 共转染后的口腔鳞癌 SCC4 细胞荧光素酶活性下降。见图 2 和表 3。HCG18 靶向调控 miR-34a。

表 2 细胞中 HCG18 表达、OD 值、迁移数目、侵袭数目以及 N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达差异比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of HCG18 expression, OD value, migration number, invasion number, N-cadherin and E-cadherin protein expression in cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	HCG18 水平	OD 值	迁移数目	侵袭数目	N-cadherin	E-cadherin
Control	1.00±0.10	0.46±0.05	128.64±10.24	102.48±9.63	0.60±0.06	0.27±0.04
sh-NC	0.99±0.09	0.45±0.07	129.47±11.86	101.82±10.39	0.59±0.05	0.29±0.03
sh-HCG18	0.33±0.03*	0.35±0.04*	92.28±6.52*	80.66±7.29*	0.31±0.04*	0.39±0.05*
F 值	209.50	11.11	42.27	16.39	95.03	22.32
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 sh-NC 比,* $P < 0.05$ 。

标志蛋白,其不仅可以保持细胞与细胞之间的完整连接,还可以抑制细胞侵袭和迁移能力,E-cadherin 具有抗肿瘤进展的作用^[15]。本次实验结果表明,下调 HCG18 后的口腔鳞癌细胞中 N-cadherin 表达水平降低,E-cadherin 表达水平升高,提示下调 HCG18 抑制口腔鳞癌细胞 EMT,进一步证实了下调 HCG18 具有抗口腔鳞癌转移的作用。

研究报道显示,lncRNA 作用机制较为复杂,其可以通过调控基因的转录而发挥多种生物学作用,并且同一个 lncRNA 可以同时调控多个靶基因^[16]。本次实验显示,HCG18 可以靶向负调控口腔鳞癌细胞中 miR-34a 的表达,HCG18 作用机制可能与 miR-34a 有关。miR-34a 基因定位在 1p36.23 染色体上,其功能缺失多见于白血病、乳腺癌等恶性肿瘤,miR-34a 通过靶向调控下游基因的表达影响细胞的侵袭、迁移^[17]。之前的研究表明,miR-34a 可以降低口腔鳞癌细胞的侵袭和迁移能力。

综上,下调 HCG18 在口腔鳞癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 中发挥抑制作用,其作用机制与靶向上调 miR-34a 的表达有关,目前对于 miR-34a 作用的下游机制还不明确。我们的实验结果为靶向基因治疗口腔鳞癌提供了参考,为研究 HCG18 在口腔鳞癌中的调控网络提供了资料。

参考文献

- [1] Chen F, Lin L, Liu F, et al. Three prognostic indexes as predictors of response to adjuvant chemoradiotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma after radical surgery: A large-scale prospective study [J]. *Head neck*, 2019, 41(2): 301-308.
- [2] Feng SQ, Zhang XY, Fan HT, et al. Up-regulation of LncRNA MEG3 inhibits cell migration and invasion and enhances cisplatin chemosensitivity in bladder cancer cells [J]. *Neoplasma*, 2018, 65(6): 925-932.
- [3] Xi Y, Jiang T, Wang W, et al. Long non-coding HCG18 promotes intervertebral disc degeneration by sponging miR-146a-5p and regulating TRAF6 expression [J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 13234-13242.
- [4] 曲宝亮,穆怀博,勾建强,等. lncRNA HCG18/miR-17-5p/HMGA2 分子轴调控非小细胞肺癌细胞增殖及迁移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(4): 409-416.
- [5] 葛昕,詹甜甜,高洁,等. miR-34a 通过下调 SATB2 抑制口腔鳞癌增殖、迁移和侵袭的初步研究 [J]. *口腔生物医学*, 2018, 9(1): 1-6, 16.
- [6] 王靖,张新萍,金虹,等. 长链非编码 RNA 作为竞争性内源 RNA 调控银屑病发展的机制研究 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2018, 24(2): 77-84.
- [7] 史俊英,王晔,陈文,等. GeXP 多重分析技术检测肝癌组织长链非编码 RNA 表达的实验研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(1): 9-16.
- [8] Liang K, Yang Y, Zha D, et al. Overexpression of lncRNA snaR is correlated with progression and predicts poor survival of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *J cell biochem*, 2019, 120(5): 8492-8498.
- [9] 陈思玉. 长链非编码 RNA HCG18 促进肝细胞肝癌发生发展 [D]. 郑州,郑州大学, 2019.
- [10] Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(5): 1016-1026.
- [11] Otsuki Y, Saya H, Arima Y. Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling [J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(3): 462-472.
- [12] Zare M, Bastami M, Solali S, et al. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT-involving miRNAs in breast cancer metastasis: diagnosis and therapeutic implications [J]. *J cell physiol*, 2018, 233(5): 3729-3744.
- [13] Nadanaka S, Kinouchi H, Kitagawa H. Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ β -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(2): 444-465.
- [14] Zhang XF, Zhang XQ, Chang ZX, et al. microRNA-145 modulates migration and invasion of bladder cancer cells by targeting N-cadherin [J]. *Mol med rep*, 2018, 17(6): 8450-8456.
- [15] Zhou Z, Zhang HS, Liu Y, et al. Loss of TET1 facilitates DLD1 colon cancer cell migration via H3K27me3-mediated down-regulation of E-cadherin [J]. *J cell physiol*, 2018, 233(2): 1359-1369.
- [16] Zhao L, Kong H, Sun H, et al. LncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448 [J]. *J cell physiol*, 2018, 233(5): 4044-4055.
- [17] Balatti V, Tomasello L, Rassenti LZ, et al. MiR-125a and MiR-34a expression predicts Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia patients [J]. *Blood*, 2018, 132(20): 2179-2182.

· 论 著 ·

心外科ICU患者术后感染血清降钙素原、PSGL-1、sICAM-1与心肌肌钙蛋白I的变化及意义

赵俊娅* 王珂 乔博 张阳

【摘要】目的 探讨心外科ICU患者术后感染血清降钙素原(PCT)、P-选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)、可溶性细胞间粘附因子-1(sICAM-1)与心肌肌钙蛋白I(cTnI)的变化及意义。方法 选取本院2016年1月至2019年3月心外科ICU患者108例,根据术后是否发生感染分为感染组37例、未感染组71例,另选择同期健康体检者48例作为对照组。比较3组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平,Logistic回归分析心外科ICU患者术后感染的影响因素,Pearson相关性分析血清PCT、PSGL-1、sICAM-1与cTnI关联性,对比感染组不同预后患者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平,受试者工作特征(ROC)曲线分析各血清因子对预后的预测价值,采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。结果 感染组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平高于未感染组、对照组差异有统计学意义($P<0.05$);合并基础性疾病、血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI是心外科ICU患者发生术后感染的独立危险因素($P<0.05$);血清PCT、PSGL-1、sICAM-1与cTnI呈正相关($P<0.05$);感染第3、5天生存者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平低于死亡者($P<0.05$);感染第5d cTnI预测心外科ICU患者术后感染预后的AUC值最大,为0.804;随访28d,血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI低危组、高危组的生存曲线对比,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 心外科ICU患者术后感染会引起血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI异常表达,且表达水平与感染发生发展及预后有一定相关性,临床可通过监测上述血清因子表达超早期予以干预治疗,以改善预后。

【关键词】心外科ICU;降钙素原;P-选择素糖蛋白配体1;可溶性细胞间粘附因子-1;心肌肌钙蛋白I

Changes and significance of serum procalcitonin, PSGL - 1, sICAM - 1 and cardiac troponin I levels in patients with ICU after cardiac surgery

ZHAO Junya*, WANG Ke, QIAO Bo, ZHANG Yang

(Department of Sensory Control Management, Henan Chest Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450008)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the serum levels of procalcitonin (PCT), P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), soluble intercellular adhesion factor-1 (sICAM-1), and postoperative infection in patients with cardiac surgery in ICU, and changes and significance of cardiac troponin I (cTnI). Methods From January 2016 to March 2019, 108 patients with ICU were selected from our hospital. According to whether postoperative infection occurred, they were divided into 37 cases in the infected group and 71 cases in the non-infected group, and 48 healthy patients in the same period as the control group. The serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, and cTnI levels of the three groups were compared. Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of postoperative infection in patients with cardiac surgery ICU. The serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, and cTnI levels of patients with different prognosis in the infected group were compared. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive value of

基金项目:河南省医学科技攻关计划省部共建项目(2018010037)

作者单位:河南省胸科医院感控管理科,河南,郑州450008

*通信作者:赵俊娅, E-mail: zhanjinper@163.com

each serum factor for prognosis, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** Serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, cTnI levels in the infected group were higher than those in the uninfected group and the control group ($P<0.05$). Combining basic diseases, serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, and cTnI were independent risk factors for postoperative infection in cardiac surgery in ICU patients ($P<0.05$). Serum PCT, PSGL-1, sICAM-1 were positively correlated with cTnI ($P<0.05$). Serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, and cTnI levels of survivors on the 3rd and 5th day of infection were lower than those who died ($P<0.05$). On the 5th day of infection, cTnI predicted the maximum AUC value of cardio-surgical infection prognosis after ICU patients, which was 0.804. After 28 days of follow-up, the differences in the survival curves of serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, and cTnI in the low-risk group and the high-risk group were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Postoperative infection in patients with cardiac surgery in ICU will cause abnormal expression of serum PCT, PSGL-1, sICAM-1, cTnI, and the expression level has a certain correlation with the development and prognosis of infection. Clinical intervention can be carried out by monitoring the serum factor expression in the early stage to improve the prognosis.

[KEY WORDS] ICU of Cardiac Surgery; Procalcitonin; P-selectin glycoprotein ligand 1; Soluble intercellular adhesion factor-1; Cardiac troponin I

心外科 ICU 患者受手术创伤、有创支持治疗等多种因素影响,生理屏障受到破坏,极易诱发院内感染,同时缺血/再灌注损伤、内毒素移位会增加感染鉴别困难程度,制约抗感染治疗^[1]。因此,完善心外科 ICU 患者术后感染早期预警机制迫在眉睫。心肌肌钙蛋白 I (Cardiac troponin I, cTnI) 是临床评估心肌损伤、心肌炎性疾病病情程度、预后的敏感性指标,但其特异性差^[2]。降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 是临床监测寄生虫感染、脓毒症病情特异性指标^[3]; P-选择素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 是一种启动并维持炎症状态重要因子,内皮细胞表面表达后可促使血流内多形核粒细胞在内皮上移位介导内皮损伤^[4]; 可溶性细胞间粘附因子-1 (Soluble intercellular adhesion factor-1, sICAM-1) 是被炎症反应激活的血管内皮细胞生成分泌的一种细胞因子,其表达水平与炎症反应关系密切。近年有部分学者对心脏外科术后重症患者、感染性发热患者研究发现,此类患者普遍存在外周血 PCT、PSGL-1、sICAM-1 异常表达情况,可能通过某种信号通路介导感染性疾病的发生发展^[5]。基于此,本研究首次分析心外科 ICU 患者术后感染血清 PCT、PSGL-1、sICAM-1 与 cTnI 的变化及意义,旨在为临床完善早期监测机制提供循证依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2016 年 1 月至 2019 年 3 月心外科

ICU 患者 108 例,根据术后是否发生感染分为感染组 37 例、未感染组 71 例。另选取同期健康体检者 48 例作为对照组。对照组男 28 例,女 20 例,年龄 (58.16 ± 4.35) 岁,体质指数 (21.92 ± 1.37) kg/m^2 ,感染组肺部感染 22 例,切口感染 15 例,其中革兰阳性菌感染 14 例,革兰阴性菌感染 23 例,3 组年龄、性别、体质指数等基础资料比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$) 均衡可比。见表 1。

表 1 一般资料比较 [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

Table 1 Comparison of General information [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

资料	感染组 ($n=37$)	未感染组 ($n=71$)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	58.03 ± 4.68	57.89 ± 4.71	0.147	0.883
性别(男/女)	21/16	41/30	0.010	0.921
体质指数 (kg/m^2)	22.01 ± 1.56	21.89 ± 1.48	0.393	0.695
术前 APACHE-II 评分(分)	18.16 ± 0.89	18.09 ± 0.90	0.385	0.701
手术类别				
冠状动脉搭桥术	9(24.32)	17(23.94)		
瓣膜手术	20(54.05)	39(54.93)	0.031	0.999
主动脉术	4(10.81)	7(9.86)		
心包术	4(10.81)	8(11.27)		
手术时间(h)	2.64 ± 0.49	2.58 ± 0.45	0.638	0.525

纳入标准:①均入住心外科 ICU;经实验室检测确诊;②入组前未接受抗感染、免疫制剂治疗;③家属知情同意并签署同意书。排除标准:①非心外科 ICU 患者;②术前已明确感染史者;③伴自身免疫系统疾病者;④濒死状态患者;⑤伴恶性肿瘤疾病患者。本研究经医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

①术后处理措施:均常规予以抗感染、呼吸支持、营养支持等综合治疗,观察组确诊感染后均结合药敏实验予以针对性治疗。②入ICU即刻及感染组感染时、感染第3、5天以非抗凝管取肘静脉血2 mL,离心9 min(半径8 cm,转速3 500 r/min)取血清,采用全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,BS-220型)以酶联免疫法测血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI表达。试剂、试剂盒均为仪器配套提供,相同资深专科医师规范完成。

1.3 观察指标

对比3组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平。分析心外科ICU患者术后感染的影响因素。分析血清PCT、PSGL-1、sICAM-1与cTnI相关性。随访28 d,统计预后情况,分为生存与死亡,其中死亡的定义为感染而致全因死亡,对比不同预后患者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平。分析血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI对心外科术

后ICU患者感染预后的预测价值。

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件统计分析数据。计数资料以 $n(\%)$ 表示,两组间比较采用 χ^2 检验。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 t 检验,多组间比较用方差分析。以Pearson分析进行指标间相关性检验。以受试者工作特征(ROC)曲线分析血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平的预测价值。采用Kaplan-Meier生存模型+Logrank检验进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平比较

感染组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平高于未感染组、对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

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

Table 2 Comparison of serum PCT, PSGL-1, sICAM-1 and cTnI levels between the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PCT($\mu\text{g/L}$)	PSGL-1(U/mL)	sICAM-1(ng/mL)	cTnI(U/mL)
感染组	37	32.38 \pm 5.10	376.03 \pm 32.25	565.14 \pm 74.29	7.30 \pm 2.02
未感染组	71	10.27 \pm 1.86	232.16 \pm 20.43	487.21 \pm 58.05	2.35 \pm 1.03
对照组	48	0.22 \pm 0.06	204.17 \pm 18.23	119.02 \pm 27.46	0.18 \pm 0.05
<i>F</i> 值		2603.476	862.466	1779.138	674.703
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 心外科ICU患者术后感染的影响因素

建立非条件Logistic回归模型,合并基础性疾病、血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI是心外科

ICU患者发生术后感染的独立危险因素($P < 0.05$, $OR \geq 1$),见表3。

表3 心外科ICU患者术后感染的影响因素

Table 3 Influencing factors of postoperative infection in ICU of cardiac surgery

因素	赋值说明	β	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i> 值	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95%置信区间
合并基础性疾病	1=有,0=无	0.863	0.338	6.512	0.010	2.370	1.222~4.598
PCT	1= ≥ 20 ,0=否	1.082	0.409	7.011	0.008	2.951	1.325~6.574
PSGL-1	1= ≥ 250 ,0=否	0.787	0.216	13.238	0.000	2.197	1.438~3.357
sICAM-1	1= ≥ 500 ,0=否	0.220	0.106	4.331	0.037	1.246	1.013~1.533
cTnI	1= ≥ 4 ,0=否	1.493	0.440	11.510	0.000	4.449	1.878~10.538

2.3 感染组不同预后患者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平

不同预后患者在感染时(感染前)血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平无明显差异($P > 0.05$);感染第3、5天生存者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平低于死亡者($P < 0.05$),见

表4。

2.5 感染组血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI对预后预测价值

ROC曲线分析感染第3、5天,结果显示:感染第5天cTnI预测心外科ICU患者术后感染预后的AUC值最大,为0.804。见表5。

表4 不同预后患者血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of serum PCT, PSGL-1, sICAM-1 and cTnI levels in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

时间	类别	n	PCT($\mu\text{g/L}$)	PSGL-1(U/mL)	sICAM-1(ng/mL)	cTnI(U/mL)
感染前	生存者	23	32.71 \pm 4.66	375.28 \pm 30.19	563.91 \pm 72.15	7.22 \pm 1.57
	死亡者	14	31.84 \pm 5.02	377.26 \pm 31.47	567.16 \pm 70.30	7.43 \pm 1.38
	t值		0.535	0.190	0.134	0.412
	P值		0.596	0.850	0.894	0.683
感染第3天	生存者	23	23.27 \pm 5.66	330.14 \pm 38.25	512.22 \pm 41.59	5.01 \pm 1.60
	死亡者	14	28.91 \pm 6.20	369.10 \pm 40.28	554.81 \pm 46.20	6.96 \pm 2.04
	t值		2.836	2.946	2.898	3.239
	P值		0.008	0.006	0.006	0.003
感染第5天	生存者	23	16.20 \pm 5.39	273.26 \pm 42.10	472.73 \pm 40.27	3.24 \pm 1.08
	死亡者	14	27.06 \pm 9.02	338.19 \pm 65.03	540.06 \pm 68.11	6.31 \pm 2.09
	t值		4.601	3.697	3.793	5.901
	P值		<0.001	0.001	0.001	<0.001

表5 ROC分析结果

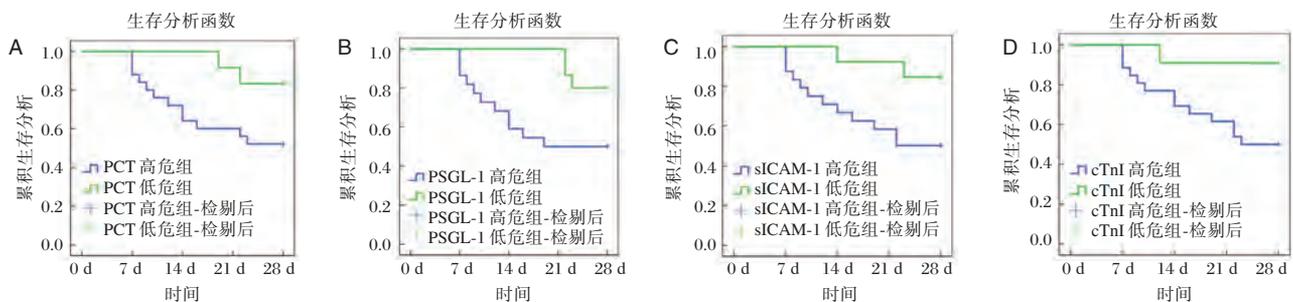
Table 5 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
感染第3天 PCT	0.720	0.549~0.855	2.426	>28.34 $\mu\text{g/L}$	71.43	73.91	0.015
感染第3天 PSGL-1	0.689	0.516~0.831	2.068	>330.50 U/mL	92.86	43.48	0.039
感染第3天 sICAM-1	0.745	0.576~0.874	2.826	>543.67 ng/mL	64.29	82.61	0.005
感染第3天 cTnI	0.736	0.566~0.867	2.580	>6.80 U/mL	57.14	86.96	0.010
感染第5天 PCT	0.789	0.624~0.905	3.830	>22.09 $\mu\text{g/L}$	64.29	82.61	<0.001
感染第5天 PSGL-1	0.770	0.603~0.892	3.066	>304.04 U/mL	71.43	86.96	0.002
感染第5天 sICAM-1	0.792	0.627~0.907	3.390	>490.97 ng/mL	85.71	73.91	0.001
感染第5天 cTnI	0.804	0.641~0.916	3.786	>5.78 U/mL	71.43	82.61	<0.001

2.5 感染组患者的生存分析

随访28 d,获取感染组各患者的生存资料。再根据ROC曲线最佳截断值分为低危组、高危组,建立Kplan-Meier乘积限模型。经Logrank检验,血

清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI低危组、高危组的生存率对比,差异均有统计学意义($\chi^2_1=3.426, P_1=0.044; \chi^2_2=4.112, P_2=0.040; \chi^2_3=4.585, P_3=0.032; \chi^2_4=4.972, P_4=0.026$)。Kplan-Meier生存曲线见图1。



注:A为PCT生存曲线, B为PSGL-1生存曲线, C为sICAM-1生存曲线, D为cTnI生存曲线。

图1 生存曲线

Figure 1 survival curve

2.6 血清PCT、PSGL-1、sICAM-1与cTnI相关性

Pearson相关性分析,血清PCT、PSGL-1、sI-

CAM-1与cTnI呈正相关($r=0.847、0.749、0.435, P<0.05$)。

3 讨论

心外科ICU患者需继续辅助呼吸机、有创监测支持等,内脏器官屏蔽能力减弱所致内毒素入血会诱发机体炎症瀑布效应,加重病情^[6]。

多数学者已证实,PCT被公认为鉴别细菌感染或病毒感染的可靠性指标^[7-8]。目前有关PCT在机体中具体反应机制、生物学效应尚未明确,可能的生物学效应为趋化因子作用、炎性因子刺激作用、抗炎作用、保护作用等。动物实验证实,PCT可能属次级炎症因子,其本身不直接介导启动脓毒血症过程,但可能会放大,加重脓毒血症病理过程^[9]。推测心外科ICU患者受手术创伤、炎症因子刺激等作用,激活PCT mRNA转录,发挥抗炎保护作用,但机体调节系统异常,PCT过表达会加重病理损害,增加病原菌易感性,成为机体保护的危险因素。

sICAM-1、PSGL-1均为细胞黏附分子家族相关因子,主要参与调节机体细胞粘附作用,其异常表达可反映某些疾病状态指征。sICAM-1主要分布在中性粒细胞表面,当机体出现炎症反应后可与淋巴细胞功能相关抗原-1配体结合,促使中性粒细胞紧密粘附内皮细胞并聚集向炎症部位发挥炎症保护作用,其外周血表达升高说明机体炎症反应活跃。学者褚爱娟等^[10]研究显示,冠心病患者感染幽门螺杆菌后血清sICAM-1表达异常升高,幽门螺杆菌可能通过激活sICAM-1表达加重冠状动脉内中炎症反应。PSGL-1主要分布于白细胞表面,是P-选择素(PS)配体,二者结合后可形成血小板-白细胞聚集体(PLA),刺激炎症反应,已有研究证实,PS能促进血流内多形核粒细胞与内皮细胞黏附,损害内皮完整性^[11]。由此可知,PS是启动炎症反应,维持炎症状态的主要成分,而PS需与PSGL-1结合发挥生物学效应。

综上所述,心外科ICU患者术后感染会引起血清PCT、PSGL-1、sICAM-1、cTnI异常表达,且表达水平与预后感染发生发展及预后关系密切。但

本研究未对不同病原体感染情况进行研究,需后期进一步探讨。

参考文献

- [1] Hatachi T, Tachibana K, Inata Y, et al. Risk Factors for Healthcare-Associated Infections After Pediatric Cardiac Surgery[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2018, 19(3):237-244.
- [2] Alvarado-Socarrás JL, Manrique-Hernández EF. Cardiac Troponin-T as a Marker of Myocardial Dysfunction in Term Neonates with Perinatal Asphyxia: Correspondence [J]. *Indian J Pediatr*, 2019, 86(8):766-767.
- [3] 熊梦然,陈雷,王丽纯,等. 肾上腺髓质素前体(proADM)对脓毒症的早期诊断作用[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(2):229-232.
- [4] 刘蕾蕾,华玮,居培红,等. 脓毒症患者血清中白细胞介素-6和降钙素原表达及其临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(6):527-530.
- [5] 王郝,崔娜,牛芳,等. 降钙素原对心脏外科术后重症患者感染的早期预测价值[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(10):897-901.
- [6] Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, et al. Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(9):1308-1318.
- [7] Karagiannis AK, Giris-Fragkoulakis C, Nakouti T. Procalcitonin: A New Biomarker for Medullary Thyroid Cancer? A Systematic Review [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(8):3803-10.
- [8] Park BS, Kim SE, Park SH, et al. Procalcitonin as a potential predicting factor for prognosis in bacterial meningitis [J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 36(1):129-133.
- [9] Choe EA, Shin TG, Jo IJ, et al. The Prevalence and Clinical Significance of Low Procalcitonin Levels Among Patients With Severe Sepsis or Septic Shock in the Emergency Department [J]. *Shock*, 2016, 46(1):37-43.
- [10] 褚爱娟,楼亚玲,翁丹丹,等. 冠心病患者幽门螺杆菌感染与血清 Ghrelin、同型半胱氨酸水平的相关性研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(3):309-311.
- [11] 明凯华,雷秀霞,邹愉,等. 中国广东地区汉族人群 P 选择素糖蛋白配体-1 Met62Ile 基因多态性与冠心病的相关性探讨 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(4):237-241.

外周血与骨髓组织髓系来源抑制细胞在多发性骨髓瘤患者诊断中的价值比较

张睿婷^{1*} 方霁² 周雅莹³ 周继豪¹ 刘应达⁴

[摘要] **目的** 比较不同来源髓系来源抑制性细胞(MDSCs)在多发性骨髓瘤(MM)患者中的诊断价值。**方法** 收集本院2018年1月至2019年6月符合诊断标准的MM患者31例作为研究对象,分别取外周血(PB)及骨髓(BM)组织进行流式细胞术分选,MDSCs表型为CD11b^{dim}CD14⁻;CD15⁺CD33⁺细胞为G-MDSC亚群,CD15⁻CD33⁺细胞为M-MDSC亚群。比较这两种来源的M-MDSC、G-MDSC纯度。**结果** PB组M-MDSC%(0.062±0.022)显著低于BM组(0.291±0.093),差异具有统计学意义($P=0.0223$);G-MDSC%与Total MDSC%两组差异均无统计学意义($P>0.05$)。外周血标本分群较为理想;骨髓组织标本G-MDSC占比大,其中混杂大量早期粒细胞的干扰,特异性低,不利于分析。**结论** MM患者外周血来源的M-MDSC较骨髓来源更具诊断价值。

[关键词] 髓系来源抑制性细胞;多发性骨髓瘤;外周血;骨髓组织;诊断

Comparison of the value of myeloid-derived suppressor cells from peripheral blood and bone marrow in the diagnosis of multiple myeloma

ZHAGN Ruiting^{1*}, FANG Ji², ZHOU Yaying³, ZHOU Jihao¹, LIU Yingda⁴

(1. Department of Hematology, Shenzhen People's Hospital, 2nd Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong, China, 518020; 2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China, 510530; 3. Laboratory of Clinical Medicine Research Center, Shenzhen People's Hospital, 2nd Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong, China, 518020; 4. Department of Gastroenterology, Guangzhou Overseas Chinese Hospital, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the diagnostic value of myeloid-derived inhibitory cells (MDSCs) from multiple sources in patients with multiple myeloma (MM). **Methods** A total of 31 MM patients who met the diagnostic criteria in our hospital from January 2018 to June 2019 were collected as research objects. Peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) were collected for flow cytometry sorting. The phenotype of MDSCs was CD11b^{dim}CD14⁻, CD15⁺CD33⁺ cells were G-MDSC subpopulation, and CD15⁻CD33⁺ cells were M-MDSC subpopulation. The purity of MDSCs from these two sources was compared. **Results** M-MDSC% (0.291±0.093) in BM group was significantly higher than that in PB group (0.062±0.022), and the difference was statistically significant ($P=0.0223$). There was no statistically significant difference between G-

基金项目:国家自然科学基金项目(81803802);深圳市卫生计生系统科研项目(SZXJ2017036)

作者单位:1. 深圳市人民医院血液科,广东,深圳 518020

2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院公共健康研究所,广东,广州 510530

3. 深圳市人民医院临床医学研究中心实验室,广东,深圳 518020

4. 暨南大学附属第一医院,广东,广州 510630

*通信作者:张睿婷, E-mail:9002357@qq.com

注:张睿婷与方霁为共同第一作者

MDSC and Total MDSC% ($P>0.05$). Peripheral blood specimens are ideal for grouping. Bone marrow tissue specimens have a large proportion of G-MDSC, which is intermixed with a large number of early granulocytes and has low specificity, which is not conducive to analysis. **Conclusion** M-MDSC % from peripheral blood of MM patients has more diagnostic value than that from bone marrow.

[KEY WORDS] Myeloid-derived suppressor cells; Multiple myeloma; Peripheral blood; Myeloid tissue; Diagnosis

多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)是一种以贫血、骨破坏、高免疫球蛋白与低白蛋白血症为主要特征的克隆性浆细胞异常增殖性疾病,占所有血液肿瘤的10%,肿瘤微环境在维持骨髓瘤细胞增殖、诱导耐药、协助免疫逃逸等多个方面发挥了重要作用^[1],这是导致其治疗效果不理想的一个重要因素。近年来,髓系来源抑制细胞(Myeloid Derived Suppressive Cells, MDSCs)在MM肿瘤微环境中的作用引起广泛关注^[1]。目前认为MDSCs是源于髓系干祖细胞的一群幼稚细胞,在人体内以CD33+/CD11b+/Lin-/HLA-DR-为标志^[2]。2010年Brimnes^[2]等发现MM患者发病时外周血MDSC明显增多,首次提示MDSCs可能参与MM发病。MDSCs在肿瘤微环境中不仅直接涉及免疫抑制效应,还可以非免疫方式间接促进MM的发生发展。外周血中,MDSCs一方面使CD8+T细胞丧失对抗原刺激的免疫反应;另一方面通过影响T细胞周期,并下调成熟T细胞表面TCR受体数量,诱导T细胞失能(Anergy)^[3]。然而,MDSCs及其亚群在外周血与骨髓组织中的占比差异以及对疾病诊断的价值目前仍缺乏相关证据,因此,探讨外周血与骨髓组织来源MDSCs的数量及纯度差异,对MM诊断的灵敏度具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

病例筛选:经病理活检或骨髓穿刺诊断明确的初发或复发MM患者入组。纳入标准:初诊或复发活动性MM患者,需符合如下指标中至少2项(必须包含第2项):①骨髓中浆细胞大于15%并有原浆或幼浆细胞,或组织活检证实为浆细胞瘤;②血清单克隆免疫球蛋白(M蛋白)IgG大于35、20、15、2 g/L;IgE大于2 g/L;尿中单克隆免疫球蛋白(本周蛋白)大于1 g/24 h;③广泛骨质疏松和/或溶骨病变。排除标准:髓外浆细胞瘤、意义未明的

单克隆免疫球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)、不分泌型骨髓瘤以及拒绝入组患者。

仪器与试剂:MDSCs表型检测所用的仪器FACSCanto II流式细胞仪及单克隆抗体(McAb)、溶血剂等试剂均购自美国Becton Dickinson(BD)公司。所测胞膜单克隆抗体(McAb)包括CD45-APC.CY5、CD33 - FITC、CD14 - PERCP、CD11b - APC、CD15-PE。检测结果采用BD FACSDiva软件分析

1.2 方 法

1.2.1 全骨髓的细胞分离

所有患者均取仰卧位,以髂前上棘为穿刺点,碘伏常规皮肤消毒,利多卡因局部麻醉,进行骨髓穿刺。收集标本,制备细胞悬液,吹打混匀,放入10 mL离心管中,离心1 500 r/min, 5 min,加入1 mL红细胞裂解液破红3 min后,全培终止,离心1 500 r/min, 5 min。用细胞计数仪进行计数后, 2×10^7 细胞用1 mL缓冲液重悬。

1.2.2 外周全血细胞制备

抽取纳入者入院次日晨起空腹肘静脉血3 mL,肝素锂抗凝,取100 μ L静脉全血置于流式管内,依次加入荧光标记抗体各2 μ L,于2~8℃环境中孵育30 min。而后加入2 mL红细胞裂解液,避光、室温条件下孵育10 min,使用PBS洗涤,以适量流式染色缓冲液重悬染色细胞,上机检测。

1.2.3 流式细胞的分选

取样品100 μ L,加入五色单克隆抗体20 μ L,混匀后室温避光放置15 min,加入1 mL 1×红细胞裂解液,室温避光放置10 min,1 500 r/min离心5 min,弃上清,对沉淀物以PBS洗涤2次。加入500 μ L PBS重悬后上机检测。用BD FACSDiva软件设置获取条件后,上样获取数据,每管获取 2×10^4 个细胞。FSC-A/FSC-H去除粘连细胞,采用CD14/CD11B设门,分析CD11BdimCD14-细胞,

CD15+CD33+细胞为 G-MDSCs, CD15-CD33+细胞为 M-MDSCs。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.00 软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间差异比较采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组来源 M-MDSCs%、G-MDSCs 及 Total MDSCs% 的比较分析

BM 与 PB 来源样本, 采用流式细胞技术检测 M-MDSCs%, 见图 1, PB 组 (0.062 ± 0.022) 显著低于

BM 组 (0.291 ± 0.093), 差异具有统计学意义 ($P = 0.0223$) (图 1A); G-MDSCs % 与 Total MDSCs % 两组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) 见图 1B 和 C。

2.2 流式细胞技术对 PB 来源 MDSCs 的分选

外周血标本设门及结果示例, 分群较为理想, 且不同患者标本之间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 流式细胞技术对 BM 来源 MDSCs 的分选

不同患者标本 G-MDSCs 均占比较大, 其中混杂大量早期粒细胞的干扰, 共同表达为 CD13 和 CD33 而不表达 HLA-DR, 特异性较低。见图 3。

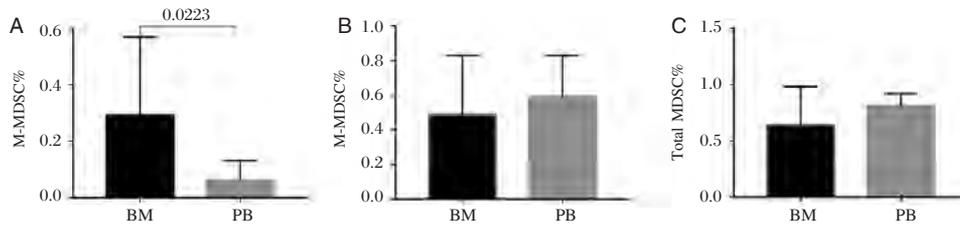


图 1 BM 及 PB 来源 M-MDSCs%、G-MDSCs% 及 Total MDSCs% 的比较

Figure 1 Comparison of BM and PB sourced M-MDSCs%, G-MDSCs% and Total MDSCs%

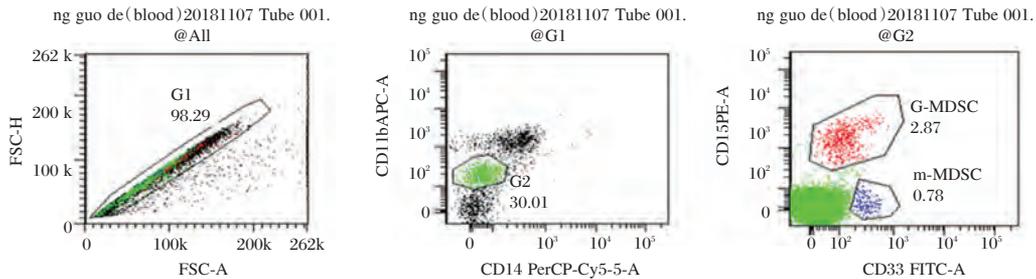


图 2 流式细胞技术对 PB 来源 M-MDSCs%、G-MDSCs% 的检测

Figure 2 M-MDSCs % and G-MDSCs % sourced PB by Flow cytometry

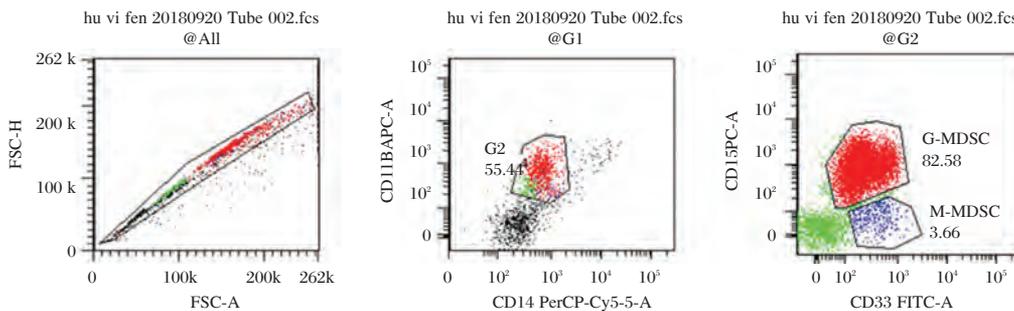


图 3 流式细胞技术对 BM 来源 M-MDSCs%、G-MDSCs% 的检测

Figure 3 M-MDSCs % and G-MDSCs % sourced BM by Flow cytometry

3 讨论

MM 肿瘤微环境包含细胞成分和非细胞成分。细胞成分包括造血细胞成分和非造血细胞成分,作为非造血细胞成分的 MDSCs 近年来广受关注^[1]。

1987 年 Young^[4]等在小鼠肺癌模型中发现肿瘤细胞能分泌粒细胞集落刺激因子(Granulocyte-Colony stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)等细胞因子,诱导形成具有免疫抑制作用的造血前体细胞,后来证实这些细胞均为髓系来源,都是不成熟细胞且能抑制 T 细胞特异性免疫反应,而被正式命名为 MDSCs,其不同亚型功能不同:M-MDSCs 主要分泌诱导型一氧化氮合酶(inducible Nitric oxide synthase, iNOS),G-MDSCs 主要分泌精氨酸酶 1(Arginase, ARG-1)。ROS 与 NO 结合形成过氧亚硝基化合物,一方面引起 T 细胞表面抗原受体(Tcell receptor, TCR)TCR-CD8 复合物中酪氨酸硝基化,失去对负载抗原肽的主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)受体的结合能力,最终导致 CD8+ T 细胞丧失对抗原刺激的免疫反应^[5];另一方面也直接抑制抗原肽与肿瘤细胞表面 MHC 受体的结合,降低骨髓瘤细胞的免疫原性^[6],并能诱导肿瘤微环境中调节性 T 细胞(Treg)的成熟。MDSCs 还能够通过其细胞膜表面表达的解整合素金属蛋白酶 17(Disintegrin metalloproteinase 17, ADAM17)下调 native T 细胞表面 CD62L 的表达水平,降低 T 细胞向肿瘤微环境迁移的能力^[7],直接诱导形成免疫抑制的肿瘤微环境;此外,肿瘤组织往往是一个缺氧环境,在缺氧环境下,MDSCs 可向肿瘤相关巨噬细胞方向分化。所形成的肿瘤相关巨噬细胞一方面表达高水平 B7-H1 分子,后者与 T 细胞表面的 PD-1 结合,可直接诱导活化 T 细胞凋亡^[8];另一方面肿瘤相关巨噬细胞能促进 Treg 和 Th17 细胞增殖,间接抑制 T 细胞活化^[9];还有报道显示肿瘤相关巨噬细胞有促进骨髓瘤细胞增殖、诱导耐药和促进新生血管形成的作用^[10]。骨髓瘤组织中的破骨细胞也主要来源于肿瘤微环境中的 MDSCs,参与骨髓瘤骨病的发生,进而促进骨髓瘤细胞的增殖^[11]。

机体在健康状态下,MDSCs 主要存在于骨髓中,并能够较快的分化为成熟粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞。但是肿瘤情况下,该细胞的整个分化过程受阻,在外周血、脾以及炎症组织中大量增殖,并发挥免疫抑制功能^[12]。其中,M-MDSCs 是发挥免疫抑制作用的主要细胞群,它分泌的细胞因子可募集高水平的调节性 T 细胞,抑制 T 细胞免疫应答^[13]。MDSC 水平与中性粒细胞计数呈正相关,而系统性慢性炎症在肿瘤的发生和生长中发挥作用,并在肿瘤免疫中发挥重要作用,其中中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)已被报道为最好的标志物之一^[14],提示血液循环池的 MDSC 水平可以提示疾病的动态变化和预后的预测。

通过比较不同来源 MDSCs 的分选发现外周血标本分群较为理想;骨髓组织标本 G-MDSCs 占比大,其中混杂大量早期粒细胞的干扰,不同样本之间 G-MDSCs 差异小,不利于分析。因此,本研究发现 MM 患者外周血来源较骨髓组织来源 MDSCs 检测更具诊断价值,为后续开展 MDSCs 与骨髓瘤临床治疗效果的关联性及其在疾病发生发展中的变化趋势研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Schupp J, Krebs FK, Zimmer N, et al. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment [J]. Cell Immunol, 2019, 343: 103713.
- [2] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. Nat rev immunol, 2009, 9(3): 162-174.
- [3] Weber R, Fleming V, Hu X, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors [J]. Front Immunol, 2018, 9.
- [4] Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors [J]. Cancer research, 1987, 47(1): 100-105.
- [5] Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+T cell tolerance in cancer [J]. Nat med, 2007, 13(7): 828-835.
- [6] Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice [J]. The J clin invest, 2011, 121(10): 4015-4029.
- [7] Hanson EM, Clements VK, Sinha P, et al. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells [J]. The J Immunol, 2009, 183(2): 937-944.

(下转第 896 页)

体液免疫功能、血清 sIL-6R 水平和血沉的检测在儿童 CA-MPP 病情变化和疗效评估中的应用

陈建州* 吴云刚 张辉

[摘要] 目的 研究体液免疫功能、血清 sIL-6R 水平和血沉的检测在儿童 CA-MPP 病情变化和疗效评估中的应用。方法 选取2018年1月至2019年6月本院收治的90例 CA-MPP 儿童作为研究对象,根据 CPIS 评分将研究对象分为两组,CPIS \geq 6分为 CA-MPP 重症组($n=46$),CPIS $<$ 6分为 CA-MPP 普通组($n=44$);另选取同期体检的健康儿童45例设为对照组。散射比浊法测定各组 IgA、IgG、IgM 水平以及 C3、C4 水平;ELISA 法测定 IL-6、sIL-6R 以及 TNF- α 水平;全自动生化分析仪测定 ESR 水平。结果 CA-MPP 重症组、普通组患儿血清 IgA、IgG、IgM、C3、C4 水平以及 IL-6、sIL-6R、TNF- α 、ESR 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),CA-MPP 重症组血清上述指标水平高于 CA-MPP 普通组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关性分析发现,体液免疫功能、血清 sIL-6R 和血沉的水平均与儿童 CA-MPP 病情严重程度呈正相关($P<0.05$)。治疗后重症与普通组 CA-MPP 儿童血清 IgA、IgG、IgM、C3、C4 水平以及 IL-6、sIL-6R、TNF- α 、ESR 水平均低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 体液免疫功能、血清 sIL-6R 水平和血沉的检测能反映儿童 CA-MPP 病情变化情况,密切监测 CA-MPP 患儿的上述指标水平对于患儿的病情和疗效评估具有重要意义。

[关键词] 体液免疫功能; sIL-6R; 血沉; 儿童 CA-MPP; 病情; 评估

Application of humoral immune function, serum sIL-6R level and erythrocyte sedimentation rate in the evaluation of changes in CA - MPP condition and curative effect in children

CHEN Jianzhou*, WU Yungang, ZHANG Hui

(Department of Pediatrics, Nanshi Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

[ABSTRACT] Objective To study the application of humoral immune function, serum sIL-6R level and erythrocyte sedimentation rate in the assessment of the changes and therapeutic effects of CA - MPP in children. Methods Ninety-eight children with CA-MPP admitted to our hospital from January 2018 to June 2019 were enrolled. The subjects were divided into two groups according to the CPIS score. CPIS \geq 6 was divided into CA - MPP severe group ($n=46$), CPIS $<$ 6 is divided into CA - MPP common group ($n=44$). Another 45 healthy children who were selected for physical examination in our hospital were set as the control group. The levels of IgA, IgG, IgM and C3 and C4 in each group were determined by nephelometry. The levels of IL-6, sIL-6R and TNF- α were determined by ELISA. The ESR level was determined by automatic biochemical analyzer. Results The serum levels of IgA, IgG, IgM, C3, C4, IL-6, sIL-6R, TNF- α and ESR in the severe group and the common group of CA-MPP were higher than those in the control group ($P<0.05$), and the serum levels of the severe group of CA-MPP were higher than those in the common group of CA-MPP ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that humoral immune function, serum sIL-6R and

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018073215)

作者单位:南阳南石医院儿科,河南,南阳473000

*通信作者:陈建州, E-mail: cjxig5@126.com

ESR levels were positively correlated with the severity of CA-MPP in children ($P<0.05$). The serum levels of IgA, IgG, IgM, C3, C4, IL-6, sIL-6R, TNF- α and ESR in the severe group and the common group were lower than those before treatment ($P<0.05$). **Conclusion** The detection of humoral immune function, serum sIL6R level and erythrocyte sedimentation rate can reflect the changes of CA - MPP in children, and closely monitoring the levels of above-mentioned indicators in children with CA-MPP is of great significance for the assessment of the condition and efficacy of children.

[KEY WORDS] humoral immune function; serum sIL - 6R; erythrocyte sedimentation rate; children CA-MPP; condition; assessment

在临床上,急性呼吸道感染疾病属于常见病、多发病,是全球儿童最常见的疾病之一,而肺炎支原体(*mycoplasma pneumoniae*, MP)则是引起儿童呼吸道感染的常见的病原体之一,被认为是引起社区获得性肺炎(*community acquired pneumonia*, CAP)的第3位病原体,其引起的支原体肺炎约占儿童社区获得性肺炎的10%~40%^[1-4]。近年来,随着支原体肺炎在儿童当中的发病率有逐渐升高的趋势,越来越影响儿童的健康成长。感染支原体肺炎的儿童以顽固性剧烈咳嗽以及持续性或弛张性发热为主要表现,并且疾病具有易反复发作的特点,严重者可能因呼吸窘迫、中枢神经系统严重受累而引起死亡^[5]。相关研究表明,在支原体肺炎的发病机制中,许多细胞因子都直接或者间接参与了免疫反应、炎性反应及免疫损伤,并且患儿发病后会存在不同的免疫功能紊乱情况^[6]。血清sIL-6R是属于细胞因子家族当中的重要因子,在免疫调节中占有重要作用,而血沉在早期的炎性反应中会迅速升高,可作为反应炎症的敏感指标之一。研究支原体肺炎患儿体液免疫功能以及血清sIL-6R、血沉等相关指标对于早期评估病情具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年6月本院收治的90例CA-MPP儿童作为研究对象,根据CPIS评分将研究对象分为两组,CPIS ≥ 6 分为CA-MPP重症组($n=46$),CPIS < 6 分为CA-MPP普通组($n=44$)。CA-MPP重症组中,男27例,女19例,年龄10个月~12岁,平均年龄(5.53 ± 0.64)岁;CA-MPP普通组中,男23例,女21例,年龄1~12岁,平均年龄(5.48 ± 0.71)岁;另选取同期来本院体检的健康儿童45例设为对照组,其中男22例,女23例,年龄

1~11岁,平均年龄(5.61 ± 0.93)岁。各组性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:患儿年龄13岁以下,病程不超过8 d,无激素治疗史,诊断符合《诸福棠实用儿科学(第8版)》中MPP诊断标准^[7];X线表现为支气管肺炎、大叶性肺炎或间质性肺炎改变;白细胞数大多正常或稍高,血沉多增快,Coombs试验阳性。排除标准:患儿有风湿性疾病、自身免疫病、严重器质性疾病或者合并细菌性、病毒性肺炎、肺结核、肺部肿瘤等。本研究经医院伦理委员会批准,获得患儿家属知情同意书。

1.2 方法

CA-MPP患儿于入院次日早晨、对照组儿童于体检当日空腹状态下采集静脉血5 mL,经3 000 r/min离心机离心5 min,取上层血清液于-80℃冰箱内保存。散射比浊法测定各组IgA、IgG、IgM以及C3、C4水平;ELISA法检测IL-6、sIL-6R、TNF- α 水平;全自动生化分析仪测定ESR水平。患儿均给予抗菌药物治疗,CA-MPP普通组单用阿奇霉素,10 mg/kg,口服1次/d,治疗1~2个疗程(3 d为1疗程、停药4d);CA-MPP重症组给予阿奇霉素-阿奇霉素序贯治疗辅以地塞米松静脉滴注,先予静脉滴注阿奇霉素,10 mg/kg,1次/d,治疗2~4个疗程(5 d为1疗程、停药4d),并辅以静脉滴注地塞米松,1~2 mg/kg,1次/d,连用3 d,病情好转后予阿奇霉素口服,1次/d,治疗2~4个疗程(3 d为1疗程、停药4 d),疗程结束后复查以上项目。

1.3 观察指标

治疗前CA-MPP儿童与对照组儿童血液学指标的比较;治疗前CA-MPP儿童血液学生化指标与病情的相关性分析;治疗前后CA-MPP儿童血液学指标的比较。

1.4 统计学方法

采用 SPASS 20.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 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, Pearson 相关性分析评价体液免疫功能、血清 sIL-6R 和血沉的水平与儿童 CA-MPP 病情严重程度的关系, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前 CA-MPP 儿童血清血液学指标比较

治疗前, 患儿 IgA、IgG、IgM、C3、C4、IL-6、sIL-6R、TNF- α 水平、ESR 水平比较结果: CA-MPP 重症组 > 普通组 > 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 治疗前 CA-MPP 儿童血清血液学指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum hematological indexes of ca-mpp children before treatment ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (n=45)	CA-MPP 普通组 (n=44)	CA-MPP 重症组 (n=46)	F 值	t _{CA-MPP 普通组 vs 对照组}	t _{CA-MPP 重症组 vs 对照组}	t _{CA-MPP 普通组 vs CA-MPP 重症组}	P 值
IgA (g/L)	0.97±0.16	1.13±0.38	1.41±0.43	19.175	6.496	2.623	2.623	<0.05
IgG (g/L)	6.23±1.58	11.27±2.03	14.16±2.88	146.137	16.234	13.087	5.48	<0.05
IgM (g/L)	0.98±0.17	1.51±0.22	2.02±0.34	189.819	18.392	12.734	8.407	<0.05
C3 (g/L)	1.21±0.27	1.76±0.24	1.93±0.33	79.929	11.377	10.149	2.784	<0.05
C4 (g/L)	0.27±0.08	0.32±0.12	0.57±0.14	87.135	12.514	2.318	9.077	<0.05
IL-6 (pg/mL)	86.46±13.47	123.39±12.28	134.52±15.43	150.119	15.814	13.508	3.776	<0.05
sIL-6R (μ g/L)	53.61±17.45	82.17±26.68	97.86±29.23	36.562	8.744	5.99	2.656	<0.05
TNF- α (pg/mL)	71.26±11.32	81.40±14.33	89.37±14.46	20.706	6.643	3.72	2.615	<0.05
ESR (mg/L)	8.57±1.25	66.13±14.33	78.37±14.46	452.586	32.26	26.844	4.032	<0.05

2.2 治疗前 CA-MPP 儿童血液学生化指标与病情的相关性分析

Pearson 相关性分析后发现, 治疗前 CA-MPP 儿童体液免疫功能、血清 sIL-6R 和血沉的水平均与 CA-MPP 病情严重程度呈正相关 ($r_{\text{IgA}}=0.43$, $r_{\text{IgG}}=0.38$, $r_{\text{IgM}}=0.52$, $r_{\text{C3}}=0.34$, $r_{\text{C4}}=0.46$, $r_{\text{IL-6}}=0.51$, $r_{\text{sIL-6R}}=0.48$, $r_{\text{TNF-}\alpha}=0.57$, $r_{\text{ESR}}=0.42$; P 均 < 0.05)。

2.3 治疗前后 CA-MPP 儿童的血液学生化指标的对比

重症与普通组 CA-MPP 儿童经过治疗后, 血清 IgA、IgG、IgM、C3、C4 水平以及 IL-6、sIL-6R、TNF- α 、ESR 水平均低于治疗前, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗后两组患儿血液学生化指标, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗后 46 例重症 ca-mpp 儿童不同疗效的血清对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 serum comparison of 46 children with severe CA MPP after treatment ($\bar{x} \pm s$)

指标	CA-MPP 重症组 (n=46)				CA-MPP 普通组 (n=44)			
	治疗前	治疗后	t 值	P 值	治疗前	治疗后	t 值	P 值
IgA (g/L)	1.41±0.43	1.02±0.19	5.627	<0.05	1.13±0.38	0.96±0.22	2.568	<0.05
IgG (g/L)	14.16±2.88	7.11±1.06	15.581	<0.05	11.27±2.03	7.08±1.21	11.761	<0.05
IgM (g/L)	2.02±0.34	1.13±0.22	14.906	<0.05	1.51±0.22	1.08±0.26	8.375	<0.05
C3 (g/L)	1.93±0.33	1.22±0.25	11.631	<0.05	1.76±0.24	1.20±0.31	9.475	<0.05
C4 (g/L)	0.57±0.14	0.28±0.10	11.432	<0.05	0.32±0.12	0.26±0.13	2.250	<0.05
IL-6 (pg/mL)	134.52±15.43	91.13±12.45	14.843	<0.05	123.39±12.28	87.53±11.64	14.058	<0.05
sIL-6R (μ g/L)	97.86±29.23	58.71±16.87	7.868	<0.05	82.17±26.68	54.18±12.56	6.296	<0.05
TNF- α (pg/mL)	89.37±14.46	72.42±12.16	6.085	<0.05	81.40±14.33	70.29±10.34	4.170	<0.05
ESR (mg/L)	78.37±14.46	11.62±2.83	37.854	<0.05	66.13±14.33	10.95±3.35	24.872	<0.05

3 讨论

肺炎支原体是一种介于病毒与细菌之间的无细胞壁的病原微生物, 能引起人类感染支原体肺炎, 近年来其发病率呈现低龄化趋势^[8]。虽然支原体肺炎为轻型、自限性疾病, 但儿童时期由于其机体防御能力尚不足, 一旦感染易病情反复, 发展为难治性支原体肺炎, 若没有得到及时对症治疗,

肺炎, 近年来其发病率呈现低龄化趋势^[8]。虽然支原体肺炎为轻型、自限性疾病, 但儿童时期由于其机体防御能力尚不足, 一旦感染易病情反复, 发展为难治性支原体肺炎, 若没有得到及时对症治疗,

可能会引发一系列严重并发症,造成儿童发生多器官功能障碍综合征^[9]。目前临床上关于支原体肺炎(MPP)的发病机制仍不十分明确,主要倾向于免疫学发病机制,与机体的体液免疫和细胞免疫有关^[10]。

IgA、IgG及IgM是人体液免疫的重要参与因子,MP作为抗原进入人体内刺激机体产生大量特异性抗体,可刺激B细胞活化分泌免疫球蛋白IgA、IgG及IgM,提呈抗原,介导病理免疫应答^[11]。儿童在感染MP后,大约1~2周后可产生IgA、IgM。IgM可在3~4周内达到最大值,IgA作为黏膜防御体系重要成分,出现时间较IgM晚,但持续时间长。IgG出现时间相对较晚,在感染MP约5周可以达到最大值,随后一定时间内保持稳定水平^[12]。有研究表明,CA-MPP患儿的IgA、IgG及IgM水平显著高于正常儿童^[13],本研究中治疗前MPP儿童IgA、IgG、IgM水平高于正常对照组,重症组上述指标水平高于普通组。在机体感染MP后会产生交叉反应激活补体系统,导致血清中C3、C4水平升高,改变宿主抗原结构并形成免疫复合物,产生一系列并发症,引起组织或器官的多种病变,加重病情。本研究中治疗前MPP儿童C3、C4水平高于对照组,且病情越重C3、C4水平越高,提示MP感染后激活了补体系统,与韩晨鹏等^[14]研究结果一致。IL-6是一种对体液免疫和细胞免疫均有调节作用的多功能细胞因子,在机体炎症反应、自身免疫中发挥重要作用,直接影响B细胞分泌免疫球蛋白过程。因此,在发生肺炎时血清IL-6水平会升高,而sIL-6R介导IL-6发挥生物学活化作用,参与机体的免疫应答和调节,也随之升高;TNF- α 有双重生物学活性,参与机体免疫损伤过程,其水平的升高会促进炎症反应的发生,加重病情。ESR是反映炎症的一种非特异性指标,在早期的炎症反应中会迅速升高,可联合实验室其他检测指标提高肺炎早期诊断的敏感度。Pearson相关性分析后发现,体液免疫功能、血清sIL-6R和血沉的水平均与儿童CA-MPP病情严重程度呈正相关,且CA-MPP儿童在经过治疗后,治疗后重症与普通组CA-MPP儿童血清IgA、IgG、IgM、C3、C4水平以及IL-6、sIL-6R、TNF- α 、ESR水平均低于治疗前,提示CA-MPP儿童经过治疗后,病情有所好转,表明上述指标可以对儿童CA-MPP病情及治疗疗效进行辅助评估。

综上所述,体液免疫功能、血清sIL-6R水平和血沉的检测能反映儿童CA-MPP病情变化情况,联合检测上述指标水平对于CA-MPP患儿的病情和疗效评估具有重要意义。

参考文献

- [1] 蔡妍,章金灿,陆卫歆,等. C反应蛋白及血常规对肺炎支原体或军团菌感染儿童病情判断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(2):107-109.
- [2] Yang Edward, Altes Talissa, Anupindi SA. Early Mycoplasma pneumoniae infection presenting as multiple pulmonary masses: an unusual presentation in a child[J]. *Pediatr Radiol*, 2008, 38(4):477-480.
- [3] 王军锋. 血清IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 检测结果对预防儿童肺炎支原体肺炎的临床意义[J]. 华南预防医学, 2017, 43(1):83-85.
- [4] 许沙沙,郭连峰,吴妍,等. 儿童肺炎支原体肺炎临床特征和流行病学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(14):3307-3310.
- [5] Li Tianhua, Yu Haiying, Hou Weina, Li Zhiyong, et al. Evaluation of variation in coagulation among children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia: a case-control study. [J]. *J int medi res*, 2017, 45(6).
- [6] 王朝燕,禹露. 小儿支原体肺炎体液免疫功能与hs-CRP检验的临床意义[J]. 海南医学, 2016, 27(8):1257-1259.
- [7] 诸福棠实用儿科学(第8版)[J]. 中国临床医生杂志, 2015, 43(7):47.
- [8] 洪爽,赵扬,白小玲,等. 红霉素联合愈酚甲麻那敏治疗肺炎支原体感染伴喘息患儿的疗效及对ECP、IL-8和肺功能的影响[J]. 医学临床研究, 2017, 34(8):1645-1647.
- [9] Mitsuo eNarita. Classification of extrapulmonary manifestations due to Mycoplasma pneumoniae infection on the basis of possible pathogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(1):23.
- [10] 余丽丽,赵德育. 肺炎支原体肺炎发病机制研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(3):234-238.
- [11] Sassi A, Bouguerra A, Benammar Elgaaied A, et al. Immunoregulatory role for a public IgM idotype in the induction of autoimmune diseases in Mycoplasma pneumoniae infection. [J]. *Immunol Lett*, 2011, 136(2):130-137.
- [12] 熊维,钱柯,伍剑. 血清Ig、CRP联合肺功能检测在RMPP诊治中的应用[J]. 重庆医学, 2017, 46(27):3822-3824. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.27.024.
- [13] 雷蕾. 多项血清体液免疫指标联合检测在诊断肺炎支原体肺炎中的应用价值[J]. 当代医药论丛, 2020, 18(9):183-184.
- [14] 韩晨鹏,徐清芳,张美华. 血清补体C3、C4水平变化与肺炎支原体感染患儿病情程度的关联性及其临床意义[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(3):496-498.

宫颈癌患者血清 E-cad、IFN- γ 、TGF- β 表达意义及对预后的影响

李晓茵 吴雪薇 卢智健 曾带娣 陈艳雅*

[摘要] 目的 探讨宫颈癌患者血清上皮型钙黏蛋白(E-cad)、干扰素 γ (IFN- γ)、转化生长因子 β (TGF- β)表达意义及对预后的影响。方法 选取本院2015年4月至2016年4月宫颈癌患者60例(宫颈癌组)、宫颈鳞状上皮内病变(CIN)患者35例(CIN组)、宫颈炎患者42例(宫颈炎组),比较3组、不同病理特征患者血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平,分析各血清指标对宫颈癌的诊断价值。随访3年,比较不同血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平患者预后情况。结果 宫颈癌组血清E-cad、TGF- β 高于CIN组、宫颈炎组,IFN- γ 低于CIN组、宫颈炎组($P<0.05$);血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 联合诊断CIN、宫颈炎、宫颈癌AUC均>单一诊断;血清E-cad、TGF- β 与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移呈正相关,与分化程度呈负相关,IFN- γ 与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移呈负相关,与分化程度呈正相关($P<0.05$);随访3年,E-cad、TGF- β 、IFN- γ 高危组、低危组生存曲线对比,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平在宫颈癌患者中呈异常表达,并与宫颈癌患者病理特征存在一定相关性,可作为诊断宫颈病变类型、评估宫颈癌患者预后的潜在有效因子。

[关键词] 宫颈癌;上皮型钙黏蛋白;干扰素 γ ;转化生长因子 β

The significance of serum E-cad, IFN- γ , TGF- β levels in patients with cervical cancer and its influence on prognosis

LI Xiaoyin, WU Xuewei, LU Zhijian, ZENG Daidi, CHEN Yanya*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong, China, 523000)

[ABSTRACT] Objective To explore the significance of serum epithelial cadherin (E-cad), interferon γ (IFN- γ), and transforming growth factor β (TGF- β) levels in patients with cervical cancer and their impact on prognosis. Methods From April 2015 to April 2016, 60 patients with cervical cancer (cervical cancer group), 35 patients with cervical squamous intraepithelial lesion (CIN) (CIN group), and 42 patients with cervicitis (cervicitis group) were selected. The serum E-cad, IFN- γ , and TGF- β levels of the three groups with different pathological characteristics were compared, and the diagnostic value of each serum index for cervical cancer was analyzed. Follow-up for three years, the prognosis of patients with different serum E-cad, IFN- γ , TGF- β levels were compared. Results Serum E-cad and TGF- β in the cervical cancer group were higher than those in the CIN group and cervicitis group, and IFN- γ was lower than those in the CIN group and cervicitis group ($P<0.05$). Serum E-cad, IFN- γ , TGF- β combined AUC for diagnosis of CIN, cervicitis, and cervical cancer AUC were greater than that of the single diagnosis. Serum E-cad and TGF- β were positively correlated with clinical stage, tumor diameter, and lymph node metastasis, and negatively correlated with the degree of differentiation. IFN- γ was negatively correlated with clinical stage, tumor diameter, and

基金项目:东莞市社会科技发展项目(201750715001304)

作者单位:广东省东莞市人民医院妇产科,广东,东莞 523000

*通信作者:陈艳雅, E-mail:1940970248@qq.com

lymph node metastasis, and were positively correlated with the degree of differentiation ($P<0.05$). After 3 years of follow-up, there was a statistically significant difference in the survival curves of the E-cad, TGF- β , and IFN- γ high-risk and low-risk groups ($P<0.05$). **Conclusion** Serum levels of E-cad, IFN- γ , and TGF- β are abnormally expressed in cervical cancer patients and have a certain correlation with the pathological characteristics of cervical cancer patients. They can be used as potential effective factors for diagnosing cervical lesion types and evaluating the prognosis of cervical cancer patients.

[KEY WORDS] Cervical cancer; Epithelial cadherin; Interferon γ ; Transforming growth factor β

宫颈癌发病率约占女性恶性肿瘤的13.0%,是导致女性死亡的第二大恶性肿瘤^[1],并随人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)感染上升呈明显上升、年轻化趋势,严重威胁患者生命安全。资料显示,宫颈癌发生、发展、转归是一个极其复杂的多阶段、多基因调控异常的过程,其中细胞侵袭、迁移能力的增强是导致其预后不良的主要原因^[2]。同时,学者^[3]指出,细胞黏附能力降低或丧失可能是宫颈癌侵袭、转移的关键因素。上皮型钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)在细胞分裂、黏附、肿瘤浸润、迁移过程中起着重要作用^[4]。转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β)为免疫逃逸发生机制的重要因子,参与机体免疫逃逸,可诱导上皮-间质转化,加快肿瘤侵袭转移^[5]。干扰素 γ (Interferon- γ , IFN- γ)能诱导宫颈肿瘤细胞凋亡,增强特异细胞毒性T细胞对肿瘤细胞的识别与裂解。鉴于此,本研究以血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平为观察指标,观察其在宫颈癌患者的表达及对预后判断的影响。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2015年4月至2016年4月宫颈癌患者60例(宫颈癌组),平均(50.19 \pm 3.58)岁、宫颈鳞状上皮内病变(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN)患者35例(CIN组),平均(49.86 \pm 3.42)岁、宫颈炎患者42例(宫颈炎组),平均(49.97 \pm 3.60)岁。3组基本资料(年龄)比较差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。本研究经本院医学伦理委员会审批同意。

纳入标准:均经组织病理学检查确诊为宫颈病变;均为首次发病;临床资料完整;患者及家属知情并签署同意书。排除标准:肝肾等重要脏器器质性病变者;凝血机制紊乱或活动性出血者;继发性盆腔炎者;自身免疫系统疾病或全身感染性疾病者;⑤失语症或精神行为异常者。

1.2 方法

空腹取3 mL静脉血,离心12 min,3 000 r/min,离心半径15 cm,分离取血清,置于-20 $^{\circ}$ C低温保存,采用酶联免疫吸附法检测血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平,试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司,按照试剂盒说明书操作。

1.3 观察指标

对比3组血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平。采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)分析血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 对宫颈癌的诊断价值。分析血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 与宫颈癌患者病理特征的关系。随访3年,采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, KM)分析生存状况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件分析处理数据,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 进行检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用ROC曲线分析诊断价值,以KM进行生存曲线分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平

宫颈癌组血清E-cad、TGF- β 高于CIN组、宫颈炎组,IFN- γ 低于CIN组、宫颈炎组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 3组血清E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of serum E-cad, IFN- γ , TGF- β levels in 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

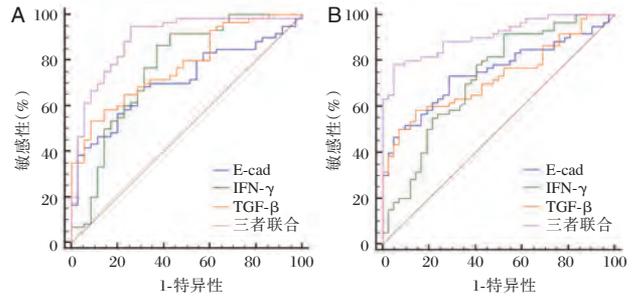
组别	n	E-cad (ng/mL)	IFN- γ (pg/mL)	TGF- β (pg/mL)
宫颈癌组	60	40.28 \pm 13.41	21.46 \pm 7.11	50.73 \pm 16.90
CIN组	35	27.43 \pm 9.12	33.57 \pm 11.16	38.20 \pm 12.52
宫颈炎组	42	21.39 \pm 7.10	40.74 \pm 13.58	28.76 \pm 9.50
F 值		40.993	43.691	31.690
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清 E-cad、IFN-γ、TGF-β 对宫颈癌的诊断价值

ROC 曲线分析显示,血清 E-cad、IFN-γ、TGF-β 联合诊断 CIN 与宫颈癌 AUC>单一诊断,差异具有统计学意义(P<0.05)。见图 1、表 2。

2.3 血清 E-cad、IFN-γ、TGF-β 与宫颈癌患者病理特征的关系

血清 E-cad、TGF-β 与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移呈正相关,与分化程度呈负相关;IFN-γ 与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移呈负相关,与分化程度呈正相关(P<0.05)。见表 3。



注:A 是 CIN 与宫颈癌诊断; B 是宫颈炎与宫颈癌诊断。

图 1 ROC 曲线图

Figure 1 ROC curve

表 2 血清 E-cad、IFN-γ、TGF-β 对 CIN、宫颈炎与宫颈癌的诊断价值

Table 2 Diagnostic value of serum E-cad, IFN-γ, TGF-β in CIN and cervical cancer

项目	指标	AUC	95%CI	Z 统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
血清对 CIN 与宫颈癌的诊断价值	E-cad	0.711	0.609~0.799	4.004	>33.37 ng/mL	66.67	71.43	<0.001
	IFN-γ	0.766	0.668~0.847	4.814	≤31.42 pg/mL	86.67	62.86	<0.001
	TGF-β	0.778	0.681~0.857	5.913	>55.06 pg/mL	53.33	91.43	<0.001
	三者联合	0.893	0.813~0.947	10.946	-	95.00	74.29	<0.001
血清对宫颈炎与宫颈癌的诊断价值	E-cad	0.750	0.654~0.830	5.209	>34.57 ng/mL	73.33	71.43	<0.001
	IFN-γ	0.722	0.625~0.807	4.220	≤41.23 pg/mL	91.67	47.62	<0.001
	TGF-β	0.727	0.630~0.811	4.608	>44.72 pg/mL	58.33	85.71	<0.001
	三者联合	0.908	0.834~0.956	14.639	-	78.33	95.24	<0.001

表 3 血清 E-cad、IFN-γ、TGF-β 与宫颈癌患者病理特征的关系 (x̄±s)

Table 3 Relationship between serum E-cad, IFN-γ, TGF-β and pathological characteristics (x̄±s)

临床病理特征		n	E-cad (ng/mL)	t/F 值	P 值	IFN-γ (pg/mL)	t/F 值	P 值	TGF-β (pg/mL)	t/F 值	P 值
年龄(岁)	>50	35	40.81±10.24	0.497	0.621	21.24±6.90	0.288	0.775	50.08±12.79	1.019	0.313
	≤50	25	39.54±9.06			21.77±7.22			51.64±13.05		
临床分期	I~II	27	35.29±8.31	3.754	<0.001	18.00±6.01	4.369	<0.001	44.12±10.36	4.009	<0.001
	III~IV	33	44.36±10.05			25.69±7.35			56.14±12.44		
肿瘤直径(cm)	>4	24	45.10±8.69	3.911	<0.001	18.02±5.64	3.305	0.002	56.17±10.07	3.753	<0.001
	≤4	36	37.07±7.14			23.75±7.13			47.10±8.53		
分化程度	低分化	15	45.03±9.13	10.213	<0.001	17.06±5.11	6.497	0.003	58.01±8.43	13.962	<0.001
	中分化	22	41.37±5.20			21.28±6.24			50.46±6.95		
	高分化	23	36.14±4.17			24.50±6.83			46.24±5.06		
淋巴结转移	有	37	46.22±12.27	5.289	<0.001	17.15±6.49	5.912	<0.001	57.24±12.79	5.403	<0.001
	无	23	30.72±8.65			28.39±8.14			40.26±10.08		

2.4 生存分析

随访 3 年,脱落 3 例。以 ROC 曲线最佳截断值分为低危组、高危组,KM 曲线分析显示 E-cad、TGF-β、IFN-γ 高危组、低危组生存曲线对比,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 2。

3 讨论

研究发现,抑癌基因功能丧失及癌基因过表达可导致宫颈组织发生一系列病理改变,最终诱

导组织癌变、局部浸润及远处转移^[6]。另外上皮-间质转化被认为是肿瘤转移的关键启动步骤,在多种肿瘤侵袭、转移过程发挥重要作用^[7]。

E-cad 能促进上皮分化、保持上皮细胞完整性,其表达异常是发生上皮-间质转化的重要标志性变化^[8]。张鸿艳^[9]研究发现,血清 E-cad 水平在宫颈癌患者中呈异常高表达,支持本研究观点,血清 E-cad 水平上调可调节癌细胞与正常组织间黏附功能,不断增强癌生长因子受体作用,诱发丝裂

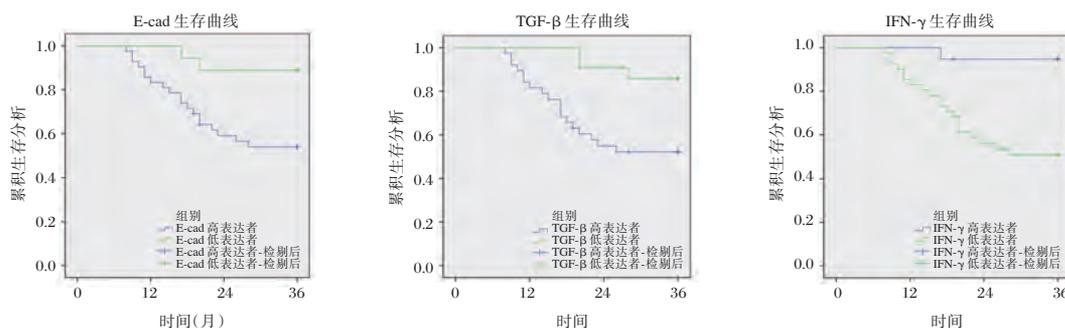


图2 生存曲线图

Figure 2 survival curve

原激活蛋白激酶调节路径持续表达,刺激细胞产生增殖与分裂,从而激活细胞侵袭形成。最后,分析血清 E-cad 与宫颈癌病理特征、预后关系可知,血清 E-cad 与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移呈正相关关系,与分化程度呈负相关关系,且其表达水平上调是宫颈癌患者预后不良的风险因素。

TGF- β 具有调节细胞生长、分化、血管形成、细胞凋亡等多种功能,同时还参与细胞外基质重建、间质细胞产生及机体抗肿瘤免疫^[10]。本研究经酶联免疫吸附法检测表明,宫颈癌患者血清 TGF- β 水平明显高于 CIN 患者、宫颈炎患者,并与临床分期、肿瘤直径、淋巴结转移、分化程度存在一定关联性,与于丹军等^[11]研究一致,说明 TGF- β 可能参与了从宫颈不典型增生逐渐发展至原位癌、浸润癌的过程,即 TGF- β 与宫颈癌的发生、侵袭、转移密切相关。TGF- β 表达上调一定程度会减弱 SiHa 细胞与基质黏附能力,加快细胞外基质降解,促进肿瘤血管生成,同时其还能促使上皮细胞向具有运动侵袭能力的间质细胞转变,从而导致宫颈癌侵袭、转移^[12]。另外,TGF- β 诊断 CIN 与宫颈癌的 ROC 曲线证实了 TGF- β 有望成为诊断宫颈癌的潜在特异性指标。经 KM 曲线作进一步分析得出,TGF- β 水平异常高表达会增加宫颈癌预后不良风险,可作为宫颈癌患者预后的有效预测因子。

IFN- γ 是 Th1 型细胞因子,具有抗病毒、抗肿瘤免疫作用,可活化巨噬细胞,强化抗原提呈作用,刺激固有免疫系统,促进内皮淋巴细胞相互作用,调控细胞凋亡^[13]。本研究对比 3 组血清 IFN- γ 水平可知,随宫颈病变加重,血清 IFN- γ 水平显著下调,与付艳丽等^[14]等研究相似,说明在抗 HPV 持续感染免疫应答中,Th1 向 Th2 偏移,可加重宫颈病变,且宫颈病变程度不断加重,可逐渐削弱细胞

免疫功能,导致 IFN- γ 水平持续降低或缺失,从而抑制肿瘤坏死因子 α 受体在单核-巨噬细胞表面受体的表达,促使肿瘤细胞内 DNA、RNA 及蛋白质合成,逐渐降低机体抗肿瘤能力^[15]。IFN- γ 在鉴别区分宫颈病变类型方面具有一定诊断价值可见通过检测血清 E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平,可为临床早期诊断宫颈癌提供技术支持。

综上可知,血清 E-cad、IFN- γ 、TGF- β 水平在宫颈癌患者中呈异常表达,并与宫颈癌患者病理特征存在一定相关性,可作为诊断宫颈病变类型、评估宫颈癌患者预后的潜在有效因子。

参考文献

- [1] 牛婧,李娇,李娜,等.人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(6):367-371.
- [2] 胡春杰,周磊,张锦,等.上调 Raf 激酶抑制蛋白的表达对宫颈癌细胞生物学行为的影响[J].国际遗传学杂志,2018,41(2):67-72.
- [3] 杨潇,王艳清,鲜舒,等.活化白细胞黏附分子在宫颈癌中的表达及功能研究[J].医学分子生物学杂志,2016,13(5):267-2710.
- [4] Zhu GJ, Song PP, Zhou H, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2018, 15(3): 3472-3481.
- [5] Feng H, Lu JJ, Wang Y, et al. Osthole inhibited TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) by suppressing NF- κ B mediated Snail activation in lung cancer A549 cells [J]. Cell Adh Migr, 2017, 11(5-6): 464-475.
- [6] 范幸,周燕飞,祖月娥.微 RNA-204 通过调控埃兹蛋白表达影响宫颈癌 Hela 细胞的侵袭性 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(6): 465-469.
- [7] Zhang Z, Zou Y, Liang M, et al. Suppressor of fused (Su-fu) promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cervical squamous cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8

- (69): 114226-114238.
- [8] Kurioka K, Wato M, Iseki T, et al. Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF- β , and E-cadherin in ameloblastoma [J]. *Med Mol Morphol*, 2017, 50(2): 68-75.
- [9] 张鸿艳. 血清 E-cad, TK1 水平及 HPV-DNA 分型检测诊断宫颈癌的临床价值 [J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(19): 4693-4694.
- [10] Ungerleider N, Han C, Zhang J, et al. TGF β signaling confers sorafenib resistance via induction of multiple RTKs in hepatocellular carcinoma cells: TGF β , RTKs, and sorafenib resistance [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(4): 1302-1311.
- [11] 于丹军, 樊静, 胡月, 等. 宫颈癌患者外周血中 CD4+CD25+Foxp3+调节性 T 淋巴细胞及血清中 IL-10、TGF- β 的表达及其临床意义 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(10): 1185-1190.
- [12] Zhang S, Sun WY, Wu JJ, et al. Decreased expression of the type III TGF- β receptor enhances metastasis and invasion in hepatocellular carcinoma progression [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4): 2373-2381.
- [13] Sumonwiriya M, Paris DH, Sunyakumthorn P, et al. Strong interferon-gamma mediated cellular immunity to scrub typhus demonstrated using a novel whole cell antigen ELISpot assay in rhesus macaques and humans [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(9): e0005846.
- [14] 付艳丽, 余杨, 卫玮, 等. 高危型人乳头状瘤病毒载量和 Th1/Th2 不平衡表达预测宫颈癌变进程的研究 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(6): 533-537.
- [15] 李亚伟. 新疆汉族、维吾尔族宫颈癌辅助性 T 细胞相关细胞因子的差异性研究 [D]. *新疆医科大学*, 2016: 1-48.

(上接第 863 页)

总之,本研究发现深圳地区慢性 HCV 感染者重叠 HBV 或 HIV 感染率较高;重叠 HBV 感染的 1b 型患者 HCV RNA 复制减弱,重叠 HIV 感染的患者,各基因型 HCV RNA 滴度无明显变化。

参考文献

- [1] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1335-1374.
- [2] Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009 [J]. *Hepatology*, 2009, 50(3): 661-662.
- [3] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1335-1374.
- [4] 张吉宏,杨宗国,王琳,等. 聚乙二醇干扰素 α -2a 联合利巴韦林治疗乙型和丙型肝炎病毒重叠感染的配对分析 [J]. *中华传染病杂志*, 2019, 34(1): 6-9.
- [5] Zeng WJ, Zhang N, Liu C, et al. Histomorphological characteristics of liver tissue in patients with chronic viral hepatitis [J]. *Chin J Dig Dis*, 2002, 3(1): 18-22.
- [6] 丁淑芬,徐立新,邢海玲,等. HCV 与 HBV 重叠感染者与乙型或丙型肝炎的临床研究 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(4): 295-296.
- [7] Caccamo G, Saffioti F, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection [J]. *World J gastroenterol*, 2014, 20(40): 14559-14567.
- [8] Liu CJ, Chen PJ, Chen DS, et al. Dual chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. *Hepatol int*, 2009, 3(4): 517-525.
- [9] 杨光,杨家红,刘小灵. HCV 重叠感染对慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 复制水平和临床预后影响的探讨 [J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(6): 838.
- [10] Mohsen AH, Easterbrook PJ, Taylor C, et al. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients [J]. *Gut*, 2003, 52(7): 1035-1040.
- [11] 谢青,董志霞,项晓刚. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒共感染的临床特征及治疗 [D]. *内科理论与实践*, 2009, 4(2): 92-95.
- [12] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B [J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(15): 767-770.
- [13] 吴涛,王家健,许小珍,等海南省 163 例汉族 HCV 慢性感染者中的基因型分布 [J]. *中国热带医学*, 2016, 16(9): 873-876.
- [14] 付笑冰,林鹏,李艳,等. 广东省 2005-2013 年丙型肝炎病毒流行特征分析 [J]. *华南预防医学*, 2015, 41(5): 435-438.
- [15] 邓浩辉,李晓强,高洪波,等. HIV/HCV 混合感染者与 HCV 感染者感染 HCV 基因型分析 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2019, 22(5): 656-659.
- [16] 苏文芳,郑振光. 慢性乙型肝炎重叠感染后实验指标的变化 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2008, 7(1): 124.
- [17] 丁淑芬,徐立新,邢海玲,等. HCV 与 HBV 重叠感染者与乙型或丙型肝炎的临床研究 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(4): 295-296.
- [18] Jamma S, Hussain G, Lau DTY, et al. Current concepts of HBV/HCV coinfection: coexistence, but not necessarily in harmony [J]. *Curr hepat rep*, 2010, 9(4): 260-269.
- [19] Schuttler CG, Fiedler N, Schmidt K, et al. Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein [J]. *J hepatol*, 2002, 37(6): 855-862.

· 论 著 ·

LASP1、GSTA3在鼻咽癌组织中的表达及与复发、转移的关系

杜伟一¹ 陈淑莲^{2*} 李国强³

[摘要] 目的 探究LIM和SH3蛋白1(LASP1)、谷胱甘肽硫转移酶A3(GSTA3)在鼻咽癌组织中的表达及与复发、转移的关系。方法 选取本院2012年9月至2016年5月收治的鼻咽癌患者117例作为研究对象,检测对比鼻咽癌患者癌组织、癌旁组织中LASP1、GSTA3 mRNA,比较不同临床特征患者癌组织中LASP1、GSTA3 mRNA,采用Logistic多元回归方程分析LASP1、GSTA3 mRNA与鼻咽癌复发、转移的关系,采用Kaplan-Meier生存曲线分析LASP1、GSTA3 mRNA高危者、低危者生存曲线,采用Pearson分析LASP1、GSTA3 mRNA与无进展生存期(PFS)相关性。结果 癌组织中LASP1 mRNA高于癌旁组织,GSTA3 mRNA低于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$);复发、转移、低分化、IV期鼻咽癌患者LASP1 mRNA高于未复发、转移、中高分化、III期患者,GSTA3 mRNA低于未复发、转移、中高分化、III期患者,差异有统计学意义($P<0.05$);复发、转移鼻咽癌患者LASP1 mRNA高于未复发、未转移患者,GSTA3 mRNA低于未复发、未转移患者,差异有统计学意义($P<0.05$);LASP1、GSTA3 mRNA与鼻咽癌复发、转移显著相关($P<0.05$);复发鼻咽癌患者PFS为31.17个月,转移鼻咽癌患者PFS为8.72个月;复发与转移鼻咽癌患者LASP1 mRNA高表达者PFS短于低表达者,GSTA3 mRNA高表达者PFS长于低表达者,差异有统计学意义($P<0.05$);LASP1 mRNA与PFS呈负相关,GSTA3 mRNA与PFS呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在鼻咽癌组织中,LASP1表达升高,GSTA3表达降低,对肿瘤复发、转移分别起到正负调节作用,并与PFS有关。

[关键词] LASP1; GSTA3; 鼻咽癌; 复发; 转移; 无进展生存期

Analysis of the expression of LASP1 and GSTA3 in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with recurrence and metastasis

DU Weiyi¹, CHEN Shulian^{2*}, LI Guoqiang³

(1. Oncology, Qinhuangdao Harbor Hospital, Qinhuangdao, HeBei, China, 066000; 2. Maritime Medical Safeguard Institute, Armed Police Specialty Medical Center, TianJin, China, 300162; 3. School of Electrical engineering, yanshan university, qinhuangdao, hebei, China, 066004)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) and Glutathione-S-Thiotransferase A3 (GSTA3) in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with recurrence and metastasis. Methods A total of 117 patients with nasopharyngeal carcinoma who were admitted to our hospital from September 2012 to May 2016 were selected as the research objects. Detection and comparison of LASP1 and GSTA3 mRNA in cancer tissue and normal adjacent tissue of patients with nasopharyngeal carcinoma, and comparison of LASP1, GSTA3 mRNA in cancer tissues of patients with different clinical

基金课题:秦皇岛市科技局项目(201602A063);天津市科技计划项目(15ZXLC5Y00040)

作者单位:1. 秦皇岛市海港医院肿瘤科,河北,秦皇岛 066000

2. 武警特色医学中心海上维权医学保障研究所,天津 300162

3. 燕山大学电气工程学院,河北,秦皇岛 066004

*通信作者:陈淑莲, E-mail:purpleky212@163.com

characteristics. Logistic multiple regression equation was used to analyze the relationship between *LASPI*, *GSTA3* mRNA and nasopharyngeal carcinoma recurrence and metastasis, Kaplan-Meier curve (Kaplan-Meier) survival curve was used to analyze the survival curves of high-risk and low-risk individuals with *LASPI*, *GSTA3* mRNA, and Pearson was used to analyze the correlation between *LASPI*, *GSTA3* mRNA and progression-free survival (PFS). **Results** In cancer tissues, *LASPI* mRNA was higher than that in normal adjacent tissues, *GSTA3* mRNA was lower than that in normal adjacent tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In patients with relapse, metastasis, poor differentiation, and stage IV nasopharyngeal carcinoma, the *LASPI* mRNA was higher than that in patients without recurrence, metastasis, moderate and high differentiation, and stage III, *GSTA3* mRNA was lower than that of patients with no recurrence, metastasis, middle and high differentiation, and stage III, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In patients with relapsed or metastatic nasopharyngeal carcinoma, *LASPI* mRNA was higher than that in non-relapsed and metastatic patients, and *GSTA3* mRNA was lower than that in non-relapsed and metastatic patients ($P < 0.05$). *LASPI* and *GSTA3* mRNA were significantly associated with nasopharyngeal carcinoma recurrence and metastasis ($P < 0.05$). the PFS of patients with recurrent nasopharyngeal carcinoma was 31.17 months, and the PFS of patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma was 8.72 months. In patients with relapsed or metastatic nasopharyngeal carcinoma, those with high expression of *LASPI* mRNA had shorter PFS than those with low expression, and those with high expression of *GSTA3* mRNA had PFS longer than those with low expression, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). *LASPI* mRNA was negatively correlated with PFS, and *GSTA3* mRNA was positively correlated with PFS, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** In nasopharyngeal carcinoma tissues, the expression of *LASPI* is increased and the expression of *GSTA3* is decreased, which plays a positive and negative regulatory role on tumor recurrence and metastasis, respectively, and is related to PFS.

[KEY WORDS] *LASPI*; *GSTA3*; Nasopharyngeal carcinoma; Relapse; Metastasis; Progression-free survival

鼻咽癌是十大恶性肿瘤之一,发病率较高^[1]。由于鼻咽解剖位置复杂,不易行手术治疗,且其非角化型癌组织的特性,决定了放化疗是其主要治疗方案,但治疗后复发率较高,加之鼻咽周围毗邻较多重要组织器官,癌细胞易直接侵犯周围软组织,并经血液学途径播散发生远隔部位转移,影响患者预后,因此深入研究鼻咽癌分子水平复发、转移的机制意义重大^[2]。LIM和SH3蛋白1(LIM and SH3protein 1, *LASPI*)是新近发现的一种肌动蛋白结合蛋白和斑粘结合蛋白支架蛋白,在乳腺癌、胰腺癌等恶性肿瘤中过度表达,并与肿瘤发生进展有关,故推测可能在鼻咽癌中亦起到一定作用^[3-4]。谷胱甘肽硫转移酶A3(Glutathione-S-Transferase A3, *GSTA3*)是一种抗氧化酶,能通过抑制微粒体过氧化反应、修复自由基引起的膜磷脂损伤等途径发挥抗氧化作用,近年来发现,*GSTA3*与前列腺癌、胃癌的发生息息相关,但在鼻咽癌领域的研究较少,是否与鼻咽癌复发、转移有关仍有待验证^[5-6]。鉴于此本研究分析*LASPI*、*GSTA3*的表达及与复发、转移的关系,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2012年9月至2016年5月收治的鼻咽癌患者117例作为研究对象进行前瞻性研究,其中女57例,男60例;年龄19~72岁,平均(42.68±11.75)岁;体质量指数20~26 kg/m²,平均(22.29±1.10)kg/m²;肿瘤T分期为Ⅲ期86例,Ⅳ期31例。本研究患者均对研究内容知情,自愿签署知情同意书。

纳入标准:①符合鼻咽癌诊断标准^[7];②组织活检首次确诊;③肿瘤T分期为Ⅲ或Ⅳ期;④电解质、心电图、肝肾功能无明显异常;⑤入组前未接受过放疗等相关治疗;⑥能配合随访;年龄≥18岁。排除标准:①合并其他系统原发性恶性肿瘤者;②入组前1个月有骨折、大型手术史、创伤者;③因各种原因脱落、失访者;妊娠期、哺乳期患者;④有精神病、认知功能障碍者。

1.2 方法

1.2.1 癌组织*LASPI*、*GSTA3*检测

①主要试剂、仪器:紫外分析仪(北京君意东方

电泳设备有限公司 JY02S 型);电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表有限公司 HW-SY11-K P2 型);实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司 QuantStudio 6 型);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司 DHG 9203A 型);PCR 试剂盒(美国 genecopoeia 公司);引物合成(北京擎科生物科技有限公司)。

②检测方法:采用实时荧光定量 PCR 检测 *LASPI*、*GSTA3* mRNA, Trizol 法提取 RNA, 逆转录反应逆转录成 cDNA, 取上述 cDNA 4 μ L, 加入上下游引物各 0.4 μ L、SYBR Green(荧光插入染料)/荧光素 qPCR 预混液 10 μ L、水 5.2 μ L, 进行实时荧光定量 PCR, 反应条件 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec, 40 cycles, 最终数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。

1.2.2 治疗方案

入组者均接受顺铂+紫杉醇诱导化疗 3 个周期, 之后均行 3 个周期同期放疗。①诱导化疗方法: 顺铂(广东岭南制药有限公司, 国药准字 H20183341) 75 mg/m², d 1~3, 静滴; 紫杉醇(齐鲁制药(海南)有限公司, 国药准字 H20193309) 135 mg/m², d 1, 21 d 为一个化疗周期, 共 3 个周期; ②放疗方法: 采用三维调强适形放疗技术, 1 次/d, 每周 5 次为 1 个周期。③同期化疗方法: 顺铂 100 mg/m², d 1~3, 共 3 个周期。

1.3 观察指标

比较癌组织、正常癌旁组织中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA。比较不同临床特征患者癌组织中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA。分析 *LASPI* mRNA 与 *GSTA3* mRNA 相关性。分析 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与鼻咽癌复发、转移的关系。分析复发与转移鼻咽癌患者无进展生存期(PFS)。分析 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与 PFS 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、*t* 检验, 非正态分布资料(PFS)采用中位数表示, 采用非参数秩和检验(Wilcoxon), 计数资料用 *n*(%)表示、 χ^2 检验, 采用 Logistic 多元回归方程分析 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与鼻咽癌复发、转移的关系, 采用卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier, KM)生存曲线分析、Log Rank(Mantel-Cox)检验 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 高危者、低危者生存曲线, 采用 Pearson 分析 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与 PFS 相关性。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织、癌旁组织中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA

癌组织中 *LASPI* mRNA 高于正常癌旁组织, *GSTA3* mRNA 低于正常癌旁组织, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 见表 1。癌组织中 *LASPI* 蛋白表达高于正常癌旁组织, *GSTA3* 蛋白表达低于正常癌旁组织, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 见图 1。

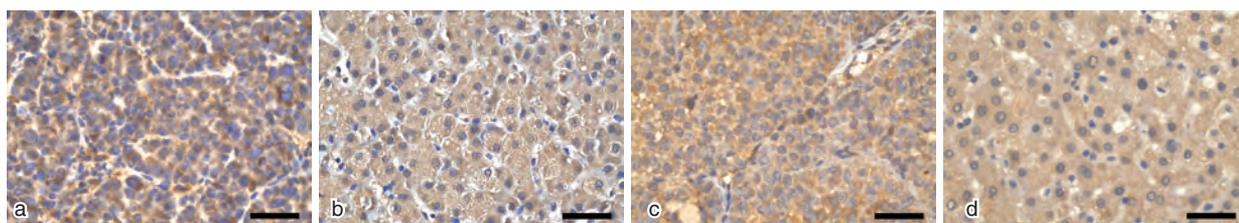
表 1 两组中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of *LASPI* and *GSTA3* mRNA in cancer of 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	<i>LASPI</i> mRNA	<i>GSTA3</i> mRNA
癌组织	117	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03
正常癌旁组织	117	0.03 \pm 0.01	0.24 \pm 0.07
<i>t</i> 值		30.785	18.464
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 不同临床特征患者癌组织中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA

复发、转移、低分化、IV 期鼻咽癌患者 *LASPI* mRNA 高于未复发、转移、中高分化、III 期患者, *GSTA3* mRNA 低于未复发、转移、中高分化、III 期患者, 差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。



注: a. 鼻咽癌组织 *LASPI* 蛋白表达; b. 鼻咽癌组织癌旁 *LASPI* 蛋白表达; c. 鼻咽癌组织 *GSTA3* 蛋白表达; d. 鼻咽癌组织癌旁 *GSTA3* 蛋白表达。

图 1 癌组织、正常癌旁组织中 *LASPI*、*GSTA3* 蛋白表达 ($\times 300$)

Fig 1 Expression of *laspi* and *gsta3* proteins in cancer tissues and normal adjacent tissues ($\times 300$)

表2 不同临床特征患者癌组织中 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of *LASPI* and *GSTA3* mRNA in cancer tissues of patients with different clinical characteristics ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	<i>n</i>	<i>LASPI</i> mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>GSTA3</i> mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
复发情况	复发	32	0.15±0.04	5.845	0.09±0.02	5.229	<0.001
	未复发	85	0.11±0.03				
转移情况	转移	28	0.17±0.05	10.810	0.08±0.02	5.084	<0.001
	未转移	89	0.10±0.02				
分化程度	低分化	42	0.16±0.04	9.182	0.07±0.02	11.588	<0.001
	中高分化	75	0.10±0.03				
临床分期	Ⅲ期	46	0.08±0.02	11.000	0.16±0.05	12.093	<0.001
	Ⅳ期	71	0.15±0.04				

2.3 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与鼻咽癌复发、转移的关系

鼻咽癌复发、转移显著相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

Logistic 回归分析,*LASPI*、*GSTA3* mRNA 与鼻

表3 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与鼻咽癌复发、转移的关系

Table 3 Relationship between *LASPI*, *GSTA3* mRNA and recurrence and metastasis of nasopharyngeal carcinoma

临床特征	变量	β 值	<i>S.E.</i> 值	<i>Wald</i> / χ^2 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
复发	<i>LASPI</i> mRNA	1.485	0.449	10.942	4.416	2.741~7.115	<0.001
	<i>GSTA3</i> mRNA	-0.788	0.216	13.310	0.455	0.229~0.903	<0.001
转移	<i>LASPI</i> mRNA	1.704	0.442	14.865	5.497	3.279~9.214	<0.001
	<i>GSTA3</i> mRNA	-0.654	0.203	10.366	0.520	0.302~0.896	<0.001

2.4 复发与转移鼻咽癌患者 PFS

Kaplan-Meier 曲线分析,复发鼻咽癌患者 PFS 为 31.17 个月,未复发鼻咽癌患者 PFS 为 38.26 个月,转移鼻咽癌患者 PFS 为 8.72 个月,未转移鼻咽癌患者 PFS 为 41.12 个月。根据复发与转移鼻咽癌患者 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 表达均数为界,分为高表达者、低表达者。Kaplan-Meier 曲线分析,复发与转移鼻咽癌患者 *LASPI* mRNA 高表达者 PFS (28.74 个月、7.13 个月)短于低表达者(35.22 个月、12.70 个月),*GSTA3* mRNA 高表达者 PFS (35.71 个月、12.24 个月)长于低表达者(27.83 个月、6.44 个月)($P < 0.05$)。见图1。

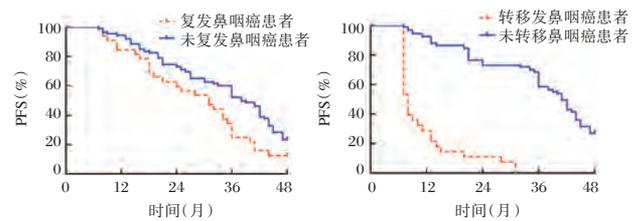
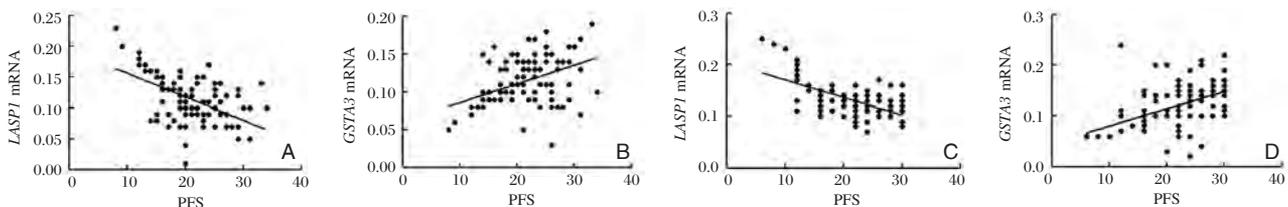


图1 生存曲线

Figure 1 Survival curve

2.5 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与 PFS 相关性

Pearson 相关性分析,*LASPI* mRNA 与 PFS 呈负相关,*GSTA3* mRNA 与 PFS 呈正相关($r_1=0.442$, $r_2=0.501$, $P < 0.001$)($P < 0.05$),图2。



注:A 为 *LASPI* 与复发鼻咽癌患者 PFS 相关性; B 为 *GSTA3* mRNA 与复发鼻咽癌患者 PFS 相关性; C 为 *LASPI* 与转移鼻咽癌患者 PFS 相关性; D 为 *GSTA3* mRNA 与转移鼻咽癌患者 PFS 相关性。

图2 *LASPI*、*GSTA3* mRNA 与复发、转移鼻咽癌患者 PFS 相关性

Figure 2 Correlation between *LASPI* and *GSTA3* mRNA and PFS in patients with relapsed or metastatic nasopharyngeal carcinoma

3 讨论

我国是鼻咽癌高发地区之一,现有放化疗综合干预模式下,局部复发与远处转移是治疗失败的主要原因,因此积极探寻鼻咽癌复发、转移相关重要分子,为临床提供新的作用靶点,对药物研发、深入了解癌细胞恶性生物学行为等至关重要^[8]。

LASPI 定位于染色体 17q21 区域,存在于伪足、黏着斑等周围,含有两段伴肌动蛋白样重复序列,能通过结合黏着斑蛋白 Kip1,调控细胞黏附、伪足延伸及细胞运动^[9-10]。本研究发现,LASPI 与鼻咽癌发生有关,并对肿瘤复发、转移起到促进作用,可影响患儿 PFS。余俊等^[11]报道发现,子宫内膜癌组织中 LASPI 蛋白阳性表达率高于正常人群,与肌层浸润和淋巴结转移有关,本研究观点与之相似。在肝癌中,上调 LASPI 表达促进了肝细胞在体外和体内的增殖、迁移和侵袭^[12]。在口腔鳞状细胞癌细胞中,通过慢病毒构建 LASPI 沉默模型,发现口腔鳞状细胞癌细胞系的增殖、转移和侵袭受到抑制,并能将细胞阻滞在 G2/M 周期,而 LASPI 过表达可减弱微小 RNA-342-3p 对口腔鳞状细胞增殖的抑制作用^[13]。关于 LASPI 参与恶性肿瘤生物学行为的机制尚未完全阐明,结合资料推测,LASPI 能通过激活 PI3K/AKT 通路调控癌细胞增殖、转移,并影响患者预后^[14]。亦有观点指出,LASPI 还能通过影响肿瘤对化疗的敏感性促进肿瘤的复发、转移^[15]。

鼻咽癌的发生是遗传、环境、病毒感染等多种因素相关作用的结果,不同个体对病毒感染、环境中有害物质、致癌物解毒能力的异质性,影响了个体对鼻咽癌的易感性。GSTA3 是谷胱甘肽硫转移酶家族成员之一,是体内生物转化 II 结合反应中重要的代谢酶,拥有防止脂质过氧化损伤扩大、修复 DNA 损伤等多种生物学功能,参与机体的解毒。本研究发现,GSTA3 转录水平在鼻咽癌发生中扮演了抑癌因子角色,可能对鼻咽癌复发、转移起到抑制作用。GSTA3 mRNA 与鼻咽癌复发、转移显著相关,证实 GSTA3 在鼻咽癌复发、转移中起到保护作用。但遗憾的是,现阶段尚不清楚 GSTA3 调控鼻咽癌复发、转移的分子机制,仍需更多基础实验和临床研究的探索,这亦是本研究不足所在。

综上所述,在鼻咽癌组织中,LASPI 表达升高,GSTA3 表达降低,对肿瘤复发、转移分别起到正负调节作用,并与 PFS 有关。

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] 刘园源,张斌,李靖.比较 TP 方案与 GP 方案诱导化疗对局部晚期鼻咽癌患者的疗效及生存质量[J].热带医学杂志,2020,20(2):225-228.
- [3] Wang A, Dai H, Gong Y, et al. ANLN-induced EZH2 up-regulation promotes pancreatic cancer progression by mediating miR-218-5p/LASPI signaling axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019,38(1):347.
- [4] Butt E, Stempfle K, Lister L, et al. Phosphorylation-Dependent Differences in CXCR4-LASPI-AKT1 Interaction between Breast Cancer and Chronic Myeloid Leukemia [J]. Cells, 2020,9(2):E444.
- [5] Duan S, Gong B, Wang P, et al. Novel prognostic biomarkers of gastric cancer based on gene expression microarray: COL12A1, GSTA3, FGA and FGG [J]. Mol Med Rep, 2018,18(4):3727-3736.
- [6] 王鹏桥,郑人源,杨雷.血清中前列腺特异性抗原、谷胱甘肽 S-转移酶水平与前列腺癌的相关性分析[J].成都医学院学报,2019,14(05):597-600.
- [7] Chan AT, Grégoire V, Lefebvre JL, et al. Nasopharyngeal cancer: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2012, 23 (Supplement 7):viii83-viii85.
- [8] 陈佳.血浆 EB 病毒 DNA 监测鼻咽癌远期预后的研究进展[J].检验医学与临床,2018,15(4):571-573.
- [9] Li H, Liu G, Pan K, et al. Methylation-induced downregulation and tumor suppressive role of microRNA-29b in gastric cancer through targeting LASPI [J]. Oncotarget, 2017, 8 (56):95880-95895.
- [10] Zhang X, Liu Y, Fan C, et al. Laspi promotes malignant phenotype of non-small-cell lung cancer via inducing phosphorylation of FAK-AKT pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8 (43):75102-75113.
- [11] 余俊,刘彤鸥,李晓兰.子宫内膜癌组织 LASPI 表达与预后相关性[J].中华肿瘤防治杂志,2018,25(21):1491-1494,1499.
- [12] Yin L, Chen Y, Zhou Y, et al. Increased long noncoding RNA LASPI-AS is critical for hepatocellular carcinoma tumorigenesis via upregulating LASPI [J]. J Cell Physiol, 2019,234(8):13493-13509.
- [13] Song X, Jin Y, Yan M, et al. MicroRNA-342-3p functions as a tumor suppressor by targeting LIM and SH3 protein 1 in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2019,17(1):688-696.
- [14] Zhou R, Shao Z, Liu J, et al. COPS5 and LASPI synergistically interact to downregulate 14-3-3σ expression and promote colorectal cancer progression via activating PI3K/AKT pathway[J]. Int J Cancer, 2018,142(9):1853-1864.
- [15] Zhong C, Chen Y, Tao B, et al. LIM and SH3 protein 1 regulates cell growth and chemosensitivity of human glioblastoma via the PI3K/AKT pathway [J]. BMC Cancer, 2018, 18 (1):722.

let-7d-5p 调控 HPV16 阳性宫颈癌细胞侵袭、迁移及凋亡的分子机制

张鹏飞¹ 周保成¹ 周哲² 朱美玲² 戚耀之^{1*}

[摘要] 目的 研究 let-7d-5p 对人乳头瘤病毒相关宫颈癌细胞迁移侵袭和凋亡的影响机制。方法 运用 RT-qPCR 法检测人正常宫颈上皮细胞 HcerEpic、人乳头瘤病毒相关宫颈鳞癌细胞 Caski 中 let-7d-5p、IL-10 的表达;将 miR-NC 组(转染 miR-NC)、let-7d-5p 组(转染 let-7d-5p mimics)、anti-miR-NC 组(转染 anti-miR-NC)、anti-let-7d-5p 组(转染 anti-let-7d-5p)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-IL-10 组(转染 si-IL-10)、let-7d-5p+pc DNA 组(共转染 let-7d-5p mimics 和 pc DNA)、let-7d-5p+pc DNA-IL-10 组(共转染 let-7d-5p mimics 和 pc DNA-IL-10),均用脂质体法转染至 Caski 细胞;通过 Western blot、Transwell 小室、流式细胞术检测细胞中 IL-10 蛋白表达、细胞迁移侵袭及凋亡;双荧光素酶报告基因检测细胞 let-7d-5p、IL-10 的结合力。**结果** 与人正常宫颈上皮细胞 HcerEpic 相比,人乳头瘤病毒相关宫颈鳞癌细胞 Caski 中 let-7d-5p 表达显著降低,IL-10 的表达显著升高($P<0.05$);过表达 let-7d-5p、敲减 IL-10 均可抑制 Caski 细胞迁移侵袭,促进凋亡;let-7d-5p 可抑制野生型 IL-10 细胞的荧光活性,并抑制 IL-10 的蛋白表达($P<0.05$)。过表达 IL-10 可逆转 let-7d-5p 对 Caski 细胞的迁移侵袭抑制和凋亡促进作用($P<0.05$)。**结论** let-7d-5p 可抑制人乳头瘤病毒相关宫颈鳞癌细胞的迁移侵袭,促进凋亡,其机制与靶向 IL-10 有相关性。

[关键词] let-7d-5p; IL-10; 宫颈癌; 迁移侵袭; 凋亡

Molecular mechanism of let - 7d - 5p regulating invasion, migration and apoptosis in HPV16-positive cervical cancer cells

ZHANG Pengfei¹, ZHOU Baocheng¹, ZHOU Zhe², ZHU Meiling², QI Yaozhi^{1*}

(Lianyungang Maternal and Child Health Hospital. Clinical Laboratory, Lianyungang, Jiangsu, China, 222000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of let-7d-5p on migration, invasion and apoptosis of human papillomavirus-associated cervical cancer cells. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of let-7d-5p and IL-10 in human cervical epithelial cells HcerEpic and human papillomavirus-associated cervical squamous carcinoma cells Caski; the miR-NC group (transfected miR-NC), let-7d-5p group (transfected let-7d-5p mimics), anti-miR-NC group (transfected anti-miR-NC), anti-let-7d-5p group (transfected anti-let-7d-5p), si-NC group (transfected si-NC), si-IL-10 group (transfected si-IL-10), let-7d-5p+pc DNA group (co-transfected let-7d-5p mimics and pc DNA), let-7d-5p+pc DNA-IL-10 group (co-transfected let-7d-5p mimics and pc DNA-IL-10), all transfected into Caski cells by liposome method; Western blot was used to detect the expression of IL-10 protein in cells; Transwell chamber was used to detect cell migration and invasion; flow cytometry was used to detect apoptosis; dual luciferase reporter gene assay was used to detect cell fluorescence activity. **Results** Compared with human normal cervical epithelial cells HcerEpic, the expression of let-7d-5p in human papillomavirus-associated cervical squamous carcinoma cells was significantly decreased, IL-10

基金项目:江苏省妇幼健康科研项目(F201918)

作者单位:连云港妇幼保健院检验科,江苏,连云港 222000

*通信作者:戚耀之, E-mail:372055430@qq.com

(注:张鹏飞和周保成为并列第一作者)

expression was significantly increased ($P < 0.05$); over-expression of let-7d-5p, knocking Down IL-10 can inhibit the migration and invasion of Caski cells and promote apoptosis ($P < 0.05$); let-7d-5p can inhibit the fluorescence activity of wild-type IL-10 cells and inhibit the protein expression of IL-10. Overexpression of IL-10 reversed the migration inhibition and apoptosis-promoting effects of let-7d-5p on Caski cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Let-7d-5p can inhibit the migration and invasion of human papillomavirus-associated cervical squamous carcinoma cells and promote apoptosis. The mechanism may be related to the targeting of IL-10, which will provide a new target for the treatment of cervical cancer.

[KEY WORDS] let-7d-5p; IL-10; Cervical cancer; Migration invasion; Apoptosis

宫颈癌是世界上第二大常见的女性恶性肿瘤,其在发展中国家的妇科肿瘤中排第二位^[1]。目前的研究表明宫颈癌与高危型人乳头瘤病毒(High risk human papillomavirus, HPV)的感染密切相关,但仍有大量宫颈癌患者未感染 HPV,这表明其他因素如细胞遗传变化也可导致疾病进展^[2-3]。宫颈癌的主要治疗方法是手术(包括盆腔淋巴结切除术和根治性子官切除术)、放疗和化疗。近年来,靶向治疗正成为研究热点,目前主要用于治疗宫颈癌的靶向治疗是针对 EGFR^[4]和 COX-2 基因^[5]。人类白细胞介素 10(Human interleukin 10, IL-10)在多种癌症中均具有促进癌症进一步恶化的作用,包括宫颈癌^[6]。本研究将检测其中 let-7d-5p、IL-10 的表达,观察过表达 let-7d-5p、敲减 IL-10、过表达 IL-10 对 Caski 细胞迁移侵袭和凋亡的影响,揭示其机制与 let-7d-5p 靶向抑制 IL-10 有关,为宫颈癌的精准治疗提供靶标参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常子宫颈上皮细胞 HcerEpic、人乳头瘤病毒相关宫颈鳞癌细胞 Caski(美国菌种保存中心); DMEM 培养基(Gibco); 胎牛血清(杭州四季青); 胰蛋白酶(美国 Sselect 公司); Lipofectamine™2000(美国 Invitrogen); 逆转录试剂盒(大连 Takara); PVDF 膜(上海安普公司); SDS-PAGE 试剂盒(北京 Leagene)、ECL 发光液和 RIPA 蛋白裂解液(碧云天); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega); Matrigel 基质胶(美国 BD); Transwell 小室(美国 Corning); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将人正常子宫颈上皮细胞 HcerEpic、人乳头瘤病毒相关宫颈鳞癌细胞 Caski 使用 DMEM 培养基

(含 10% 胎牛血清)培养,在常规细胞培养箱(37℃, 5% CO₂, 95% O₂)中培养,每 2 d 传代一次。

1.2.2 细胞的转染与分组

将正常培养的 Caski 细胞随机分为 miR-NC 组(转染 miR-NC)、let-7d-5p 组(转染 let-7d-5p mimics)、anti-miR-NC 组(转染 anti-miR-NC)、anti-let-7d-5p 组(转染 anti-let-7d-5p)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-IL-10 组(转染 si-IL-10)、let-7d-5p+pc DNA 组(共转染 let-7d-5p mimics 和 pc DNA)、let-7d-5p+pc DNA-IL-10 组(共转染 let-7d-5p mimics 和 pc DNA-IL-10),将合成的 DNA 与 3 倍体积的培养液稀释混匀,取 100 μL 加入需转染的细胞,培养约 4~6 h 后,更换新鲜培养基培养 48 h,最后通过 RT-qPCR 实验检测转染效率。

1.2.3 RT-qPCR 法检测细胞中 let-7d-5p、IL-10 的 mRNA 表达

Trizol 法提取细胞 RNA,并用紫外吸光法进行定量。迅速进行逆转录反应,以免 RNA 发生降解,采用逆转录试剂盒,操作按照试剂盒说明书进行,合成模板链 cDNA。每个样品重复 3 次,取平均值,反应结束后通过比较 Ct 值,以 U6、GAPDH 作为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的值,测定 let-7d-5p、IL-10 的相对表达水平。逆转录反应体系为 20 μL,设置反应条件为 55℃, 30 min; 85℃, 5 min; 4℃, 5 min, 结束后即为 cDNA。RT-qPCR 反应体系为 20 μL,设置反应条件为: 94℃, 2 min; 94℃, 30 min; 58℃, 30 s; 72℃, 30 s, 延伸温度 72℃, 2 min, 45 个循环。

1.2.4 Western blot 检测细胞中 IL-10 的蛋白表达

收集适量细胞, PMSF 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法进行总蛋白定量, 再进行沸水浴变性 10 min, 离心后取上清进行蛋白电泳、转膜、孵育(一抗和二抗)。Quantity One 4.62 分析目的蛋白 IL-10 的灰度值。

1.2.5 Transwell 小室检测细胞的迁移侵袭

将 Transwell 小室置于孔上, 放入细胞培养箱

平衡 30 min。然后将各组细胞消化,用 DMEM 培养基配制成 5×10^5 个/mL 的细胞悬液。每个小室加入 200 μ L 细胞悬液,即每孔细胞约为 1×10^5 个,将 24 孔板置于细胞培养箱培养 24 h,小心取出小室,擦去上室下表面发生迁移的细胞,用 PBS 清洗、甲醇固定(25 min)。最后用结晶紫染液(1 g/L)进行染色处理 15~20 min,用 PBS 清洗。最后在倒置显微镜下观察拍照,随机选取 5 个视野分别计数、拍照,取平均值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞,消化后用结合缓冲液调整细胞至 10^6 个/mL,每孔加入 100 μ L 细胞液,再加入 Annexin V-FITC(5 μ L)、PI(10 μ L)避光反应 15 min,结束后快速上流式细胞仪分析凋亡情况。

1.2.7 荧光素酶报告检测细胞 let-7d-5p、IL-10 结合力

采用在线靶基因预测库 Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) 检测到 let-7d-5p 与 IL-10 3' UTR 存在结合位点,为了验证这一预测,将 IL-10 3'-UTR-WT(含 IL-10 3'-UTR 片段)和 IL-10 3'-UTR-MUT(含 IL-10 3'-UTR 突变体片段)的荧光素酶报告载体,并将其与 let-7d-5p mimics、miR-NC 共转染 48 h 后,用双重荧光素酶测定法检测萤火虫和海肾的荧光活性,以判定 let-7d-5p 与 IL-10 是否具有结合力。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间多重比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 let-7d-5p、IL-10 在宫颈癌细胞中的表达

与 HcerEpic 组相比,Caski 组细胞中 let-7d-5p mRNA 表达显著降低,IL-10 mRNA 和蛋白表达均显著升高差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

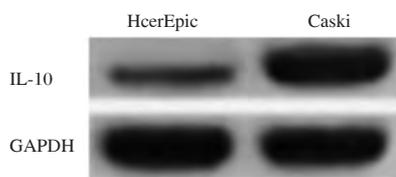


图 1 IL-10 在宫颈癌细胞中的蛋白表达
Figure 1 IL-10 protein expression in cervical cancer cells

表 1 let-7d-5p、IL-10 在宫颈癌细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	let-7d-5p	IL-10	IL-10
HcerEpic 组	1.00±0.06	1.00±0.07	1.00±0.05
Caski 组	0.31±0.03 ^a	2.86±0.02	1.68±0.01
<i>t</i> 值	30.858	76.647	40.008
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.2 let-7d-5p 过表达对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

与 miR-NC 组相比,let-7d-5p 组细胞中 let-7d-5p 表达显著升高,迁移细胞数和侵袭细胞数均显著降低,细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 过表达 let-7d-5p 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	let-7d-5p	细胞数(个)		凋亡率
		迁移	侵袭	
miR-NC 组	0.99±0.05	99±7	75±7	6.56±0.46
let-7d-5p 组	4.12±0.04	51±5	35±3	18.18±1.02
<i>t</i> 值	146.647	16.740	15.757	31.155
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 let-7d-5p 靶向 IL-10

通过生物信息学软件 Target Scan 分析得到,let-7d-5p 可以与 IL-10 的 3'-UTR 相互结合见图 2;荧光素酶报告结果显示,与 miR-NC 组相比,过表达 let-7d-5p 的 WT-3'-UTR-IL-10 细胞的荧光素酶活性异常降低($P < 0.05$),见表 3;与 miR-NC 组相比,过表达 let-7d-5p 的细胞中 IL-10 的表达明显降

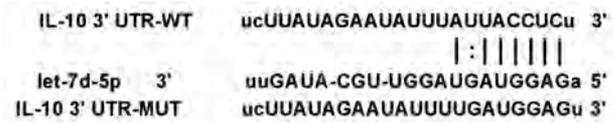


图 2 let-7d-5p 与 IL-10 的靶向结合位点
Figure 2 Target binding sites of let-7d-5p and IL-10

表 3 双荧光素酶报告基因检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	WT-IL-10	MUT-IL-10
miR-NC 组	1.00±0.09	1.00±0.08
let-7d-5p 组	0.22±0.01	0.99±0.06
<i>t</i> 值	25.841	0.300
<i>P</i> 值	0.000	0.768

低,与 anti-miR-NC 组相比,抑制 let-7d-5p 的细胞中 IL-10 表达则异常升高($P<0.05$)。见图 3,表 4。



图 3 IL-10 的蛋白表达

Figure 3 IL-10 protein expression

表 4 let-7d-5p 对 IL-10 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 4 Effect of let-7d-5p on IL-10 expression ($\bar{x}\pm s, n=9$)

分组	IL-10 protein
anti-miR-NC 组	1.00±0.12
anti-let-7d-5p 组	5.09±0.52
miR-NC 组	1.00±0.11
let-7d-5p 组	0.21±0.02
F 值	590.503
P 值	0.000

2.4 敲减 IL-10 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

与 si-NC 组相比, si-IL-10 组细胞中 IL-10 蛋白表达显著降低, 迁移细胞数和侵袭细胞数均显著降低, 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。见表 5。

表 5 敲减 IL-10 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 5 Effect of knockdown of IL-10 on migration, invasion and apoptosis of cervical cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	IL-10 protein	细胞数(个)		凋亡率
		迁移	侵袭	
si-NC	0.99±0.05	100±9	85±8	8.35±0.78
si-IL-10	0.22±0.02 ^a	46±4	33±3	18.02±1.01
t 值	42.896	16.449	18.258	22.733
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.5 过表达 IL-10 逆转 let-7d-5p 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响

与 let-7d-5p+pc DNA 组相比, let-7d-5p+pc DNA-IL-10 组细胞中 let-7d-5p 表达显著降低, 迁移细胞数和侵袭细胞数均显著升高, 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。见表 6。

3 讨论

miRNA 在人类各种癌症的发生发展中作为致

表 6 过表达 IL-10 逆转 let-7d-5p 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 6 Overexpression of IL-10 reverses the effect of let-7d-5p on migration, invasion and apoptosis of cervical cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	let-7d-5p	细胞数(个)		凋亡率
		迁移	侵袭	
let-7d-5p	1.00±0.08	52±5	31±3	18.97±1.24
let-7d-5p+pc DNA	0.99±0.05	50±5	32±3	18.02±1.36
let-7d-5p+pc DNA-IL-10	0.22±0.02	85±6	64±6	9.88±0.48
F 值	581.323	121.291	176.167	186.327
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

癌基因或抑癌基因发挥调控作用,对靶基因的调控作用是肿瘤发生发展的关键^[7]。Honegger 等^[8]在 HPV 诱导的宫颈癌的研究中发现,在 HeLa 细胞分泌的外泌体中,最丰富的 miRNA 中鉴定出明显的 7 个 miRNA,其中 let-7d-5p、miR-20a-5p、miR-378a-3p、miR-423-3p 显著下调,miR-7-5p、miR-92a-3p 和 miR-21-5p 的上调,这几种依赖 E6 / E7 的外泌体 miRNA 也与细胞增殖和凋亡有关,该研究提示病毒致癌基因的表达可影响 miRNA 的表达,这些 miRNA 也可能影响 HPV 阳性宫颈癌细胞的生长。Zheng 等^[9]在宫颈癌的研究中发现,Let-7d-3p、Let-7a-3p 的表达均显著降低,并且这与其在血浆样品中的表达相一致,揭示血浆外泌体 let-7d-3p 是用于宫颈癌及其前体的非侵入性筛选的有价值的诊断生物标志物。本研究进一步发现,过表达 let-7d-5p 可抑制 Caski 细胞迁移侵袭,促进凋亡,这是国内外首次公开报道 let-7d-5p 在宫颈癌细胞中的抑制迁移侵袭,促进凋亡作用,为开发 let-7d-5p 在宫颈癌中的诊断、治疗潜力提供充分的理论依据。

IL-10 可通过抑制抗肿瘤抑制因子产生、抑制巨噬细胞的吞噬、利于肿瘤的生长扩散,发挥促进癌症的进一步恶化作用^[10]。Berti 等^[11]报道,宫颈癌中 IL-10 水平倾向于与鳞状上皮病变发展而增加,并且在宫颈肿瘤中含量甚至更高,有数据显示,HPV 感染后,由于 HPV E2、E6 和 E7 蛋白对 IL-10 基因转录的促进作用,IL-10 水平增强,而 IL-10 刺激 HPV E6 和 E7 表达,因此 HPV 和 IL-10 之间的这种相互作用产生了恶性循环,可能有利于子宫中的免疫抑制微环境,促进 HPV 感染的上皮细胞进展为宫颈癌。Min 等^[12]在研究中结果揭示联

合检测 IL-10 和 HPV 感染可改善宫颈上皮内瘤变和早期宫颈癌的诊断。

综上所述, let-7d-5p 可抑制宫颈癌细胞迁移侵袭, 促进凋亡, 其机制可能是通过靶向并调控 IL-10 表达有关, 本研究结果为宫颈癌的治疗提供了新靶点研究方向。

参考文献

- [1] 康乐. 中西医结合对宫颈癌术后患者肿瘤转移的防治作用[J]. 中医学报, 2020, 35(7): 1543-1546.
- [2] Wentzensen N, Arbyn M. HPV-based cervical cancer screening- facts, fiction, and misperceptions[J]. Prev Med, 2017, 98(5): 33-35.
- [3] Kim JY, Byun SJ, Kim YS, et al. Disease courses in patients with residual tumor following concurrent chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2017, 144(1): 34-39.
- [4] Hertlein L, Lenhard M, Kirschenhofer A, et al. Cetuximab monotherapy in advanced cervical cancer: a retrospective study with five patients[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(1): 109-113.
- [5] Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6): 5083-5093.
- [6] Zhao S, Wu D, Wu P, et al. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta - Analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139598.
- [7] Tutar Y. miRNA and cancer; computational and experimental approaches[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(5): 429-429.
- [8] 郭琪, 姚昶, 郭宇飞. 血清 IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 在乳腺肿瘤定性诊断中价值及与预后相关性研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 336-339+348.
- [9] Zheng M, Hou L, Ma Y, et al. Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors [J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 76-84.
- [10] Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 367(2): 103-107.
- [11] Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM, et al. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 34(1): 1-13.
- [12] Min Z, Pu X, Gu Z. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection [J]. Oncol Lett, 2018, 16(6): 7189-7194.
- [8] Gong J, Chehrazhi-Raffle A, Reddi S, et al. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations[J]. J Immunother of Cancer, 2018, 6.
- [9] Zhou JH, Shen Q, Lin HQ, et al. Decitabine shows potent anti-myeloma activity by depleting monocytic myeloid-derived suppressor cells in the myeloma microenvironment [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(2): 329-336.
- [10] Perez Ruiz C, Botta C, Zabaleta A, et al. Detailed Phenotypic, Molecular and Functional Profiling of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) in the Tumor Immune Micro-Environment (TIME) of Multiple Myeloma (MM) [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2019, 19(10): E97-E98.
- [11] Sawant A, Deshane J, Jules J, et al. Myeloid-derived suppressor cells function as novel osteoclast progenitors enhancing bone loss in breast cancer [J]. Cancer res, 2013, 73(2): 672-682.
- [12] Crook KR, Jin MY, Weeks MF, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate T cell and B cell responses during autoimmune disease [J]. J Leukoc Biol, 2015, 97(3): 573-582.
- [13] Utrero-Rico A, Laguna-Goya R, Cano-Romero F, et al. Early Posttransplant Mobilization of M-MDSC Correlates with Increase in Soluble Immunosuppressive Factors and Predicts Cancer in Kidney Recipients [J]. Transplantation, 2020.
- [14] Ohki S, Shibata M, Gonda K, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer [J]. Oncol Rep, 2012, 28(2): 453-458.

(上接第 877 页)

· 论 著 ·

RNAi 下调 CCT8 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞转移潜能

朱迎伟* 褚旭 邱家勇 孙瑜霞 毛毅敏

[摘要] 目的 探讨RNAi下调CCT8对非小细胞肺癌A549细胞转移潜能的影响。方法 A549细胞分为Control组、si-NC组、si-CCT8组、si-CCT8+IGF-1组,MTT方法测定细胞增殖,Transwell小室测定细胞侵袭和迁移,Western blot测定MMP-9、Vimentin、E-cadherin和p-Akt蛋白表达。结果 与si-NC组相比,si-CCT8组细胞A值显著降低($P<0.05$),细胞侵袭和迁移数量显著降低;与si-NC组相比,si-CCT8组MMP-9、Vimentin、p-Akt蛋白表达水平显著降低,E-cadherin蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与si-CCT8组相比,si-CCT8+IGF-1组细胞A值、侵袭、迁移数量显著升高($P<0.05$)。结论 RNAi下调CCT8抑制非小细胞肺癌A549细胞转移潜能,其作用机制与下调Akt信号激活程度有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; CCT8; Akt信号

RNAi down-regulates CCT8 to inhibit the metastatic potential of non-small cell lung cancer A549 cells

ZHU Yingwei*, CHU Xu, QIU Jiayong, SUN Yuxia, MAO Yimin

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of RNAi down-regulation of CCT8 on the metastatic potential of non-small cell lung cancer A549 cells. Methods A549 cells were divided into Control group, si-NC group, si-CCT8 group, si-CCT8+IGF-1 group. MTT assay was used to measure cell proliferation, Transwell was used to measure cell invasion and Migration, Western blot was used to measure MMP-9, Vimentin, E-cadherin and p-Akt protein expression. Results Compared with si-NC group, the A value was significantly decreased, and the number of cell invasion and migration were significantly decreased in si-CCT8 group. Compared with si-NC group, the protein expression levels of MMP-9, Vimentin, p-Akt were significantly decreased, E-cadherin was significantly increased in si-CCT8 group ($P<0.05$). Compared with si-CCT8 group, the cell A value, the number of invasion, migration were significantly increased. Conclusion RNAi down-regulates CCT8 to inhibit the metastatic potential of non-small cell lung cancer A549 cells, and its mechanism is related to down-regulation of Akt signaling.

[KEY WORDS] non-small cell lung cancer; CCT8; Akt signaling; RNAi

肺癌大多数起源于支气管黏膜上皮,是最为常见的肺组织原发性恶性肿瘤,肺癌中有80%的患者属于非小细胞肺癌,研究非小细胞肺癌发生机

制对于靶向基因治疗肺癌具有重要意义^[1]。含有TCP1伴侣蛋白亚基8(Chaperonin containing TCP1, subunit 8, CCT8)是一种在生命体内存在的

基金项目:河南省医学科技攻关计划(联合共建项目)(2018020285);洛阳市青年医学科技创新联合专项基金项目(1503008A-8)

作者单位:河南科技大学第一附属医院呼吸与危重症医学科,河南,洛阳 471000

*通信作者:朱迎伟, E-mail:zhuyingwei1975@126.com

分子伴侣,参与DNA复制、多肽折叠、细胞信号转导、蛋白降解等过程,CCT8属于II型伴侣素,参与肿瘤进展^[2]。研究报道显示,CCT8在肿瘤中表达上调,并且其表达改变与肿瘤患者的预后、转移等有关^[3]。在胶质瘤中的研究表明,CCT8在胶质瘤中高表达与胶质瘤分级有关,沉默CCT8可以有效抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭^[4]。以前的研究报道显示,CCT8在非小细胞肺癌组织中高表达,并且其表达水平同肺癌患者淋巴结转移、预后、组织学分级等有关^[5]。目前对于CCT8对非小细胞肺癌细胞侵袭、迁移和上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用还不明确。本次实验以非小细胞肺癌A549细胞作为体外实验对象,探讨下调CCT8对细胞增殖和恶性转移潜能的影响,以期寻找有效的靶基因治疗肺癌提供资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

非小细胞肺癌A549细胞购自上海信裕生物科技有限公司; Lipofectamine 2000、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自美国Invitrogen; 蛋白提取试剂盒、二辛可宁酸(BCA)试剂盒、十二烷基硫酸钠,钠盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳(dodecyl sulfate, sodium salt-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒、四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Vimentin抗体和p-Akt抗体购自美国santacruz; CCT8抗体购自美国Proteintech; E-cadherin抗体、MMP-9抗体购自北京义翘神州科技有限公司; siRNA control、CCT8 siRNA由南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成。

1.2 细胞转染

A549细胞分成3组,分别为Control、si-NC、si-CCT8组,si-NC、si-CCT8组分别为转染siRNA control、CCT8 siRNA的A549细胞,Control为不做转染的对照A549细胞。A549细胞转染方法按照转染试剂Lipofectamine 2000进行,步骤完全按照操作说明书标准流程操作。

1.3 Realtime PCR方法检测CCT8 siRNA对CCT8 mRNA表达影响

收集转染48 h以后的Control、si-NC、si-CCT8组细胞,用RNA提取试剂盒提取总RNA,用反转录试剂盒合成cDNA,按照试剂盒说明书操作进行

PCR反应。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析CCT8水平。

1.4 Western blot方法检测CCT8 siRNA对CCT8蛋白表达影响

收集转染48 h以后的Control、si-NC、si-CCT8组细胞,按蛋白提取试剂盒提取总蛋白,以BCA方法定量。具体方法参考文献^[2], CCT8蛋白水平=CCT8条带灰度值÷内参GAPDH灰度值

1.5 MTT检测检测CCT8 siRNA对细胞增殖影响

取Control、si-NC、si-CCT8组培养48 h的细胞。按照MTT试剂盒说明书进行检测细胞增殖。

1.6 Transwell小室检测CCT8 siRNA对细胞侵袭和迁移影响

用不含血清的培养液悬浮Control、si-NC、si-CCT8组细胞,按照参考文献^[2]方法检测细胞侵袭和迁移数量。

1.7 Western blot检测CCT8 siRNA对MMP-9、Vimentin、E-cadherin和p-Akt蛋白表达影响

收集转染48 h以后的Control、si-NC、si-CCT8组细胞,按照1.4中方法检测蛋白表达变化,内参为GAPDH。

1.8 Akt信号激活剂对下调CCT8影响细胞增殖、迁移、侵袭和EMT的影响

取转染CCT8 siRNA后的A549细胞,以含有100 ng/mL的Akt激活剂IGF-1的细胞培养液培养,记为si-CCT8+IGF-1,以si-CCT8作为对照,分别按照1.4、1.5、1.6中的方法分别检测MMP-9、Vimentin、E-cadherin和p-Akt蛋白表达,细胞迁移和侵袭,细胞增殖。

1.9 统计分析

采用SPSS 21.0软件统计分析,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组数据用独立样本 t 检验,多组比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

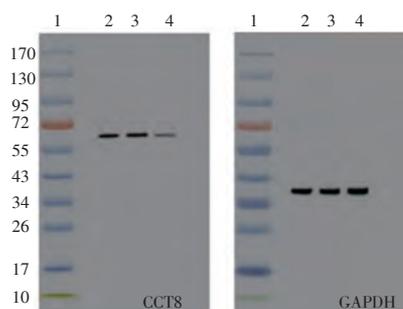
2 结 果

2.1 CCT8 siRNA下调A549细胞中CCT8表达水平

与si-NC组相比,转染CCT8 siRNA后A549细胞中CCT8 mRNA和蛋白水平均下降差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1和表1。

2.2 下调CCT8对A549细胞增殖、侵袭、迁移影响

与si-NC组相比,转染CCT8 siRNA后A549细胞中细胞A值、侵袭数目和迁移数目均下降($P < 0.05$),见表2。



注:1为Marker; 2为Control; 3为si-NC; 4为si-CCT8。

图1 Western blot 检测 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 CCT8 蛋白水平

Figure 1 Western blot analysis expressions of CCT8 protein in A549 cells transfected with CCT8 siRNA

表1 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 CCT8 mRNA 和 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expressions of CCT8 mRNA and protein in A549 cells transfected with CCT8 siRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	CCT8 mRNA	CCT8 蛋白
对照组	1.00±0.09	0.48±0.06
si-NC	1.01±0.12	0.49±0.07
si-CCT8	0.40±0.04	0.21±0.02
F 值	45.573	25.517
P 值	0.000	0.001

表2 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞 A 值、侵袭数目和 迁移数目 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 A value, number of invasion and number of migration in A549 cells transfected with CCT8 siRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值	侵袭数目	迁移数目
对照组	0.51±0.06	95.54±10.20	138.64±12.02
si-NC	0.50±0.04	97.36±9.87	140.08±11.49
si-CCT8	0.21±0.03	60.17±2.05	86.95±7.53
F 值	42.836	19.237	24.745
P 值	0.000	0.003	0.000

2.3 下调 CCT8 对 A549 细胞 MMP-9 蛋白和 EMT 相关蛋白表达影响

与 si-NC 组相比,转染 CCT8 siRNA 后 A549 细胞中 MMP-9 蛋白水平降低,上皮标志蛋白 E-cadherin 水平升高,间质标志蛋白 Vimentin P-kAT 水平下降($P < 0.05$),表 3 和见图 2。

表3 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 MMP-9 和 Vimentin、E-cadherin、p-Akt 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expressions of MMP-9, Vimentin and E-cadherin, p-Akt in A549 cells transfected with CCT8 siRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9	Vimentin	E-cadherin	p-Akt/Akt
对照组	0.47±0.05	0.53±0.06	0.31±0.05	0.31±0.04
si-NC	0.48±0.03	0.52±0.04	0.32±0.03	0.33±0.06
si-CCT8	0.28±0.04	0.30±0.04	0.46±0.05	0.16±0.02
F 值	22.860	22.368	10.729	13.875
P 值	0.002	0.002	0.010	0.000

注:与 si-NC 比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 下调 CCT8 对 A549 细胞中 Akt 信号通路影响

与 si-NC 组相比,转染 CCT8 siRNA 后 A549 细胞中 p-Akt 蛋白水平降低($P < 0.05$),见图 3。

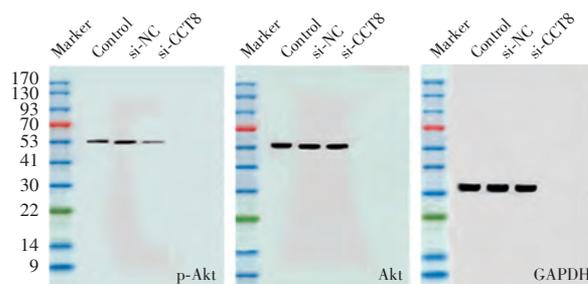
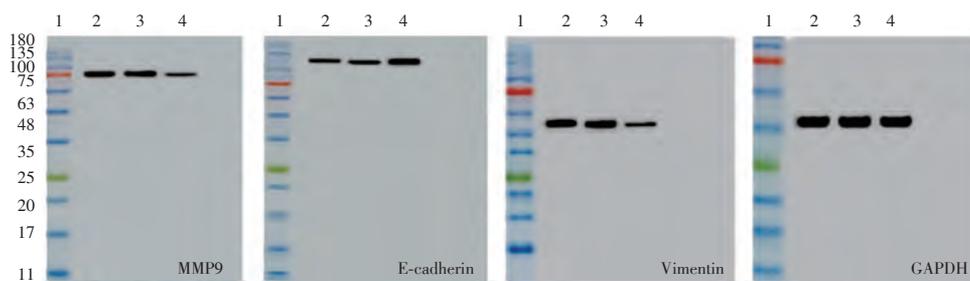


图3 Western blot 检测 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 p-Akt 蛋白水平

Figure 3 Western blot analysis expressions of p-Akt protein in A549 cells transfected with CCT8 siRNA



注:1为Marker; 2为Control; 3为si-NC; 4为si-CCT8。

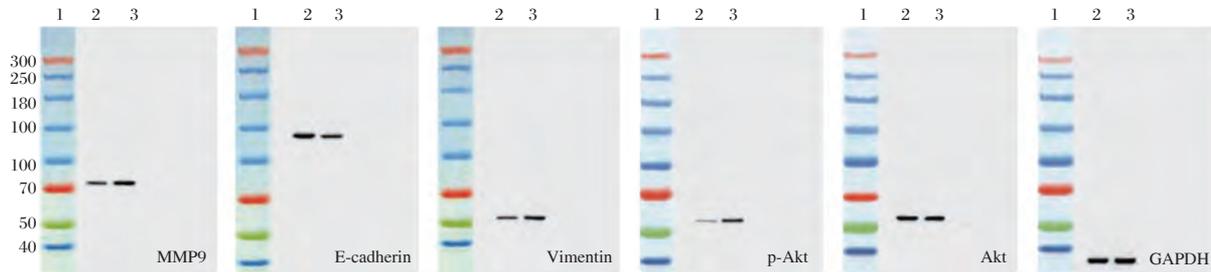
图2 Western blot 检测 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 MMP-9 和 Vimentin、E-cadherin 蛋白水平

Figure 2 Western blot analysis expressions of MMP-9, Vimentin and E-cadherin protein in A549 cells transfected with CCT8 siRNA

2.5 Akt 信号激活剂对下调 CCT8 抑制 A549 细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 的逆转作用

Akt 信号激活剂 IGF-1 处理 CCT8 siRNA 转染后的 A549 细胞,与 si-CCT8 组相比,si-CCT8+IGF-1

组细胞 MMP-9、Vimentin 蛋白水平升高, E-cadherin 蛋白水平降低,细胞 A 值、侵袭数目和迁移数目升高($P<0.05$),见图 4 和表 4。



注:1 为 Marker;2 为 si-CCT8;3 为 si-CCT8+IGF-1。

图 4 Western blot 检测 Akt 信号激活剂和 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞中 p-Akt、E-cadherin、MMP-9、Vimentin 蛋白水平

Figure 4 Western blot analysis expressions of p-Akt, E-cadherin, MMP-9, Vimentin protein in A549 cells after Akt signaling activator and CCT8 siRNA transfection

表 4 Akt 信号激活剂和 CCT8 siRNA 转染后 A549 细胞 A 值、侵袭数目、迁移数目和 p-Akt、E-cadherin、MMP-9、Vimentin 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 A value, invasion number, migration number and p-Akt, E-cadherin, MMP-9, Vimentin protein levels of A549 cells after Akt signaling activator and CCT8 siRNA transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-Akt/Akt	MMP-9	Vimentin	E-cadherin	A 值	侵袭数目	迁移数目
si-CCT8	0.17±0.03	0.29±0.03	0.28±0.04	0.50±0.06	0.22±0.04	62.81±3.69	87.98±9.62
si-CCT8+IGF-1	0.41±0.05	0.52±0.06	0.44±0.05	0.31±0.04	0.45±0.05	85.14±6.34	127.42±11.73
t 值	7.129	5.939	4.328	4.564	6.222	5.272	4.503
P 值	0.002	0.004	0.012	0.010	0.003	0.006	0.011

3 讨论

CCT8 参与肿瘤进程,研究显示,CCT8 在肝细胞癌中高表达,与预后不良有关,siRNA 沉默 CCT8 抑制细胞增殖并阻断细胞进入 S 期^[6]。在肝癌中发现下调 CCT8 可以降低肝癌细胞迁移和侵袭能力^[7]。还有研究发现 CCT8 在淋巴结转移的食管鳞状细胞癌患者肿瘤组织中高表达,与患者预后不良和顺铂耐药性相关;敲低 CCT8 通过调节 α -肌动蛋白和 β -微管蛋白抑制食管鳞状细胞癌细胞的迁移和侵袭,促进细胞凋亡^[8]。本实验表明,下调 CCT8 可以在体外抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,这与在肝癌、食管鳞状细胞癌中下调 CCT8 抑制癌细胞迁移和侵袭的作用相同。还有研究发现 CCT8 上调与成年大鼠创伤性脑损伤后神经细胞凋亡有关^[9]。但本实验未研究 CCT8 对非小细胞肺癌细胞凋亡的影响。以上结果表明说明 CCT8 在癌症中可能作为一个肿瘤促进因子在起作用。本实验结果显示下调 CCT8 具有抑制非小细胞

肺癌细胞恶性表型的作用,靶向抑制 CCT8 可能是有效抵抗非小细胞肺癌进展的途径。

基质金属蛋白酶 9(Matrix metallo proteinase-9, MMP-9)是基质金属蛋白酶家族的成员,细胞外基质降解的关键酶^[10]。而细胞外基质降解是肿瘤细胞转移的基础和前提条件^[11]。有研究报道 MMP-9 在非小细胞肺癌中高表达,与肿瘤分期及淋巴结转移关系密切,且与癌细胞侵袭转移呈正相关^[12]。还有研究显示,非小细胞肺癌组织中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)低表达、波形蛋白(Vimentin)高表达,在肿瘤的侵袭和转移过程中起重要调控作用^[13];E-cadherin 和 Vimentin 是 EMT 水平改变的标志,EMT 水平越高标志着肿瘤转移能力越强,有研究报道通过调节 EMT 可促进肺癌细胞侵袭和迁移能力^[14]。本次实验结果表明,下调 CCT8 可以抑制 MMP-9 的表达,促进 E-cadherin 表达,并下调 Vimentin 表达水平。

综上,CCT8 可能是非小细胞肺癌治疗的有效靶标,靶向抑制 CCT8 表达可以降低非小细胞肺癌细胞恶性增殖、迁移、侵袭和 EMT,(下转第 909 页)

· 论 著 ·

血清TK1、VEGF和AFP检测对原发性肝癌诊断及预后评估的价值

胡燕红^{1*} 顾艳红² 王新梅³

[摘要] 目的 探讨血清胸苷激酶1(TK1)、血管内皮生长因子(VEGF)、甲胎蛋白(AFP)检测对原发性肝癌(PHC)诊断及预后评估的价值。方法 选取73例PHC患者(PHC组)、95例良性肝病者(良性组)及50例健康志愿者(健康组)为研究对象,对比3组血清TK1、VEGF和AFP水平差异,通过ROC曲线分析血清TK1、VEGF和AFP检测对PHC的诊断价值,探索血清TK1、VEGF和AFP表达与PHC患者3年预后的关系。结果 PHC组患者血清TK1、VEGF及AFP水平均显著高于良性组及健康组($P<0.05$)。血清TK1、VEGF及AFP高表达是导致PHC发生的重要危险因素($P<0.05$)。血清TK1、VEGF及AFP检测对PHC诊断的ROC曲线下面积分别为0.888、0.868、0.861,最佳临界值分别为2.25 pmol/L、150.11 ng/L、25.85 μ g/L。血清TK1、VEGF及AFP联合检测的灵敏度显著高于各指标单独检测($P<0.05$),而联合检测特异度与单独检测差异无统计学意义($P>0.05$)。TK1、VEGF及AFP高表达组3年生存率显著低于低表达组,生存时间也小于低表达组($P<0.05$)。结论 血清TK1、VEGF及AFP高表达与PHC的发生密切相关,联合检测TK1、VEGF及AFP表达情况可提高PHC诊断灵敏度,且有助于评估患者预后。

[关键词] 原发性肝癌;胸苷激酶1;血管内皮生长因子;甲胎蛋白

The value of serum TK1, VEGF and AFP in diagnosis and prognosis evaluation of primary hepatocellular carcinoma

HU Yanhong^{1*}, GU Yanhong², WANG Xinmei³

(1. Department of Laboratory, Hospital of Tradition medicine LS.SC, Leshan, Sichuan, China, 614000; 2. Department of Laboratory, Leshan People's Hospital, Leshan, Sichuan, China, 614000; 3. Department of Laboratory, Sichuan Intercontinental Gastrointestinal anal Disease Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the value of serum thymidine kinase 1 (TK1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and alpha-fetoprotein (AFP) in diagnosis and prognostic evaluation of primary hepatocellular carcinoma (PHC). Methods 73 patients with PHC (PHC group), 95 patients with benign liver disease (benign group) and 50 healthy volunteers (healthy group) were selected as research objects. The differences of serum TK1, VEGF and AFP levels in three groups were compared. The diagnostic value of TK1, VEGF and AFP for PHC was analyzed by ROC curve. The relationships between serum TK1, VEGF and AFP expressions and survival status of PHC patients were explored. Results The levels of TK1, VEGF and AFP in the PHC group were significantly higher than those in the benign group and healthy group ($P<$

基金项目:四川省卫生和计划生育科研课题(17PJ017)

作者单位:1. 乐山市中医医院检验科,四川,乐山 614000

2. 乐山市人民医院检验科,四川,乐山 614000

3. 四川洲际胃肠肛门病医院检验科,四川,成都 610000

*通信作者:胡燕红, E-mail: crystal5724@163.com

0.05). High expression of serum TK1, VEGF and AFP is an important risk factor for PHC ($P<0.05$). The area under the ROC curve of TK1, VEGF and AFP for PHC diagnosis was 0.888, 0.868 and 0.861, with the optimal critical values were 2.25 pmol/L, 150.11 ng/L, 25.85 $\mu\text{g/L}$, respectively. The sensitivity of TK1, VEGF and AFP combined detection was significantly higher than that of individual detection ($P<0.05$), while the specificity of combined detection was not statistically different from individual detection ($P>0.05$). The 3-year survival rate of the high expression group of TK1, VEGF and AFP was significantly lower than that of the low expression group, and the survival time of the high expression group was also lower than the low expression group ($P<0.05$). **Conclusion** The high expression of serum TK1, VEGF and AFP is closely related to the occurrence of PHC. Detection of TK1, VEGF and AFP can improve the diagnostic sensitivity of PHC and help to evaluate the prognosis.

[KEY WORDS] Primary hepatocellular carcinoma; Thymidine kinase 1; Vascular endothelial growth factor; Alpha-fetoprotein

原发性肝癌(Primary hepatocellular carcinoma, PHC)是临床上一种常见的恶性肿瘤,其发病率位居全身恶性肿瘤第5位,死亡率居第三位^[1]。PHC恶性程度高,病情进展快,极易侵犯门静脉,造成门静脉癌栓。PHC起病隐匿,多数患者早期无任何临床症状,确诊时病情已发展至中晚期,失去外科手术机会^[2]。如何及早确诊和提高诊断率是PHC治疗的关键。胸苷激酶1(thymidine kinase 1, TK1)是细胞DNA增殖过程中的关键酶,可作为评估细胞增殖状况的重要参考指标^[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种重要的血管内皮细胞增殖因子,能够促进血管内皮生长,增加血管通透性,参与多种肿瘤疾病的发展过程^[4]。甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP)是临床诊断PHC的首选肿瘤标志物,但约30%PHC患者血清AFP呈低表达,而部分良性肝脏疾病患者血清AFP表达量升高,导致AFP检测在PHC诊断方面的价值有限^[5]。本研究通过分析血清TK1、VEGF及AFP水平与PHC的发生及预后的关系,为PHC的早期诊断和预后评估提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2016年6月本院收治的73例PHC患者为PHC组,其中男40例,女33例;年龄40~71岁,平均(56.35±9.68)岁。选取同期95例良性肝病患者为良性组,其中男56例,女39例;年龄44~71岁,平均(54.69±9.26)岁;乙肝肝硬化37例、肝血管瘤42例,肝腺瘤16例。选取健康体检志愿者50例为健康组,其中男25例,女25例;年龄40~73岁,平均(55.13±10.13)岁。3组基础资料

比较,差异无统计学意义($P>0.05$)具可比性。

纳入标准:①符合中国抗癌协会拟定的PHC诊断及分级标准^[6],经病理活检确诊;②Child-pugh分级为A-B级,无肝外转移;③初诊治患者,尚未接受相关治疗;④患者自愿参加研究,签署知情同意书;⑤研究资料经医学委员会审核批准。排除标准:①心肺肾功能严重障碍者;②凝血功能和免疫系统疾病患者;③Child-pugh分级C级、严重肝功能损伤者;④门脉浸润、胃食管静脉曲张或出血风险、胆管癌栓塞者;⑤其他肿瘤、肝外转移或巨块型者;⑥TACE禁忌症或对研究药物过敏者。

1.2 治疗方法

TACE联合索拉非尼治疗:采用改良Seldinger技术经右股动脉穿刺,插入5.0 F RH导管至肿瘤部位进行动脉造影,观察肿瘤血供情况及门静脉通畅状况等。明确肿瘤供血动脉后选择靶血管缓慢注入抗肿瘤药物,5-氟尿嘧啶(旭东海普制药, H31020593) 0.25 g、奥沙利铂(齐鲁制药, H20093167) 50~100 mg,表柔比星(辉瑞制药, H20000496) 10 mg;随后注入100~300 μm 微球栓塞肿瘤血管,待完全阻断肿瘤组织血管后停止注入,完成手术。同时口服索拉非尼(Bayer Pharma AG, H20130137), 400 mg/次, 2次/d,服用8周以上。

1.3 研究方法

①统计患者年龄、性别等基础资料,采用影像学及穿刺活检确诊疾病类型及病情;②术后跟踪随访,记录患者术后3年内生存情况;③采集受试者空腹外周血4 mL,室温静置30 min, 1 000 g低温离心15 min,收集血清待检;采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清TK1、VEGF水平,采用化学发光法检测AFP水平,检测相关试剂购自武汉默

沙克公司,全自动酶标仪(伯乐 800 型)购于 BIO-RAD 公司,全自动生化分析仪(C16000 型)购自美国雅培公司。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验或方差分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验;受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析 TK1、VEGF 及 AFP 检测对 PHC 的诊断价值,Kaplan-Meier 法分析 TK1、VEGF 及 AFP 表达情况与 PHC 患者 3 年生存状况的关系; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组血清 TK1、VEGF 及 AFP 水平比较

PHC 组患者血清 TK1、VEGF 及 AFP 水平比较:PHC 组 > 良性组 > 健康组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组血清 TK1、VEGF 及 AFP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum TK1, VEGF and AFP levels in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TK1(pmol/L)	VEGF(ng/L)	AFP(μ g/L)
PHC 组	73	3.66 \pm 1.27	221.07 \pm 63.26	45.44 \pm 23.25
良性组	95	1.22 \pm 0.64	95.25 \pm 36.18	19.73 \pm 11.92
健康组	50	0.67 \pm 0.20	41.69 \pm 13.24	5.03 \pm 1.98
<i>F</i> 值		236.911	282.910	107.315
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 Logistic 回归分析

Logistic 回归分析显示,血清 TK1、VEGF 及 AFP 水平升高是导致 PHC 发生的重要危险因素($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 Logistic 回归分析

Table 2 Logistic regression analysis

指标	<i>B</i> 值	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	95% <i>CI</i>
TK1	-1.421	0.342	17.271	0.000	0.241	0.124~0.472
VEGF	-0.170	0.051	13.990	0.000	0.983	0.974~0.992
AFP	-0.260	0.062	21.929	0.000	0.974	0.964~0.985

2.3 血清 TK1、VEGF 及 AFP 检测对原发性肝癌的诊断价值

以 PHC 组为观察组,以良性组和健康组为对照组,血清 TK1、VEGF 及 AFP 检测对 PHC 诊断的 ROC 曲线下面积比较,TK1 > VEGF > AFP,联合检

测受试者血清 TK1、VEGF 及 AFP 水平,取其中任一项阳性作为 PHC 的诊断标准,联合检测的灵敏度显著高于各指标单独检测差异有统计学意义($P < 0.05$),而联合检测特异度与单独检测差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 血清 TK1、VEGF 及 AFP 检测对 PHC 的诊断价值
Table 3 Diagnostic value of serum TK1, VEGF and AFP in PHC

指标	最佳临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	Youden 指数	AUC	95% <i>CI</i>
TK1	2.25 pmol/L	79.5	86.3	0.658	0.888	0.836~0.940
VEGF	150.11 ng/L	78.1	84.8	0.629	0.868	0.814~0.923
AFP	25.85 μ g/L	78.1	80.0	0.581	0.861	0.799~0.922
联合检测		93.2	0.863	0.795	0.935	0.902~0.968

2.4 血清 TK1、VEGF 及 AFP 表达情况与患者生存状况的关系

TK1、VEGF 及 AFP 高表达组 3 年生存率显著小于低表达组,且高表达组平均生存时间也小于低表达组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同血清 TK1、VEGF 及 AFP 表达情况与患者 3 年生存率比较 [$n(\%)$]

Table 4 Comparison of 3 years survival rate of patients with different TK1, VEGF and AFP expressions [$n(\%)$]

指标	表达	<i>n</i>	生存率	χ^2 值	<i>P</i> 值
TK1	高表达	37	5(13.51)	25.687	0.000
	低表达	36	17(47.22)		
VEGF	高表达	37	5(13.51)	25.687	0.000
	低表达	36	17(47.22)		
AFP	高表达	37	7(18.92)	12.478	0.001
	低表达	36	15(41.67)		

3 讨论

肿瘤标志物是肿瘤组织细胞内异常表达的细胞因子,参与肿瘤的发生、生长过程,常用于肿瘤疾病的早期诊断、病情评估以及预后监测中^[7]。TK1 是一种评价细胞增殖活性的标志物,参与细胞 DNA 增殖过程^[8]。正常成年细胞中 TK1 水平极低,恶性肿瘤细胞具有无限增殖特点,细胞内 DNA 合成旺盛,在细胞分裂 G1 至 S 期交界时,TK1 水平开始逐渐升高,为肿瘤 DNA 合成提供条件,故 TK1 也可作为恶性肿瘤筛查的可靠生物指标^[9-10]。VEGF 是促进血管内皮增殖的重要因子,

能加速新血管生成,刺激血管内皮增长和迁移,为肿瘤生长提供基础;另外,VEGF能增加血管壁通透性,促进肿瘤细胞的迁移和扩散^[11]。AFP是临床上PHC诊断的首选血清学指标,但部分PHC患者血清AFP水平保存在正常范围,一些妊娠期女性、肝硬化及慢性肝炎患者血清AFP水平又有不同程度升高,导致其应用存在一定局限性^[12-13]。本研究中Logistic回归分析表明,血清TK1、VEGF及AFP水平升高是导致PHC发生的重要危险因素,TK1水平升高说明体内存在增殖活性肿瘤细胞,TK1催化DNA大量合成,促进肿瘤细胞的增殖;VEGF促进肿瘤组织新血管生成,为肿瘤细胞扩增提供必需的营养和氧气,促进肿瘤的生长;AFP能促进肝癌细胞增殖和增加癌细胞耐药性,这可能与AFP协助癌细胞免疫逃避有关。

经ROC曲线提示联合检测血清TK1、VEGF及AFP水平有助于PHC的临床诊断。PHC的病理机制复杂,其发病受多种因素影响,仅依据单项指标检测结果判断患者是否发生PHC存在一定局限性;联合检测血清TK1、VEGF及AFP水平,通过分析体内细胞增殖活性、血管新生等多方面状况,有助于提高PHC早期诊断价值,降低漏诊率。

TACE是失去外科手术机会PHC患者的首选治疗方法,通过阻断肿瘤组织内新血管血流,导致PHC病灶缺血坏死,发挥抗癌作用^[14]。TACE术无法根治病灶,远期效果不佳,术后复发率较高;另外,TACE在阻断肿瘤组织血供同时,还可能降低癌旁正常组织血运,造成周围肝组织功能受损,影响患者预后情况^[15]。本研究结果显示,不同TK1、VEGF及AFP表达患者长期预后也存在较大差别,分析TK1高表达表示细胞增殖活性强,PHC恶性程度高,导致预后较差;VEGF可增加血管通透性,促进肿瘤细胞迁移,影响手术治疗效果;AFP高表达癌细胞多为耐药性细胞,且AFP还能促进癌细胞恶化,故而导致高AFP表达患者预后较差。

综上所述,TK1、VEGF及AFP与PHC的发生和发展等生物学行为密切相关,检测血清TK1、VEGF及AFP水平对PHC早期诊断和预后评估具有积极意义。

参考文献

[1] Petrick JL, McGlynn KA. The changing epidemiology of primary liver cancer [J]. *Curr Epidemiol Rep*, 2019, 6(2): 104-111.

[2] 于森,邱李辉,熊伟,等.原发性肝癌表皮生长因子受体突变的研究[J].*分子诊断与治疗杂志*,2017,9(2):94-99,131.

[3] Yeh HW, Lee SS, Chang CY, et al. Pyrimidine metabolic rate limiting enzymes in poorly-differentiated hepatocellular carcinoma are signature genes of cancer stemness and associated with poor prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77734-77751.

[4] Geller JI, Fox E, Turpin BK, et al. A study of axitinib, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in children and adolescents with recurrent or refractory solid tumors: A Children's Oncology Group phase I and pilot consortium trial (AD-VL1315) [J]. *Cancer*, 2018, 124(23): 4548-4555.

[5] 王京艳,王华明,刘妍,等.血清白细胞介素-6和γ-谷氨酰转移酶联合检测对TACE治疗AFP阴性肝癌患者的疗效与预后评价[J].*解放军医学杂志*,2019,44(5):394-399.

[6] 中国抗癌协会肝癌专业委员会.原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)[J].*中华肝胆外科杂志*,2015,21(3):145-151.

[7] 崔琦,董延娥,霍云龙,等.血清AFP、GP73、SF、DCP联合检测在原发性肝癌诊断中的应用[J].*中国医科大学学报*,2019,48(5):434-436.

[8] Tian T, Li J, Hu W, et al. Thymidine kinase 1 concentration in pleural effusion is a diagnostic marker and survival predictor for malignant pleural effusion [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(6): e22901.

[9] Okamura S, Osaki T, Nishimura K, et al. Thymidine kinase-1/CD31 double immunostaining for identifying activated tumor vessels [J]. *Biotech Histochem*, 2019, 94(1): 60-64.

[10] Jagarlamudi KK, Shaw M. Thymidine kinase 1 as a tumor biomarker: technical advances offer new potential to an old biomarker [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(9): 1035-1048.

[11] Mao CS, Yin H, Ning HB, et al. Levels of HBx, VEGF, and CEACAM1 in HBV-related hepatocellular carcinoma and their correlation with cancer prognosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3827-3833.

[12] Park SJ, Jang JY, Jeong SW, et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(11): e5811.

[13] 胡友明,张娟安,刘军,等.AFP、AFU、GPC3及GP73联合检测对原发性肝癌的诊断意义[J].*实用癌症杂志*,2017,32(3):375-377,388.

[14] 曾军,黄天向,唐红,等.晚期肝癌肝动脉化疗栓塞术前术后血清转化生长因子β1变化及预后意义[J].*中国现代普通外科进展*,2019,22(5):415-418.

[15] Lu W, Jin XL, Yang C, et al. Comparison of efficacy between TACE combined with apatinib and TACE alone in the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: A single-center randomized controlled trial [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(6): 433-438.

血清和肽素水平与PCOS患者糖代谢相关指标水平的关系研究

张先锋* 肖丹 郭佳

[摘要] 目的 探讨血清和肽素(CPT)水平与多囊卵巢综合征(PCOS)患者糖代谢相关指标水平的关系。方法 选取2016年1月至2019年6月间本院收治的160例糖耐量(OGTT)和/或胰岛素释放检测(IRT)异常的PCOS患者(观察组)作为研究对象,并纳入同期收治的OGTT和IRT正常者60例作为对照组。观察组根据患者OGTT和IRT结果分为高胰岛素血症(HI)组($n=72$)、糖耐量受损(IGT)组($n=74$)、2型糖尿病(T2DM)组($n=14$)。比较各组一般资料、CPT及疾病相关因素,分析CPT与PCOS各指标的相关性,采用ROC评估CPT诊断PCOS糖代谢异常的效能。结果 ①HI组、IGT组、T2DM组及对照组年龄、收缩压对比差异均无统计学意义($P>0.05$),HI组、IGT组、T2DM组BMI均高于对照组($P<0.05$),T2DM组舒张压、WHR高于对照组($P<0.05$);②HI组、IGT组、T2DM组FINS、HOMA-IR、CPT水平均高于对照组($P<0.05$),IGT组、T2DM组FPG、HOMA-IR水平均高于HI组($P<0.05$),T2DM组FPG水平高于IGT组($P<0.05$),T2DM组FINS、CPT水平高于HI组和IGT组($P<0.05$),T2DM组TG水平高于对照组($P<0.05$);③Pearson相关分析法显示:BMI、WHR、FPG、FINS、HOMA-IR、TG均与CPT呈正相关关系($P<0.05$),HDL-C与CPT呈负相关关系($P<0.05$);④ROC曲线显示:CPT诊断PCOS糖代谢异常(IGT和T2DM)的曲线下面积为0.756(95%CI:0.689~0.823),最佳临界值13.699 pmol/L、敏感度53.41%、特异度83.33%。结论 CPT与PCOS患者多个糖代谢指标存在相关性,且是预测PCOS患者出现糖代谢异常的有效指标。

[关键词] 多囊卵巢综合征;糖代谢;高胰岛素血症;血清和肽素

Study on relationship between serum Copeptin level and levels of glucose metabolism-related indicators in patients with PCOS

ZHANG Xianfeng*, XIAO Dan, GUO Jia

(Department of Obstetrics and Gynecology, the 967 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Dalian, Liaoning, Chian, 116041)

[ABSTRACT] Objective To explore the relationship between serum Copeptin (CPT) level and levels of glucose metabolism-related indicators in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). Methods A total of 160 PCOS patients (observation group) with abnormal oral glucose tolerance test (OGTT) and/or insulin release test (IRT) who were treated between January 2016 and June 2019 were selected as the research subjects, and another 60 patients with normal OGTT and IRT treated during the same period were included in control group. The patients in observation group were divided into hyperinsulinemia (HI) group ($n=72$), impaired glucose tolerance (IGT) group ($n=74$), and type 2 diabetes mellitus (T2DM) group ($n=14$) according to the OGTT and IRT results of patients. The general data, CPT and disease-related factors were compared all groups, and the correlation between CPT and PCOS indicators was analyzed, and the ROC was used to evalu-

基金项目:辽宁省科学技术基金资助项目(2015030226)

作者单位:中国人民解放军联勤保障部队第967医院妇产科,辽宁,大连116041

*通信作者:张先锋, E-mail:aoanke553168@163.com

ate the efficacy of CPT in diagnosing glucose metabolism abnormalities of PCOS. **Results** There were no statistically significant differences in the age and systolic blood pressure among the HI group, IGT group, T2DM group and control group ($P>0.05$), and the BMI in the HI group, IGT group and T2DM group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the diastolic blood pressure and WHR in the T2DM group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of FINS, HOMA-IR and CPT in the HI group, IGT group and T2DM group were higher than those in the control group ($P<0.05$), and the levels of FPG and HOMA-IR in the IGT group and T2DM group were higher than those in the HI group ($P<0.05$), and the FPG level in the T2DM group was higher than that in the IGT group ($P<0.05$), and the levels of FINS and CPT in the T2DM group were higher than those in the HI group and IGT group ($P<0.05$), and the TG level in the T2DM group was higher than that in the control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that BMI, WHR, FPG, FINS, HOMA-IR and TG were positively correlated with CPT ($P<0.05$), and HDL-C was negatively correlated with CPT ($P<0.05$). ROC curve showed that the area under the curve, optimal cut-off value, sensitivity and specificity of CPT in the diagnosis of glucose metabolism abnormalities (IGT and T2DM) of PCOS were 0.756 (95% CI: 0.689~0.823), 13.699 pmol/L, 53.41% and 83.33%. **Conclusion** CPT is correlated with multiple glucose metabolism indicators in patients with PCOS, and is an effective indicator for predicting glucose metabolism abnormalities in patients with PCOS.

[KEY WORDS] Polycystic ovary syndrome; Glucose metabolism; Hyperinsulinemia; Serum Copeptin

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄女性中最常见的生殖内分泌疾病之一^[1]。流行病学调查显示,PCOS会累及5%~10%的育龄期妇女,不仅会影响患者的生殖功能,还会引起糖类、脂质代谢的紊乱^[2]。PCOS内分泌诊治专家共识中指出,PCOS患者以餐后血糖升高为主,糖耐量受损(Impaired glucose tolerance, IGT)的风险显著高于年龄和体质量(Body mass index, BMI)匹配的女性^[3]。既往研究认为,胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是PCOS发生、发展的重要原因^[4],同时IR在PCOS患者糖代谢异常中也发挥重要作用。精氨酸血管加压素(Arginine vasopressin, AVP)是由神经垂体分泌的一种激素,在维持2型糖尿病(Type 2 diabetes, T2DM)血糖稳态、IR、脂肪代谢等方面具有重要作用^[5]。和肽素(Copeptin, CPT)是前AVP C-端的一部分,由于AVP半衰期较短、不易测量,因此临床考虑以CPT作为检测AVP水平的替代指标。目前已有研究发现,CPT水平与T2DM发病、心血管事件发生等相关^[6]。因此,作为一个与糖耐量受损较多影响因素相关的指标,CPT可能是预测糖耐量受损的可靠指标,且CPT监测较OGTT更为便利,在大规模筛查指标中更加便利。基于此,本研究将探究CPT水平与PCOS患者糖代谢相关指标水平的关系,以期预测PCOS糖代谢异常提供信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2019年6月本院间收治的160例糖耐量(Oral glucose tolerance test, OGTT)和/或胰岛素释放检测(Insulin resistance test, IRT)异常的PCOS患者作为研究对象,纳入同期收治的OGTT和IRT正常者60例作为对照组。纳入标准:经盆腔超声、实验室检查、症状体征病史等诊断PCOS者^[7];肝肾功能正常者;初潮3年以上、年龄<35岁者;入组前3个月无妊娠、分娩、流产史者;未经任何会影响性激素、糖代谢治疗者;近期无手术史、急性感染性疾病者;患者知情同意,并经本院伦理委员会审核通过。排除标准:合并卵巢囊肿、卵巢肿瘤者;合并甲状腺疾病者;确诊高催乳素血症、先天性肾上腺皮质增生症、雄激素分泌肿瘤、库欣综合征、苗勒管发育不全等子宫疾病者。

OGTT异常诊断标准:空腹血糖(Fasting blood glucose, FPG) >5.6 mmol/L、葡萄糖负荷试验2 h血糖 >7.8 mmol/L。IRT异常诊断标准:胰岛素抵抗指数(Insulin resistance index, HOMA-IR)=空腹胰岛素(Fasting insulin, FINS) \times 空腹血糖/22.5, HOMA-IR >1.66 和/或空腹胰岛素 >10 mIU/L^[8]。

1.2 分组分法

160例OGTT和/或IRT异常的PCOS患者,根据OGTT、IRT检测结果分组。OGTT正常、IRT异

常者纳入 HI 组 ($n=72$), OGTT 异常但未达 T2DM 诊断标准者纳入 IGT 组 ($n=74$), 符合 T2DM 诊断标准者^[8]纳入 T2DM 组 ($n=14$)。对照组为 OGTT 和 IRT 均正常者 ($n=60$)。

1.3 仪器及试剂

酶标仪 ELx800, 美国 Bio tek 公司生产; Cobas e 601 型全自动电化学发光分析仪, 豪夫迈罗氏公司生产; ADVIA2400 型全自动生化分析仪, 德国西门子公司生产。人血清 CPT 酶联免疫试剂盒, 由上海江莱生物科技有限公司提供; 卵泡刺激素 (Follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (Luteinizing hormone, LH)、睾酮 (Testosterone, T)、FINS 试剂盒, 由德国 bayer 公司提供

1.4 研究方法

收集所有研究对象年龄、BMI、血压、腰臀比 (Waist to hip ratio, WHR), 疾病相关因素包括 FPG、FINS、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、FSH、LH、T 及 CPT。采用酶联免疫法 (ELISA) 测定患者 CPT 指标水平, 采用化学发光法测定 FSH、LH、

T、FINS 水平。体重、身高、腰围、臀围等均由医护人员进行测量, $BMI=体重(kg)/身高^2(m)$ 、 $WHR=腰围/臀围$; 采用电子血压计测量研究对象舒张压和收缩压, 连续测量两次、取平均值。

1.5 观察指标

比较各组一般资料、CPT 及疾病相关因素, 分析 CPT 与 PCOS 各指标的相关性, 采用 ROC 评估 CPT 诊断 PCOS 糖代谢异常的效能。

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较行单因素方差分析, 两组间比较行 LSD-t 检验, 指标间相关性采用 Pearson 法, 绘制 ROC 曲线评估指标检验效能, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料对比

HI 组、IGT 组、T2DM 组及对照组年龄、收缩压对比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), HI 组、IGT 组、T2DM 组 BMI 均高于对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), T2DM 组舒张压、WHR 高于对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组一般资料对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of general data of each group ($\bar{x} \pm s$)

一般资料	HI 组 ($n=72$)	IGT 组 ($n=74$)	T2DM 组 ($n=14$)	对照组 ($n=60$)	F 值	P 值
年龄 (岁)	27.86±4.88	29.32±3.70	29.76±4.26	28.26±3.90	2.439	0.065
BMI (kg/m ²)	26.60±3.57 ^a	26.74±4.06 ^a	28.10±5.79 ^a	22.67±3.99	15.224	0.000
WHR (cm)	0.83±0.15	0.85±0.16	0.92±0.15 ^a	0.83±0.10	4.960	0.006
收缩压 (mmHg)	124.96±12.70	125.24±17.94	124.96±13.43	120.69±15.87	1.143	0.333
舒张压 (mmHg)	81.20±10.20	83.98±12.85	85.65±10.98 ^a	79.02±10.26	3.822	0.011

注: 与对照组对比, ^a $P < 0.05$ 。

2.2 各组疾病相关因素及 CPT 对比

HI 组、IGT 组、T2DM 组及对照组 TC、LDL-C、HDL-C、FSH、LH、T 对比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), HI 组、IGT 组、T2DM 组 FINS、HOMA-IR、CPT 水平均高于对照组 ($P < 0.05$), IGT 组、T2DM 组 FPG、HOMA-IR 水平均高于 HI 组 ($P < 0.05$), T2DM 组 FPG 水平高于 IGT 组 ($P < 0.05$), T2DM 组 FINS、CPT 水平高于 HI 组和 IGT 组 ($P < 0.05$), T2DM 组 TG 水平高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 CPT 与 PCOS 患者各指标的相关性

Pearson 相关分析法显示: BMI、WHR、FPG、FINS、HOMA-IR、TG 均与 CPT 呈正相关 ($P <$

0.05), HDL-C 与 CPT 呈负相关 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 CPT 诊断 PCOS 糖代谢异常的 ROC 曲线

ROC 曲线显示: CPT 诊断 PCOS 糖代谢异常 (IGT 和 T2DM) 的曲线下面积为 0.756 (95% CI: 0.689~0.823), 最佳临界值 13.699 pmol/L、敏感度 53.41%、特异度 83.33%。

3 讨论

PCOS 是由环境和遗传因素相互影响而导致的以雄激素过多、月经失调、排卵障碍为特征的综合征, 相关的代谢失调包括 IR、糖脂代谢异常、心血管疾病的危险性增加^[1]。育龄期的 PCOS 患者

表2 各组疾病相关因素及CPT对比 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of disease-related factors and CPT in each group ($\bar{x} \pm s$)

指标	HI组(n=72)	IGT组(n=74)	T2DM组(n=14)	对照组(n=60)	F值	P值
FPG(mmol/L)	4.92±0.53	5.87±0.67 ^{ab}	7.73±1.31 ^{abc}	4.74±0.53	150.669	0.000
FINS(IU/L)	13.40±4.54 ^a	13.56±3.07 ^a	19.09±4.18 ^{abc}	9.91±2.18	60.340	0.000
HOMA-IR	2.72±1.09 ^a	4.06±5.02 ^{ab}	5.42±4.94 ^{ab}	1.65±0.67	11.435	0.000
TG(mmol/L)	1.97±0.80	2.02±1.03	2.22±1.06 ^a	1.65±0.75	3.607	0.027
TC(mmol/L)	4.40±0.48	4.32±0.61	4.37±0.67	4.26±0.59	0.588	0.623
LDL-C(mmol/L)	3.31±0.53	3.47±0.56	3.62±1.13	3.35±0.72	1.780	0.152
HDL-C(mmol/L)	1.36±0.38	1.29±0.28	1.25±0.28	1.37±0.32	1.786	0.151
FSH(IU/L)	5.73±1.77	5.72±1.90	6.60±2.68	5.61±1.97	2.602	0.053
LH(IU/L)	9.08±5.68	8.98±4.33	7.34±4.68	9.97±5.51	2.548	0.057
T(nmol/L)	2.35±0.95	2.13±0.85	2.37±0.90	2.05±0.87	1.745	0.159
CPT(pmol/L)	12.89±2.53 ^a	13.20±2.96 ^a	15.55±3.10 ^{abc}	7.51±1.69	91.607	0.000

注:与对照组对比,^aP<0.05;与HI组对比,^bP<0.05;与IGT组对比,^cP<0.05。

表3 CPT与PCOS患者各指标的相关性

Table 3 Correlation between CPT and PCOS

指标	r值	P值
BMI	0.674	0.000
WHR	0.281	0.020
FPG	0.637	0.000
FINS	0.520	0.000
HOMA-IR	0.571	0.000
TG	0.326	0.007
HDL-C	-0.217	0.044

较同年龄的女性更早地暴露于各类代谢性疾病风险中,因此对PCOS患者代谢失调进行早期识别、及时治疗,是有积极意义的。有研究显示,CPT是T2DM发病的独立危险因素,较高的CPT使T2DM发病风险增高2.07倍^[9]。但CPT是否可作为PCOS患者糖代谢异常的标志物,仍无定论。Frøssing S等^[10]学者的一项研究显示,在PCOS患者和与其年龄、BMI匹配的健康女性之间,CPT水平不存在显著差异,因此认为CPT不能作为年轻PCOS代谢异常的风险预测因子。但也有研究显示,CPT是HOMA-IR≥2.5的最强预测因子,OR值为53.34^[11]。同时,CPT在PCOS患者中研究较少,且CPT诊断PCOS糖代谢的具体最佳临界值也未达成共识,故本研究就此展开分析。

本研究结果提示PCOS糖代谢与患者肥胖、腹部肥胖、CPT和血压存在一定联系。在糖脂代谢、内分泌指标等疾病相关因素中,表明IR和糖代谢异常与PCOS内分泌无明显相关性,且脂代谢中仅有TG有统计学意义。刘馨允等^[12]学者的研究也发现,糖尿病是TG异常的独立危险因素,OR值为2.182。相关文献显示,TG经脂

酶水解转化为游离脂肪酸,高TG导致游离脂肪酸增加,进而抑制胰岛β细胞的胰岛素分泌,导致胰岛功能受损^[13],因此高TG与T2DM之间存在协同性。

本实验结果说明CPT与PCOS糖代谢和胰岛功能存在明显相关性。K polak等^[14]学者的文献也指出,PCOS患者高表达的CPT与FPG、HOMA-IR、TG等呈正相关关系。本研究发现,BMI、WHR、TG不仅与糖代谢相关,也与CPT呈正相关关系,BMI与CPT相关性较强,这也可能是CPT与PCOS患者糖代谢相关的途径之一。肥胖不仅是PCOS常见症状之一,肥胖诱发的代谢紊乱,包括IR和HI,脂肪酸分泌引起的脂毒性,脂肪因子和慢性炎症反应,可通过影响下丘脑-垂体-卵巢轴功能参与PCOS的发生发展^[15]。因此,推测CPT也参与PCOS的发病过程。在临床实际诊治中,对存在BMI、WHR过大,高TG水平等多种危险因素的PCOS患者,应早期监测其CPT水平,评估患者糖代谢异常风险,积极应对。

综上所述,不同糖代谢异常程度PCOS患者间,CPT水平差异显著;CPT与PCOS患者BMI、WHR、FPG、FINS、HOMA-IR、TG、HDL-C均存在相关性,CPT预测PCOS糖代谢异常效能良好。

参考文献

- [1] 程瑶瑶,李建辉,王淳,陈娟. PCOS患者GDF-9、BMP-15、BAX表达特点及其与卵巢储备功能的相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(02): 225-228+233.
- [2] 王笑臣,杨菁. 重视多囊卵巢综合征患者的生活方式调整[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(1): 51-54.

- [3] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 多囊卵巢综合征诊治内分泌专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(1):1-7.
- [4] 廖鑫, 张琳, 张晗, 等. 多囊卵巢综合征患者血清 25(OH)D3 与糖脂代谢的相关性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(10):1300-1303, 1308.
- [5] 冯光勇, 黄伟, 任红苗. 血浆和肽素水平对糖尿病视网膜病变的诊断价值[J]. 山东医药, 2017, 57(20):76-78.
- [6] Lemetals G, Melander O, Vecchio M, et al. Effect of increased water intake on plasma copeptin in healthy adults[J]. *Eur J Nutr*, 2017, 57(5):1883-1890.
- [7] 郁琦. 多囊卵巢综合征诊治标准专家共识[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(6):474.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4):34-86.
- [9] Blum CA, Winzeler B, Nigro N, et al. Copeptin for risk stratification in non-traumatic headache in the emergency setting: a prospective multicenter observational cohort study [J]. *J Headche Pain*, 2017, 18(1):21.
- [10] Frøssing S, Nylander M, Aziz M, et al. Atrial natriuretic peptide, copeptin and adrenomedullin levels in polycystic ovary syndrome: a case-control study [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2017, 33(1):30-33.
- [11] Widecka J, Ozegowska K, Banaszewska B, et al. Is copeptin a new potential biomarker of insulin resistance in polycystic ovary syndrome? [J]. *Ginekol Pol*, 2019, 90(3):115-121.
- [12] 刘馨允, 邢文露, 江继承, 等. 河南省高血压病和糖尿病人群血脂现状调查[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(5):360-366.
- [13] 赵永才, 宋光耀, 李新胜. 糖耐量减低合并高甘油三酯血症患者硫氧还原蛋白相互作用蛋白与胰岛功能的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(12):1086-1089.
- [14] Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome [J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40(1):1-8.
- [15] 木良善, 赵越, 乔杰. 肥胖与多囊卵巢综合征的关联性及其潜在机制[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(4):343-349.

(上接第 900 页)

且 CCT8 作用机制与 Akt 信号有关。本实验结果为研究 CCT8 在肺癌中的作用机制提供了参考。在以后实验中会探讨 CCT8 具体的靶向结合位点和调控网络。

参考文献

- [1] Soria J C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. *N Eng J med*, 2018, 378(2):113-125.
- [2] Yang X, Ren H, Shao Y, et al. Chaperonin-containing T-complex protein 1 subunit 8 promotes cell migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by regulating α -actin and β -tubulin expression [J]. *Int J oncol*, 2018, 52(6):2021-2030.
- [3] Yin H, Miao X, Wu Y, et al. The role of the Chaperonin containing t-complex polypeptide 1, subunit 8 (CCT8) in B-cell non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Leuk Res*, 2016, 45(6):59-67.
- [4] Qiu X, He X, Huang Q, et al. Overexpression of CCT8 and its significance for tumor cell proliferation, migration and invasion in glioma [J]. *Pathol-Res and Pract*, 2015, 211(10):717-725.
- [5] 盖领, 茅国新, 吴锦伟, 等. CCT8 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(7):1064-1067.
- [6] Huang X, Wang X, Cheng C, et al. Chaperonin containing TCP1, subunit 8 (CCT8) is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes HCC proliferation [J]. *Apmis*, 2014, 122(11):1070-1079.
- [7] Wei P L, Huang C Y, Tai C J, et al. Glucose-regulated protein 94 mediates metastasis by CCT8 and the JNK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(6):8219-8227.
- [8] Yang X, Ren H, Shao Y, et al. Chaperonin-containing T-complex protein 1 subunit 8 promotes cell migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by regulating α -actin and β -tubulin expression [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(6):2021-2030.
- [9] Wu X, Zhang H, Chen D, et al. Up-Regulation of CCT8 related to neuronal apoptosis after traumatic brain injury in adult rats [J]. *Neurochem res*, 2015, 40(9):1882-1891.
- [10] Conrad C, Götte M, Schlomann U, et al. ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases: Functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells [J]. *Int J cancer*, 2018, 142(4):779-791.
- [11] Salesses S, Odoul L, Chazée L, et al. Elastin molecular aging promotes MDA-MB-231 breast cancer cell invasiveness [J]. *FEBS open*, 2018, 8(9):1395-1404.
- [12] 曾媛媛, 刘哲, 雷舒, 等. CXCR-2 和 MMP-9 在非小细胞肺癌癌组织中的表达水平及其与肺癌侵袭转移的相关性 [J]. *西南国防医药*, 2018, 28(7):43-45.
- [13] 廖爱辉, 刘展, 雷志胜, 等. NDRG1 与 E-cadherin 下调表达及其与胃癌淋巴结转移的关系研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(6):392-396.
- [14] Zare M, Bastami M, Solali S, et al. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT-involving miRNAs in breast cancer metastasis: diagnosis and therapeutic implications [J]. *J cell physiol*, 2018, 233(5):3729-3744.

GnRH- α 联合 LNG-IUS 对子宫内膜异位症术后患者血清 ENA-78 及 MCP-1 水平的影响

马雪莲¹ 李海燕^{2*}

【摘要】 **目的** 分析子宫内膜异位症术后患者经促性腺激素释放激素激动剂(GnRH- α)联合左炔诺孕酮宫内缓释系统(LNG-IUS)治疗与血清中性粒细胞活化肽78(ENA-78)和人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平的关系。**方法** 回顾性分析了140例子宫内膜异位症(EM)术后患者临床资料并分为A组(术后单纯应用GnRH- α)40例、B组(术后单纯应用LNG-IUS)40例、C组(术后联合应用GnRH- α +LNG-IUS)30例、D组(单纯接受腹腔镜手术)30例。分别于术后第6个月监测各组血清ENA-78和MCP-1水平的变化情况。**结果** 治疗后,A、B、C三组ENA-78和MCP-1水平均较D组明显下降(P 值均 <0.05),其中C组与B组的ENA-78水平、C组与A组的MCP-1水平差异亦具有统计学意义(P 值均 <0.05),A、B两组血清ENA-78差异具有统计学意义($P<0.05$),但A、B两组MCP-1水平相比较,差异无统计学意义($P>0.05$);并且通过进一步分析,观察到血清ENA-78、MCP-1水平在A、B及C中均呈正相关关系。**结论** 通过治疗后血清中性粒细胞活化肽78(ENA-78)和人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平的变化评估得知,EM术后患者联合使用GnRH- α 和LNG-IUS优于各自单独治疗,且二者联合呈协同作用,显著降低患者血清ENA-78和MCP-1水平。这可为临床治疗提供可靠的理论基础。

【关键词】 子宫内膜异位症;促性腺激素释放激素激动剂;左炔诺孕酮宫内缓释系统;ENA-78;MCP-1

The effect of co-treatment with GnRH- α and LNG-IUS on serum ENA-78 and MCP-1 levels in post-operative patients with endometriosis

MA Xuelian¹, LI Haiyan^{2*}

(1. Department of Laboratory, Dongying District People's Hospital, Dongying, Shandong, China, 257000;
2. Department of Laboratory, New District Hospital, Dongying District, Dongying City, Dongying, Shandong, China, 257000)

【ABSTRACT】 **Objective** To analysis the correlation between serum ENA-78 and MCP-1 levels after co-treatment of Gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH- α) and Levonorgestrel intrauterine sustained release system (LNG-IUS) in post-operative patients with endometriosis. **Methods** 140 patients with endometriosis were analyzed retrospectively, which divided into group A (post-operative application of simple GnRH- α), group B (post-operative application of simple LNG-IUS), group C (post-operative application of GnRH- α and LNG-IUS) and group D (just accept laparoscopic surgery). The changes of serum ENA-78 and MCP-1 levels in each group were monitored at the 6th postoperative month. **Results** The serum ENA-78 and MCP-1 levels in the group A, B and C were apparently decreased compared with the group D (P value were all <0.05) after treatment, and difference between the group C and the group B in ENA-78, difference be-

基金项目:东营市卫生计生委科技项目(2015BWDY004)

作者单位:1. 东营市东营区人民医院,山东,东营 257000

2. 东营市东营区新区医院,山东,东营 257000

*通信作者:李海燕, E-mail: LHYSYH@126.com

tween the group C and group A in MCP-1 were statistically significantly ($P<0.05$), however, no differences exist between the group A and B in MCP-1 levels ($P>0.05$), but different in ENA-78 ($P<0.05$). Additionally, further analysis revealed the positive correlation between serum ENA-78 and MCP-1 levels in the group A, B, and C. **Conclusion** combined administration of GnRH- α and LNG-IUS were better than single treatment and shows a synergistic effect in post-operative patients with endometriosis, significantly reducing the serum ENA-78 and MCP-1 levels in patients. This can provide a reliable theoretical basis for clinical treatment.

[KEY WORDS] Endometriosis; GnRH- α ; LNG-IUS; ENA-78; MCP-1

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是指有活性的子宫内膜出现在子宫内膜以外的地方。EM是育龄期妇女常见的妇科疾病,其发病率约为10%^[1-2]。近有科学证据提示免疫功能障碍可能与子宫内膜异位症有关,炎症因子的刺激可诱发盆腔炎症及纤维化,引起子宫内膜粘连、增殖、新生血管形成和卵巢巧克力囊肿^[3-5]。中性粒细胞活化肽78(epithelial neutrophil-activating peptide-78, ENA-78)是一种具有趋化作用的炎症因子,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)是一种单核和巨噬细胞特异的趋化因子,可募集巨噬细胞向炎症部位移动^[6-7],其在EM发病机制中扮演者重要的角色,越来越受学者们的重视。目前,EM主要以手术切除治疗为主,辅以促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin releasing hormone analogues, GnRH- α)或左炔诺孕酮宫内缓释系统(levonorgestrel-releasing intrauterine system, LNG-IUS)等药物治疗,但无明确的优势方案。本文旨在比较EM术后患者辅以GnRH- α 、LNG-IUS及GnRH- α +LNG-IUS后观察血清ENA-78、MCP-1水平之间的关系,为优化EM治疗方案提供临床依据,改善患者的生活质量。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取本院妇产科2016年1月至2017年1月的140例EM术后患者,根据其辅助治疗方法分为A组(术后单纯应用GnRH- α)、B组(术后单纯应用LNG-IUS)、C组(术后应用GnRH- α 和LNG-IUS)和D组(单纯接受腹腔镜手术),各组分别为40、40、30和30例;年龄24~41岁,比较各组患者年龄、病程等基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有研究对象均已行手术,术前未应用激素治疗,术后根据已选择治疗方法直至实验结束,患者未合并肝肾等器官疾病、恶性

肿瘤。研究经东营区人民医院伦理委员会批准,并征得患者和家属知情同意,已签署知情同意书。

1.2 术后治疗方法

GnRH- α 组(A组):于术后1周内给皮下注射达菲林针,3.75 mg/支,1次/d,4周1次,连用6个月;LNG-IUS组(B组):术后立即放置宫内LNG-IUS;GnRH- α +LNG-IUS(C组):术后1周内给予3.75 mg达菲林针注射皮下,4周1次,共6次,停药后1月内放置宫内LNG-IUS;D组:不做任何处理。

1.3 观察指标

分别于治疗前、治疗后1年进行指标监测,分别采集患者空腹静脉血5 mL,3 000 r/min,离心10 min,取上清液,采用酶联免疫吸附实验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)测定血清ENA-78、MCP-1水平,严格按照ENA-78、MCP-1免疫分析试剂盒说明书(德国R&D公司)进行操作,每份标本测2孔,取其平均值,选择450 nm紫外线波长,通过标准曲线自动读取样本ENA-78、MCP-1的浓度。

1.4 统计学分析

采用SPSS 16.0统计学软件进行统计处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组别之间采用Post-Hoc分析,相关性时采用spearman检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组患者治疗前后血清ENA-78水平变化情况

A、B、C 3组与D组ENA-78水平在治疗前比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后的A、B、C 3组与D组ENA-78水平比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。进一步分析结果显示,A组与B组、A组与D组、B组与C组、B组与D组及C组与D组之间比较,具有统计学差异($P<0.05$),见表2。

表1 4组患者治疗前后的血清ENA-78水平变化情况
[($\bar{x} \pm s$), pg/mL]

Table 1 Changes in serum ENA-78 levels before and after treatment in the 4 groups of patients [($\bar{x} \pm s$), pg/mL]

分组	n	治疗前	治疗后
A组	40	3.22±1.35	1.09±0.21
B组	40	3.35±1.54	1.59±0.75
C组	30	2.96±1.29	0.79±0.35
D组	30	2.83±0.97	2.66±1.14
F值		1.10	43.68
P值		0.35	0.00

2.2 4组患者的血清MCP-1水平变化情况

A、B、C 3组与D组MCP-1水平在治疗前差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后的A、B、C 3组与D组MCP-1水平比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见表3。进一步分析结果显示,A组与C组血清MCP-1水平、A组与D组血清MCP-1水平、B组与D组血清MCP-1水平及C组与D组血清MCP-1水平相比均差异具有统计学($P<0.05$),见表4。

表2 4组患者治疗后的血清ENA-78水平的比较

Table 2 Comparison of serum ENA-78 levels in the 4 groups of patients after treatment

组别	A组		B组		C组		D组	
	95%CI	P值	95%CI	P值	95%CI	P值	95%CI	P值
A组	-	-	0.098~0.902	0.008	0.734~0.134	0.279	1.136~2.004	0.000
B组	0.098~0.902	0.008	-	-	1.234~0.366	0.000	0.636~1.504	0.000
C组	0.734~0.134	0.279	1.234~0.366	0.000	-	-	1.406~2.334	0.000
D组	1.136~2.004	0.000	0.636~1.504	0.000	1.406~2.334	0.000	-	-

表3 4组患者不同监测时间段的血清MCP-1水平变化情况 [($\bar{x} \pm s$), ng/L]

Table 3 Changes of serum MCP-1 levels in 4 groups of patients at different monitoring periods [($\bar{x} \pm s$), ng/L]

分组	n	治疗前	治疗后
A组	40	154.97±32.55	125.67±25.97
B组	40	165.41±42.34	114.55±42.31
C组	30	155.42±32.18	98.88±21.46
D组	30	167.53±36.62	154.19±33.37
F值		1.12	15.92
P值		0.35	0.00

2.3 各治疗组血清ENA-78与MCP-1水平之间的相关性

A($r=0.368, P=0.028$)、B($r=0.536, P=0.009$)、C($r=0.675, P=0.001$) 3组患者治疗后血清ENA-78与MCP-1水平均具有正相关关系(P 值均 <0.05)。

3 讨论

子宫内异位症的发病机理尚不十分清楚,国内外学者认为EM发病的中心环节为腹腔微环境中各种免疫细胞和细胞因子的功能异常引起的

表4 4组患者治疗后的血清MCP-1水平的比较

Table 4 Comparison of serum MCP-1 levels in the 4 groups of patients after treatment

组别	治疗后A组		治疗后B组		治疗后C组		治疗后D组	
	95%CI	P值	95%CI	P值	95%CI	P值	95%CI	P值
A组	-	-	29.897~7.657	0.416	47.072~6.509	0.004	8.239~48.802	0.002
B组	29.897~7.657	0.416	-	-	35.952~4.612	0.190	19.359~59.922	0.000
C组	47.072~6.509	0.004	35.952~4.612	0.190	-	-	33.628~76.992	0.000
D组	8.239~48.802	0.002	19.359~59.922	0.000	33.628~76.992	0.000	-	-

腹腔局部免疫炎症反应,ENA-78与MCP-1在子宫内异位症的发病机制中扮演着重要角色^[6,8-9]。既往文献报道术后辅以GnRH- α 或者LNG-IUS可提高疗效,低水平ENA-78与MCP-1可作为疗效评估指标^[7]。EM虽为良性病变,但具有浸润、转移至其他器官或组织,易复发等恶性生物学行为^[10-12]。亦有研究表明^[13-14],术后单独给予GnRH- α

或者LNG-IUS治疗可有效降低该疾病的复发。GnRH- α 作为目前较理想的治疗药物,一方面可抑制垂体-卵巢轴而使垂体促性腺激素释放降低,另一方面具有促进EM细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用,但其引起的内分泌方面的副作用及价格昂贵限制了在临床上的长期应用。宫内放置LNG-IUS治疗EM,一方面对体内的雌激素水平无明显

影响,另一方面其一次放置可以持续作用可长达5年,可减轻患者的经济负担。因此,本研究旨在对已行子宫内膜异位症手术的患者辅以 GnRH- α 、LNG-IUS、GnRH- α +LNG-IUS 药物治疗后与 ENA-78 与 MCP-1 水平的相关性,进而观察效果的差异,为优化 EM 术后治疗提供临床依据。

通过研究结果提示 GnRH- α 治疗 EM 较单一手术切除病灶效果更良好。再者,EM 术后患者采用单一 LNG-IUS 辅助治疗,说明单用 GnRH- α 与 LNG-IUS 均可作为术后 EM 患者的治疗方案,临床医生可权衡诸多因素后选择适合患者的药物。此外,通过将 GnRH- α 与 LNG-IUS 联合作为第三种辅助治疗,ENA-78 与 MCP-1 水平明显低于单药治疗,提示联合用药优于单一用药,具有更好的疗效。因此,EM 术后患者接受 GnRH- α 诱导后采用 LNG-IUS 治疗,可有效提高辅助药物治疗效果。在血清 ENA-78 与 MCP-1 水平之间的相关性方面,两者在治疗后具有正相关关系,提示均为病情变化的监测指标,并且可能具有内在联系,需要进一步基础实验来验证。

本文不足之处在于:首先该研究只是单纯研究不同辅助治疗方案与血清 ENA-78 与 MCP-1 水平的关系,通过两者的水平变化情况说明治疗方案的优劣,远期还需综合考虑月经改变、治疗后复发及其他并发症,血清学其他指标等因素,继而判定治疗效果;其次样本量需要扩大,更能体现不同治疗方案与各项指标之间的内在联系,使实验结果更具依据性及可行性;最后,实验过程中未进行时间分段,未能发现采用不同辅助药物治疗的 EM 术后患者 ENA-78 与 MCP-1 水平在不同时间段的变化情况。

总而言之,GnRH- α 与 LNG-IUS 均可作为治疗手术后 EM 的有效辅助药物。联合 GnRH- α 诱导后 LNG-IUS 治疗,ENA-78 与 MCP-1 水平下降幅度更大,优于单一药物治疗效果。因此,可综合考虑各种因素后为患者选择最为合适的治疗方案。

参考文献

[1] Butler MG, McGuire A, Manzardo AM. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction [J]. *J Assist Reprod and*

- gene, 2015, 32(4):495-508.
- [2] Carr S, Espey E. Intrauterine devices and pelvic inflammatory disease among adolescents [J]. *J Adolesc Health*, 2013, 52(4): S22-S28.
- [3] Burns KA, Thomas SY, Hamilton KJ, et al. Early endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor alpha and il-6 cross-talk [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(1):103-118.
- [4] Khan Z, Zheng Y, Jones TL, et al. Epigenetic therapy: Novel translational implications for arrest of environmental dioxin-induced disease in females [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(1):477-489.
- [5] Shenoy CC, Khan Z, Zheng Y, et al. Progressive fibrosis: A progesterone- and klf11-mediated sexually dimorphic female response [J]. *Endocrinology*, 2017, 158(10):3605-3619.
- [6] Bertschi D, McKinnon BD, Evers J, et al. Enhanced inflammatory activity of endometriotic lesions from the rectovaginal septum [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013(2): 450950.
- [7] Zhang Y, Zhang Y, Zhao C, et al. Reduced alternative splicing of estrogen receptor alpha in the endometrium of women with endometriosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(66):110176-110186.
- [8] Samir M S, Glister C, Mattar D, et al. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF α , IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro [J]. *Reproduction*, 2017, 154(1): 35-49.
- [9] Zhang QF, Chen GY, Liu Y, et al. Relationship between resistin and IL-23 levels in follicular fluid in infertile patients with endometriosis undergoing IVF-ET [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(9): 1431-1435.
- [10] Raimondo D, Mabrouk M, Zannoni L, et al. Severe ureteral endometriosis: frequency and risk factors [J]. *J Obstetr and Gynaecol*, 2018, 38(2): 257-260.
- [11] Loh SH, Lew BL, Sim WY. Primary cutaneous endometriosis of umbilicus [J]. *Ann Dermatol*, 2017, 29(5): 621-625.
- [12] 车坤兰,何凤仪,谭淑娴,曾改鸿,陈盛强. 子宫内膜异位症与肿瘤坏死因子 TNF α -238G/A 基因多态性的关系 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(2): 119-122.
- [13] Yucl N, Baskent E, Karamustafaoglu Balci B, et al. The levonorgestrel-releasing intrauterine system is associated with a reduction in dysmenorrhoea and dyspareunia, a decrease in CA 125 levels, and an increase in quality of life in women with suspected endometriosis [J]. *Aust N Z J Obstetr Gynaecol*, 2018, 58(5): 560-563.
- [14] Ke X, Qian H, Kang L, et al. Clinical analyses of endometriosis after conservative surgery [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11):21703-21706.

miR-155-5p 靶向 *FNDC3B* 基因通过 NF- κ B 信号通路调控骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡

谢进¹ 舒莉莉^{2*} 苏虔¹ 肖雄¹

[摘要] 目的 探讨 miR-155-5p 对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响及分子机制。方法 分离培养软骨细胞,设置对照(NC)组、白细胞介素-1 β (IL-1 β)组、1、2、3、4、5组。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-155-5p 和 III 型纤维连接蛋白结构域蛋白 3B(FNDC3B)mRNA 表达水平;蛋白质印迹(Western blot)法检测 FNDC3B、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved-caspase-3)、磷酸化 p65(p-p65)、磷酸化核因子 kappaB 抑制蛋白 α (p-I κ B α)蛋白表达;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞存活率;流式细胞术检测细胞凋亡;双荧光素酶报告实验验证 miR-155-5p 和 FNDC3B 的靶向关系。结果 IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-155-5p 高表达(3.12 \pm 0.31 vs 1.00 \pm 0.10),FNDC3B mRNA(0.36 \pm 0.03 vs 1.03 \pm 0.11)和蛋白(0.40 \pm 0.04 vs 0.88 \pm 0.08)低表达(P <0.05),且 IL-1 β 可诱导软骨细胞凋亡(20.46 \pm 2.05 vs 6.33 \pm 0.60)。抑制 miR-155-5p 表达,IL-1 β 诱导的软骨细胞中细胞存活率升高(83.12 \pm 8.30 vs 49.05 \pm 4.91),细胞凋亡率降低(9.86 \pm 0.98 vs 18.26 \pm 1.80)(P <0.05);过表达 FNDC3B,细胞存活率升高(89.05 \pm 8.90 vs 50.77 \pm 5.10),细胞凋亡率降低(10.66 \pm 1.08 vs 19.89 \pm 1.95)(P <0.05)。miR-155-5p 靶向调控 FNDC3B;抑制 miR-155-5p 表达可抑制 p-p65、p-I κ B α 表达;低表达 FNDC3B 可以部分逆转 miR-155-5p 低表达对 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖、凋亡及 NF- κ B 信号通路的影响。结论 抑制 miR-155-5p 表达可能通过上调 FNDC3B 促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡,且其可能与 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] miR-155-5p; FNDC3B; 骨关节炎; 软骨细胞; 增殖; 凋亡; NF- κ B 信号通路

miR - 155 - 5p targeting *FNDC3B* gene regulates osteoarthritis chondrocyte proliferation and apoptosis through NF- κ B signaling pathway

XIE Jin¹, SHU Lili^{2*}, SU Qian¹, XIAO Xiong¹

(1. Department of Orthopedics, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530021; 2. Department of Respiratory Diseases, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning, Guangxi, China, 530021)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of miR-155-5p on the proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes and its molecular mechanism. Methods The chondrocytes were isolated and cultured, and the control (NC) group, interleukin-1 β (IL-1 β) group, 1, 2, 3, 4, 5 groups were set. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect miR-155-5p and fibronectin type III domain containing 3B (FNDC3B) mRNA expression. Western blot was used to detect FNDC3B and cyclin D1 (Cyclin D1), Cleaved caspase-3 (Cleaved-caspase-3), phosphorylated p65 (p-p65), phosphorylated nuclear factor kappaB inhibitor protein α (p-I κ B α) protein. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell survival rate; flow cytometry was used to detect cell apoptosis; dual luciferase report experiment was used to verify

基金项目:广西自治区中医局科研课题(GZZC2019019)

作者单位:1. 广西国际壮医医院骨伤科,广西,南宁 530021

2. 广西国际壮医医院呼吸病科,广西,南宁 530021

*通信作者:舒莉莉, E-mail:349653959@qq.com

the targeting relationship between miR-155-5p and FNDC3B. **Results** L-1 β induced high expression of miR-155-5p in chondrocytes (3.12 ± 0.31 vs 1.00 ± 0.10), low expression of FNDC3B mRNA (0.36 ± 0.03 vs 1.03 ± 0.11) and protein (0.40 ± 0.04 vs 0.88 ± 0.08) ($P<0.05$), and IL-1 β can induce chondrocyte apoptosis (20.46 ± 2.05 vs 6.33 ± 0.60). Inhibition of miR-155-5p expression, IL-1 β -induced chondrocyte cell survival rate was increased (83.12 ± 8.30 vs 49.05 ± 4.91), cell apoptosis rate was decreased (9.86 ± 0.98 vs 18.26 ± 1.80) ($P<0.05$). Overexpression of FNDC3B, the cell survival rate was increased (89.05 ± 8.90 vs 50.77 ± 5.10) and the apoptosis rate was decreased (10.66 ± 1.08 vs 19.89 ± 1.95) ($P<0.05$). miR-155-5p targeted regulation of FNDC3B, inhibiting miR-155-5p expression can inhibit p-p65 and p-I κ B α levels. Down regulation of FNDC3B can partially reverse the miR-155-5p low expression on chondrocyte proliferation, apoptosis and the influence of NF- κ B signaling pathway induced by IL-1 β . **Conclusions** Inhibition of miR-155-5p expression may promote IL-1 β -induced chondrocyte proliferation and inhibit apoptosis by up-regulating FNDC3B, and it may be related to the NF- κ B signaling pathway.

[KEY WORDS] MiR-155-5p; FNDC3B; Osteoarthritis; chondrocytes; Proliferation; apoptosis; NF- κ B signaling pathway

骨性关节炎是退行性骨科疾病,关节软骨进行性破坏,软骨基质降解、滑膜炎症、软骨细胞凋亡等均是造成骨性关节炎的重要原因^[1]。研究表明,miRNA影响骨性关节炎的形成和发展,可作为骨性关节炎的新型生物标志物和骨性关节炎治疗靶点^[2]。研究报告,类风湿关节炎和骨关节炎患者滑膜组织中miR-155高表达^[3]。类风湿关节炎患者血清中miR-155-5p高表达,其表达水平可作为类风湿关节炎诊断和活跃度观察指标^[4]。miR-155还可抑制软骨细胞的自噬^[5]。Ⅲ型纤维连接蛋白结构域蛋白3B(fibronectin type Ⅲ domain containing 3B, FNDC3B)定位于染色体3q26上,下调FNDC3B可降低舌鳞癌细胞的增殖及侵袭迁移能力^[6]。然而miR-155-5p和FNDC3B对关节软骨细胞增殖和凋亡的影响及miR-155-5p是否通过调控FNDC3B影响软骨细胞增殖和凋亡还尚不清楚。白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)是一种促炎因子,其可诱导软骨细胞凋亡^[7]。因此,本实验通过用白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)处理软骨细胞建立骨性关节炎模型,研究miR-155-5p对关节软骨细胞增殖和凋亡的影响及其机制是否与FNDC3B有关。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年12月在本院行关节置换术患者的关节软骨组织5例,其中男性3例,女性2例;年龄(62.1 ± 5.23)岁;骨性关节炎的诊断标准参照美国风湿病学会膝骨关节炎诊断标准^[8]。排除免疫性及其他可影响关节炎病情的合

并症,所有患者均同意且知情。

1.2 材料

DMEM完全培养基(含10%胎牛血清)购自北京绿源伯德生物科技有限公司;青链霉素购自上海北诺生物科技有限公司;胰蛋白酶购自美国Sigma公司;Ⅱ胶原酶购自大连美仑生物技术有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)购自武汉纯度生物科技有限公司;Trizol试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自美国Progema公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、RIPA蛋白裂解液购自碧云天生物技术研究所;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京Solarbio公司。

1.3 软骨细胞的分离培养

取关节软骨组织,去除滑膜等其他组织后剪成碎块,PBS冲洗3次后放入含0.25%的胰蛋白酶中消化30 min,再用0.1%的Ⅱ胶原酶消化30 min,消化后用200目筛网过滤分离,将细胞置于含1%青链霉素的DMEM完全培养基中于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下培养,取第2~3代细胞用于后续实验。

1.4 细胞处理与分组

用10 ng/mL IL-1 β 处理软骨细胞24 h建立关节炎软骨细胞模型,记为IL-1 β 组,正常培养的细胞作为对照(NC)组;将anti-miR-NC、anti-miR-155-5p、pcDNA-NC、pcDNA-FNDC3B转染至软骨细胞中后用10 ng/mL IL-1 β 处理,记为1(IL-1 β +anti-miR-NC)组、2(IL-1 β +anti-miR-155-5p)组、3(IL-1 β +pcDNA-NC)组、4(IL-1 β +pcDNA-FNDC3B)组;将anti-miR-155-5p与si-NC、si-FNDC3B共转染

至软骨细胞中后用 10 ng/ml IL-1 β 处理, 记为 5 (IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-NC) 组、6 (IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-FNDC3B) 组。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 miR-155-5p 和 FNDC3B mRNA 表达水平

按文献方法^[6]进行操作。miR-155-5p 和 FNDC3B 分别以 U6 和 GAPDH 为内参。

1.6 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测 FNDC3B、CyclinD1、Cleaved-caspase-3、p-p65、p-I κ B α 蛋白表达

按文献方法^[6]进行操作。其中一抗稀释浓度为 1:1 000, 二抗稀释浓度为 1:2 000。

1.7 CCK-8 检测细胞存活率

培养 48 h 的细胞, 每孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 酶标仪检测各组细胞 490 nm 波长处的吸光度值 (OD)。细胞存活率 (%) = 实验组 OD 值 / 空白对照组 OD 值 \times 100%。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡及双荧光素酶报告实验验证

培养 48 h 细胞, PBS 漂洗 2 次, 分别加 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ L, 轻摇混匀, 常温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

构建含有 miR-155-5p 结合位点的 FNDC3B-3' UTR 野生型及突变型报告基因载体, 在软骨细胞中转染 miR-155-5p mimics 和 FNDC3B 野生型及突变型报告基因载体。转染 48 h 后, 根据试剂盒说明检测荧光素酶活性。将 miR-NC、miR-155-5p、anti-miR-NC、anti-miR-155-5p 转染至软骨细胞中, 按 1.5 中方法检测 FNDC3B 蛋白表达。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较行 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 IL-1 β 诱导的软骨细胞中, miR-155-5p 和 FNDC3B 表达情况

与对照组相比, IL-1 β 组软骨细胞中 miR-155-5p 表达水平升高, FNDC3B mRNA 和蛋白表达水平降低差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。

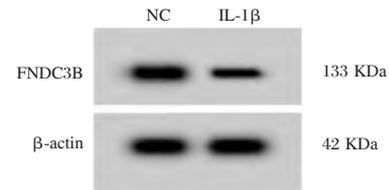


图 1 Western Blot 检测 FNDC3B 蛋白表达

Figure 1 Western Blot detection of FNDC3B protein expression

表 1 IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-155-5p 和 FNDC3B 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Expression of miR-155-5p and FNDC3B in chondrocytes induced by IL-1 β ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-155-5p	FNDC3B mRNA	FNDC3B protein
NC	1.00 \pm 0.10	1.03 \pm 0.11	0.88 \pm 0.08
IL-1 β	3.12 \pm 0.31	0.36 \pm 0.03	0.40 \pm 0.04
<i>t</i> 值	19.525	17.629	16.100
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

2.2 低表达 miR-155-5p 对 IL-1 β 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

与对照组相比, IL-1 β 组软骨细胞中 miR-155-5p 表达水平升高, CyclinD1 表达水平降低, Cleaved-caspase-3 表达水平升高, 细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 1 组相比, 2 组软骨细胞中 miR-155-5p 表达水平降低, CyclinD1 表达水平升高, Cleaved-caspase-3 表达水平降低, 细胞存活率升高, 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 低表达 miR-155-5p 促进软骨细胞增殖, 抑制其凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Low expression of miR-155-5p promotes chondrocyte proliferation and inhibits apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-155-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率 (%)	细胞凋亡率 (%)
NC	1.00 \pm 0.12	0.72 \pm 0.07	0.40 \pm 0.04	102.11 \pm 10.01	6.33 \pm 0.60
IL-1 β	3.21 \pm 0.32 ^a	0.34 \pm 0.03 ^a	0.95 \pm 0.10 ^a	52.13 \pm 5.20 ^a	20.46 \pm 2.05 ^a
1 组	3.16 \pm 0.30	0.36 \pm 0.04	0.98 \pm 0.08	49.05 \pm 4.91	18.26 \pm 1.80
2 组	1.42 \pm 0.14 ^b	0.61 \pm 0.06 ^b	0.58 \pm 0.05 ^b	83.12 \pm 8.30 ^b	9.86 \pm 0.98 ^b
<i>F</i> 值	211.488	115.064	141.820	106.311	185.624
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 NC 比较, ^a $P < 0.05$; 与 IL-1 β +anti-miR-NC 比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.3 高表达 FNDC3B 对 IL-1 β 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

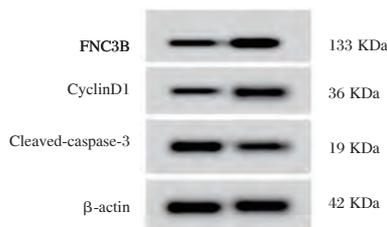
与3组相比,4组软骨细胞中 FNDC3B 表达水

平升高,CyclinD1 表达水平升高,Cleaved-caspase-3 表达水平降低,细胞存活率升高,细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。表3,见图2。

表3 高表达 FNDC3B 对 IL-1 β 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 3 Effect of high expression of FNDC3B on IL-1 β -treated chondrocyte proliferation and apoptosis ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	FNDC3B	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率(%)	细胞凋亡率(%)
3组	0.42 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03	0.99 \pm 0.10	50.77 \pm 5.10	19.89 \pm 1.95
4组	0.74 \pm 0.07	0.60 \pm 0.06	0.55 \pm 0.03	89.05 \pm 8.90	10.66 \pm 1.08
<i>t</i> 值	11.907	11.628	12.643	11.196	12.422
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



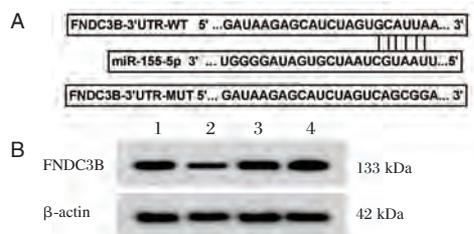
注:1. IL-1 β +pcDNA-NC; 4. IL-1 β +pcDNA-FNDC3B。

图2 Western Blot 检测 FNDC3B、CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 的蛋白表达

Figure 2 Western Blot detection of protein expression of FNDC3B, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3

2.4 miR-155-5p 靶向 FNDC3B

starbase 数据库预测显示 miR - 155 - 5p 与 FNDC3B 存在结合位点(图 3A)。荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 组相比,miR-155-5p 组中转染 FNDC3B 野生型载体的细胞荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$);而转染 FNDC3B 突变型载体的细胞荧光素酶活性无显著差异(表 4)。与 miR-NC 组相比,miR-155-5p 组 FNDC3B 表达水平降低 ($P<0.05$),与 anti-miR-NC 组相比,anti-miR-155-5p 组 FNDC3B 表达水平升高 ($P<0.05$)(图 3B)。



注:A 为 starbase 对 miR-155-5p 和 FNDC3B 结合进行预测示意图; B 为 Western Blot 检测 FNDC3B 表达量。1. miR-NC; 2. miR-155-5p; 3. anti-miR-NC; 4. anti-miR-155-5p。

图3 miR-155-5p 靶向调控 FNDC3B 表达

Figure 3 miR-155-5p targets FNDC3B expression

表4 miR-NC 或 miR-155-5p 与报告质粒共转染软骨细胞后双荧光素酶活性检测 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Detection of double luciferase activity after co-transfection of miR-NC or miR-155-5p with reporter plasmid ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	荧光素酶活性	
	WT	MUT
miR-NC	1.00 \pm 0.11	1.03 \pm 0.10
miR-155-5p	0.41 \pm 0.04	1.01 \pm 0.12
<i>t</i> 值	15.122	0.384
<i>P</i> 值	0.000	0.706

2.5 低表达 FNDC3B 可以部分逆转 miR-155-5p 低表达对 IL-1 β 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响

与5组相比,6组 FNDC3B 表达水平降低,CyclinD1 表达水平降低,Cleaved-caspase-3 表达水平升高,细胞存活率降低,细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)见图4,表5。



注:1. IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-NC; 2. IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-FNDC3B。

图4 Western Blot 检测 FNDC3B、CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

Figure 4 Western Blot detection of FNDC3B, CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 protein expression

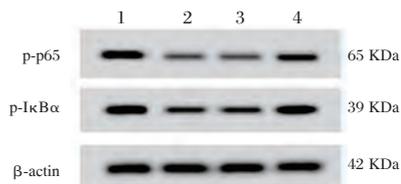
2.6 IL-1 β 处理的软骨细胞中 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达

与1组相比,2组软骨细胞中 p-p65、p-I κ B α 表

表5 低表达 FNDC3B 可以部分逆转 miR-155-5p 低表达对 IL-1 β 处理的软骨细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 5 Low expression of FNDC3B can partially reverse the effect of miR-155-5p low expression on IL-1 β -treated chondrocyte proliferation and apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	FNDC3B	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率(%)	细胞凋亡率(%)
5组	0.74 \pm 0.07	0.63 \pm 0.06	0.55 \pm 0.05	84.55 \pm 8.50	9.03 \pm 0.90
6组	0.53 \pm 0.05	0.42 \pm 0.04	0.86 \pm 0.08	61.07 \pm 6.11	15.67 \pm 1.53
t值	7.324	8.737	9.858	6.729	11.222
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

达水平降低($P<0.05$);与5组相比,6组软骨细胞中 p-p65、p-I κ B α 表达水平升高($P<0.05$)。见图5。



注:1. IL-1 β +anti-miR-NC; 2. IL-1 β +anti-miR-155-5p; 3. IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-NC; 4. IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-FNDC3B。与 IL-1 β +anti-miR-NC 比较, $^a P<0.05$; 与 IL-1 β +anti-miR-155-5p+si-NC 比较, $^b P<0.05$ 。

图5 Western Blot 检测 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达Figure 5 Western Blot detection of p-p65 and p-I κ B α protein expression

3 讨论

关节软骨破坏是骨关节炎重要特征,软骨细胞凋亡是软骨破坏的主要原因,其在骨关节炎的发病中起重要作用^[9]。研究表明 miRNA 参与了骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡及细胞炎症等^[10]。研究报道塞来昔布治疗后膝骨关节炎患者中 miR-155-5p 表达水平降低^[11]。miR-155-5p 表达水平的降低改善了膝骨关节炎^[12]。本实验结果显示,IL-1 β 诱导的软骨细胞中 miR-155-5p 高表达;抑制 miR-155-5p 表达,IL-1 β 诱导的软骨细胞中 CyclinD1 表达水平升高, Cleaved-caspase-3 表达水平降低,细胞存活率升高,细胞凋亡率降低。说明抑制 miR-155-5p 表达可促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡。为进一步研究 miR-155-5p 影响软骨细胞增殖、凋亡的机制,本实验预测了 miR-155-5p 可能的靶 mRNA,结果显示,miR-155-5p 可靶向调控 FNDC3B,本实验结果显示,IL-1 β 诱导的软骨细胞中 FNDC3B 低表达;过表达 FNDC3B 可促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡。且本实验还发现低表达 FNDC3B 可以部分逆转 miR-155-5p 低表达对

IL-1 β 处理的软骨细胞增殖、凋亡的影响。提示,miR-155-5p 可能通过调控 FNDC3B 影响软骨细胞增殖和凋亡。

研究表明核因子- κ B (Nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路参与并调控软骨细胞的增殖、分化、凋亡,在骨关节炎的发生、发展中扮演着十分重要的角色^[13]。槲皮素通过抑制 NF- κ B 激活减弱炎症环境下软骨细胞基质降解和细胞凋亡,起到保护软骨的作用^[14]。miR-155-5p 可通过调控 NF- κ B 维持类风湿性关节炎的炎症稳态^[15]。本实验结果显示,抑制 miR-155-5p 表达,p-p65、p-I κ B α 表达水平显著降低;说明抑制 miR-155-5p 表达可抑制 NF- κ B 信号通路激活。而低表达 FNDC3B 部分逆转了 miR-155-5p 低表达对 NF- κ B 信号通路的抑制作用。提示,miR-155-5p 可能通过调控 FNDC3B 进而影响 NF- κ B 信号通路。

综上所述,抑制 miR-155-5p 表达可能通过上调 FNDC3B 促进 IL-1 β 诱导的软骨细胞增殖,抑制细胞凋亡,且其可能与 NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] 杨翔,林向进. 骨性关节炎治疗方法的研究进展[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(9): 900-903.
- [2] 赵园园,代思明,张跃,等. miRNAs 对骨关节炎调控的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(3): 235-237.
- [3] Kriegsmann M, Randau TM, Gravius S, et al. Expression of miR-146a, miR-155, and miR-223 in formalin-fixed paraffin-embedded synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis[J]. Virchows Arch, 2016, 469(1): 93-100.
- [4] 邹映东,林云,张兴宗,等. 血清 miR-146a-3p、miR-155-5p 表达水平在类风湿关节炎诊疗中的临床应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(18): 2607-2609.
- [5] D' Adamo S, Alvarez-Garcia O, Muramatsu Y, et al. MicroRNA-155 suppresses autophagy in chondrocytes by modulating expression of autophagy proteins[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(6): 1082-1091. (下转第 927 页)

· 论 著 ·

胃癌患者 TNS1 蛋白、PDK-1 蛋白阳性表达意义及与临床病理特征、预后的相关性

李伟伟* 杨庆辉 蔡卫梅

[摘要] **目的** 探讨胃癌患者张力蛋白1(TNS1)、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK-1)阳性表达意义及与临床病理特征、预后的相关性。**方法** 选取112例胃癌患者临床病理资料,收集患者术后胃癌组织及对应癌旁组织病理学标本,行免疫组织化学染色检测。观察统计胃癌组织与癌旁组织 TNS1 蛋白、PDK-1 蛋白阳性表达,胃癌组织中 TNS1 蛋白、PDK-1 蛋白表达与临床病理特征及预后相关性。**结果** 胃癌组织中 TNS1、PDK-1 蛋白阳性表达率高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$);胃癌患者发生淋巴结转移与未发生淋巴结转移癌组织中 TNS1 蛋白阳性表达率相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);胃癌患者不同肿瘤最大直径、病理学分级、TMN 分期、浸润深度及发生淋巴结转移与否胃癌组织中 PDK-1 蛋白阳性表达率相比,差异有统计学意义($P<0.05$);胃癌组织中 PDK-1 蛋白阳性表达者3年总体生存率低于阴性表达者,TNS1 蛋白阳性表达者3年总体生存率高于阴性表达者($P<0.05$)。**结论** 胃癌发生后 PDK-1、TNS1 蛋白呈高表达状态,且二者与患者临床病理特征有关,检测胃癌组织中 PDK-1、TNS1 蛋白表达对胃癌患者预后评估具有重要指导意义。

[关键词] 胃癌; Tensin1 蛋白; PDK-1 蛋白; 临床病理特征; 预后

Significance of TNS1 and PDK-1 protein expression in gastric cancer patients and their correlation with clinicopathological features and prognosis

LI Weiwei*, YANG Qinghui, CAI Weimei

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, China, 453100)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the significance of positive expression of tensin 1 (TNS1) and phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1) in patients with gastric cancer and their correlation with clinicopathological features and prognosis. **Methods** The clinical and pathological data of 112 patients with gastric cancer were selected, and the postoperative gastric cancer tissues and corresponding histopathological specimens were collected for immunohistochemical staining. The expressions of TNS1 protein and PDK-1 protein in gastric cancer tissues and adjacent tissues, the correlation between the expression of TNS1 protein and PDK-1 protein and clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer tissues were observed and statistically correlated. **Results** The positive expression rate of TNS1 and PDK-1 protein in gastric cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); lymph node metastasis in patients with gastric cancer compared with the positive expression rate of TNS1 protein in cancer tissues without lymph node metastasis, there was a statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the positive expression rate of PDK-1 protein in gastric cancer tissues, the maximum diameter, pathological grade, TMN stage, invasion depth and lymph node metastasis of gastric cancer patients were sta-

基金项目:河南省科技攻关项目(201702123)

作者单位:新乡医学院第一附属医院肿瘤内科二病区,河南,新乡 453100

*通信作者:李伟伟, E-mail: 13837384916@163.com

tistically significant ($P<0.05$); PDK in gastric cancer tissues the 3-year overall survival rate of -1 protein positive expression was lower than that of negative expression, and the 3-year overall survival rate of TNS1 protein positive expression was higher than that of negative expression ($P<0.05$). **Conclusion** After gastric cancer, PDK-1 and TNS1 proteins are highly expressed, and both are related to the clinicopathological characteristics of patients. Detecting the expression of PDK-1 and TNS1 proteins in gastric cancer tissues has an important significance for the prognosis of gastric cancer patients.

[KEY WORDS] Gastric cancer; TNS1 protein; PDK-1 protein; Clinicopathological characteristics; Prognosis

胃癌为消化系统常见恶性肿瘤,据相关调查显示,全世界胃癌发病率10~150/10万,我国作为胃癌高发国家,其发病率逐年增长,每年新确诊患者约40万人,死亡26万/年,位居癌症死亡首位^[1-2]。尽管近年来针对胃癌的基础研究已取得一定进展,如胃癌分子分型实现了重大突破,但临床上用于预测胃癌预后的分子标志物仍十分有限。磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(Phosphoinositol-dependent protein kinase 1, PDK-1)作为一种由556个包含C端PH结构域、N端激酶结构域氨基酸组成的单体多肽酶,与肿瘤发生、发展、凋亡密切相关^[3]。张力蛋白1(Tensin1, TNS1)属于Tensin蛋白家族,其作用与细胞运动、黏度及信号转导有关^[4],有学者指出,TNS1蛋白与乳腺癌转移有关,并影响患者预后^[5]。基于此,本研究检测胃癌患者组织中TNS1蛋白、PDK-1蛋白阳性,探究其与患者临床病理特征、预后的相关性。结果如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年5月至2016年10月本院112例胃癌患者临床病理资料,男79例,女33例,年龄40~72岁,平均年龄(56.42±8.65)岁。收集112例患者胃癌组织及对应癌旁组织病理学标本,判定组织类型、细胞分级、肌层浸润、淋巴结转移。纳入标准:①病理学确诊为胃腺癌;②病理科医师确认石蜡包埋病理学组织可用于切片进行免疫组织化学染色检测;③临床病理及随访资料完整;患者自愿签署知情同意书;排除标准:①术前未行放化疗及生物靶向治疗;②因标本中组织蛋白降解造成免疫组化染色结果不满意;③临床病理及随访资料缺失。本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂

山羊抗人TNS1多克隆抗体、PDK-1抗体购自

英国Abcam公司,免疫组织化学染色试剂盒及二胺基联苯胺显色试剂盒购自中国福州迈新生物公司。

1.3 检测方法

1.3.1 TNS1、PDK-1蛋白

制作5 μm正常癌旁组织、胃癌组织石蜡切片, H₂O₂(3%)液常温阻断内源性过氧化氢酶活性,微波修复抗原, PBS常规冲洗,山羊抗人TNS1多克隆抗体工作液(1:100稀释), PDK-1抗体工作液(1%), 4℃过夜,加入二抗(IgG),室温30 min,链霉素康生物蛋白-过氧化物加入后, PBS冲洗, DAB显色,苏木素复染,脱水透明、封片。

1.3.2 判定方法

双盲法统计结果,采用半定量法,即染色阳性细胞比例与染色强度等级之乘积。随机抽取10个高倍视野(×400)计数,阳性细胞<10为0级,10%~25%为1级,26%~50%为2级,51%~75%为3级,76%~100%为4级;根据染色强度:无色为0级,淡黄色为1级,棕黄色为2级,棕褐色为3级,根据等级之乘积,<6为阴性,≥6为阳性。

1.4 观察指标

观察统计胃癌组织与癌旁组织TNS1蛋白、PDK-1蛋白阳性表达,胃癌组织中TNS1蛋白、PDK-1蛋白表达与临床病理特征及预后相关性,并分析胃癌患者预后危险因素。

1.5 统计学方法

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

2 结果

2.1 两组中TNS1蛋白、PDK-1蛋白阳性表达率

胃癌组织中TNS1、PDK-1蛋白阳性表达率高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组TNS1蛋白、PDK-1蛋白阳性表达率 [n(%)]

Table 1 positive expression rates of TNS1 protein and pdk-1 protein in 2 groups [n(%)]

组别	n	TNS1 蛋白	PDK-1 蛋白
胃癌组织	112	92(82.14)	84(75.00)
癌旁组织	112	47(41.96)	2(1.79)
χ^2 值		38.392	126.911
P 值		0.000	0.000

2.2 TNS1、PKK-1 蛋白表达与胃癌临床病理特征相关性

不同年龄、性别、肿瘤最大直径、病理学分级、

TMN 分期及浸润深度患者胃癌组织中 TNS1 蛋白阳性表达率相比,差异无统计学意义($P>0.05$),胃癌患者发生淋巴结转移与未发生淋巴结转移胃癌组织中 TNS1 蛋白阳性表达率相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 随访和生存情况

胃癌组织中 PDK-1 蛋白阳性表达者 3 年总体生存率低于阴性表达者, TNS1 蛋白阳性表达者 3 年总体生存率高于阴性表达者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3、图1。

表2 TNS1、PDK-1 蛋白表达与胃癌临床病理特征相关性[n(%)]

Table 2 correlation between TNS1、PDK-1 protein expression and clinicopathological features of gastric cancer [n(%)]

临床病理特征	n	TNS1 蛋白阳性率	χ^2 值	P 值	PDK-1 蛋白阳性率	χ^2 值	P 值	
性别	男	79	84.71(67/79)	1.300	0.254	77.22(61/79)	0.702	0.402
	女	33	75.76(25/33)			69.70(23/33)		
年龄	<65 岁	76	80.26(61/76)	0.570	0.450	72.37(55/76)	2.360	0.124
	≥65 岁	36	86.11(31/36)			80.56(29/36)		
肿瘤最大直径	<5 cm	62	79.03(49/62)	0.916	0.339	64.52(40/62)	8.141	0.004
	≥5 cm	50	86.00(43/50)			88.00(44/50)		
病理学分级	低分化	29	68.97(20/29)	4.680	0.096	44.83(13/29)	19.405	0.000
	中分化	33	87.88(29/33)			81.82(27/33)		
	高分化	50	86.00(43/50)			88.00(44/50)		
TMN 分期	I~II	53	79.25(42/53)	0.576	0.448	54.72(29/53)	22.075	0.000
	III~IV	59	84.75(50/59)			93.22(55/59)		
浸润深度	无浸润	30	70.00(21/30)	5.710	0.058	53.33(16/30)	12.873	0.002
	浸润<1/2	46	91.30(42/46)			76.09(35/46)		
淋巴结转移	是	46	63.04(29/46)	19.413	0.000	91.67(33/36)	11.067	0.001
	否	66	95.45(63/66)			63.64(42/66)		

表3 PDK-1 蛋白、TNS1 蛋白表达与胃癌 3 年总体生存率的相关性

Table 3 correlation between expression of pdk-1 protein and TNS1 protein and 3-year overall survival rate of gastric cancer

项目	TNS1 蛋白		PDK-1 蛋白	
	阳性(n=92)	阴性(n=20)	阳性(n=84)	阴性(n=28)
3 年生存率	62(67.39)	8(40.00)	45(53.57)	25(89.29)
χ^2 值	5.259		11.429	
P 值	0.022		0.001	

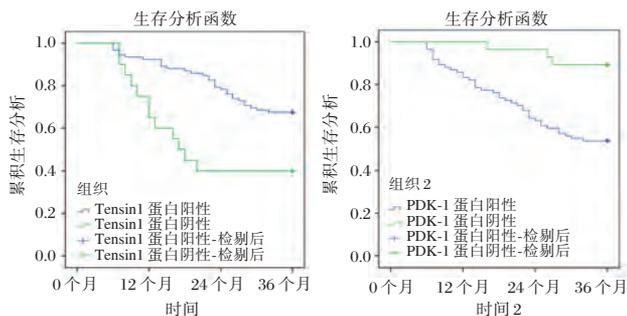


图1 TNS1、PDK-1 生存分析

Figure 1 TNS1、PDK-1 survival analysis

3 讨论

研究表明, Tensin 蛋白广泛参与细胞黏附、增殖、分化、迁移、凋亡、侵袭、转移等肿瘤生物学活动^[6]。目前, 研究最为广泛、深入的 Tensin 家族成员为 Tensin4 蛋白, 其与胃癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤发生、发展密切相关^[7], 其次为 Tensin2、Tensin3 蛋白, 二者可能发挥抑癌作用^[8], TNS1 蛋白与肿瘤相关性亦有少量报道。本研究分析 TNS1 蛋白表达与胃癌的关系, 结果显示 TNS1 蛋白可能与

胃癌发病有关。进一步分析表明,胃癌淋巴结转移患者 TNS1 蛋白阳性表达率低于无淋巴结转移患者,且 TNS1 蛋白阳性表达患者 3 年总体生存率高于阴性表达者,提示 TNS1 蛋白负性调控胃癌转移。国外学者 Hall 等^[9]表明,乳腺癌携带 TNS1 蛋白特定突变基因型,细胞系 MDA-MB231 迁移与侵袭能力明显增强,提示乳腺癌转移中, TNS1 蛋白具有潜在作用。另有学者指出,敲低不同乳腺癌细胞系中 TNS1 蛋白表达水平,可增强乳腺癌细胞系侵袭能力,促进乳腺癌转移,且进一步研究表明,乳腺癌转移组织中, TNS1 蛋白表达显著下降,且 TNS1 蛋白高表达患者无转移生存时间相对较长^[10]。综合上述研究结果表明, TNS1 蛋白可能同时具有促癌、抑制肿瘤转移作用。国外学者在研究前列腺癌 GRHL2 基因时发现其也具有类似双重作用,一方面维持雄激素受体水平,增强活性,促进前列腺癌发生,另一方面抑制上皮-间叶转化、细胞侵袭活性,抑制前列腺癌转移^[11]。但 TNS1 蛋白的双重作用仍有待细胞功能实验及机制研究结果证实。

PDK-1 在肿瘤发生、发展中发挥重要作用^[12]。PDK-1 通过激活 AGC 激酶家族,调控肿瘤细胞增殖,其中 PI3K/PKB 即为经典调控通路。本研究中提示 PDK-1 蛋白参与胃癌发病, PDK-1 促进细胞增殖同时,还可抑制细胞凋亡,乳腺癌中高度表达 PDK-1 细胞株增殖能力明显高于野生株^[13]。PDK-1 蛋白阳性表达的肿瘤细胞黏附内皮细胞能力强,而肿瘤细胞与内皮细胞紧密结合才可穿过细胞外基质层,建立转移灶^[14]。另有研究表明, PDK-1 在人胚胎组织中广泛表达,在正常甲状腺中表达正常,甲状腺癌患者 PDK-1 蛋白表达异常增加,且随着甲状腺癌患者 TMN 分期发展, PDK-1 表达随之升高^[15]。本研究结果提示 PDK-1 蛋白表达与胃癌病情进展及肿瘤恶性程度有关。本研究中 PDK-1 蛋白阳性表达者 3 年总体生存率低于阴性表达者,说明 PDK-1 可促进癌细胞分化,增强侵袭、迁移能力,其高表达可降低胃癌患者预后。

综上所述, PDK-1、TNS1 蛋白在胃癌组织中高表达, PDK-1 蛋白阳性表达与肿瘤最大直径、病理学分级、TMN 分期、浸润深度及淋巴结转移有关, TNS1 蛋白阳性表达与淋巴结转移呈负相关,均与胃癌预后密切相关,检测胃癌组织中 PDK-1、TNS1 蛋白表达对胃癌病情及预后评估具有重要指导意义。

参考文献

- [1] Yoon JY, Sy K, Brezden-Masley C, et al. Histo- and immunohistochemistry-based estimation of the TCGA and ACRG molecular subtypes for gastric carcinoma and their prognostic significance: A single-institution study[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0224812.
- [2] 徐本玲,袁龙,袁鹏,等. 胃癌患者外周及肿瘤组织中 CD4+T 淋巴细胞上 Tim-3 的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(1): 108-112.
- [3] 吴金训. PDK-1 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *中外医学研究*, 2019, 17(29): 73-75.
- [4] Goreczny GJ, Forsythe IJ, Turner CE. Hic-5 regulates fibrillar adhesion formation to control tumor extracellular matrix remodeling through interaction with tensin1 [J]. *Oncogene*, 2018, 37(13): 1699-1713.
- [5] Shih YP, Sun P, Wang A, et al. Tensin1 positively regulates RhoA activity through its interaction with DLC1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(12): 3258-3265.
- [6] Blangy A. Tensins are versatile regulators of Rho GTPase signaling and cell adhesion [J]. *Biol Cell*, 2017, 109(3): 115-126.
- [7] Chan LK, Chiu YT, Sze M F, et al. Tensin4 is up-regulated by EGF-induced ERK1/2 activity and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 20964-20976.
- [8] Hong SY, Shih YP, Sun P, et al. Down-regulation of tensin2 enhances tumorigenicity and is associated with a variety of cancers [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 38143-38153.
- [9] Hall EH, Daugherty AE, Choi CK, et al. Tensin1 Requires Protein Phosphatase-1? in Addition to RhoGAP DLC-1 to Control Cell Polarization, Migration, and Invasion [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 34713-34722.
- [10] Zhan Y, Liang X, Li L, et al. MicroRNA-548j functions as a metastasis promoter in human breast cancer by targeting Tensin [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(6): 838-849.
- [11] Paltoglou S, Das R, Townley SL, et al. Novel Androgen Receptor Coregulator GRHL2 Exerts Both Oncogenic and Antimetastatic Functions in Prostate Cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 3417-3430.
- [12] 刘田田,毕经旺. 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 在肿瘤发生发展及治疗中的作用 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2016, 43(4): 285-288.
- [13] 王耀晨. PI3K 抑制剂 ZSTK474 对乳腺癌细胞 MCF-7 的作用及分子机理 [D]. 天津医科大学, 2016.
- [14] 宋瑞鹏,赵亮,谭洪宇,等. 磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路下 p53 基因对骨肉瘤细胞增殖及转移的抑制作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(1): 26-28.
- [15] Ávila-Flores A, Arranz-Nicolás J, Andradá E, et al. Predominant contribution of DGK ζ over DGK α in the control of PKC/PDK-1-regulated functions in T cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(6): 549-563.

· 论 著 ·

IL-8、IL-6、hs-CRP在缺血性脑血管病手术前后表达变化及临床价值

任英巧^{1*} 李占增² 伍淑玲² 陆艳卉²

[摘要] 目的 探讨白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-6(IL-6)、超敏C-反应蛋白(hs-CRP)在缺血性脑血管病(ICD)手术前后表达变化及临床价值。方法 选取本院ICD患者122例作为观察组,另选取同期健康体检者120例作为对照组。观察组均行血管内介入治疗,比较两组血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平,分析观察组术前、术后1、2、3个疗程时血清因子水平变化趋势,随访1年,分生存者、死亡者,比较不同预后患者临床资料及术前、术后1、2、3个疗程时血清因子水平,分析ICD患者1年后死亡的危险因素,Kaplan-Meier曲线进行生存分析。结果 观察组血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后1、2、3个疗程时血清IL-8、IL-6、hs-CRP低于术前,且呈降低趋势($P<0.05$);生存者术后1、2、3个疗程时血清IL-8、IL-6、hs-CRP低于术前及死亡者,差异有统计学意义($P<0.05$);Logistic回归系数分析显示,血管狭窄、高血压、糖尿病、吸烟、血清IL-8、IL-6、hs-CRP是ICD预后的独立危险因素($P<0.05$);术后3个疗程血清IL-8、IL-6、hs-CRP高表达者生存率低于低表达者($P<0.05$)。结论 ICD发病发展受多种因素影响,其中血清IL-8、IL-6、hs-CRP与ICD患者预后关系密切,可作为疾病诊断、预后预测的辅助性指标。

[关键词] 白细胞介素-8; 白细胞介素-6; 超敏C-反应蛋白; 缺血性脑血管病

The expression changes and clinical value of IL-8, IL-6 and hs-CRP before and after operation of ischemic cerebrovascular disease

REN Yingqiao^{1*}, LI Zhanzeng², WU Shuling², LU Yanhui²

(1. Neurology Dept, Tangshan Likang Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000; 2. Neurology Dept, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression and clinical value of interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), and hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) before and after operation of ischemic cerebrovascular disease (ICD). **Methods** 122 cases of ICD patients in Tangshan Likang Hospital were selected as the observation group, and 120 healthy persons in the same period were selected as the control group. The observation group all received intravascular interventional therapy. The levels of serum IL-8, IL-6 and hs-CRP between the two groups were measured and compared. The change trend of serum factor levels in the observation group were analyzed before operation and after 1, 2, and 3 courses of treatment. Followed up for 1 year, subjects were divided into the survivors and deceased groups, clinical data of patients with different prognosis and serum factor levels were compared during preoperative and postoperative 1, 2, and 3 courses of treatment. The risk factors were analyzed for death of ICD patients after 1 year, Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** The serum levels of IL-8, IL-6 and hs-CRP in the observation group were higher

基金项目:河北省卫生和计划生育委员会科研基金重点科技研究计划(20191610)

作者单位:1. 唐山利康医院神经内科 河北,唐山 063000

2. 唐山市人民医院神经内科 河北,唐山 063000

*通信作者:任英巧, E-mail:qq520886ab@163.com

than those in the control group ($P<0.05$). The serum IL-8, IL-6 and hs-CRP levels in 1, 2 and 3 courses after surgery were lower than those before surgery and showed a decreasing trend ($P<0.05$). The survivors' serum IL-8, IL-6 and hs-CRP at 1, 2 and 3 courses after surgery were lower than those before surgery and those who died before surgery ($P<0.05$). Logistic regression coefficient analysis showed that vascular stenosis, hypertension, diabetes, smoking, and serum IL-8, IL-6, hs-CRP levels were independent risk factors for ICD prognosis ($P<0.05$). The survival rate of those with high expression of serum IL-8, IL-6 and hs-CRP was lower than those with low expression after 3 courses of surgery ($P<0.05$). Conclusion The development of ICD is affected by many factors, among which the serum IL-8, IL-6, hs-CRP has are closely related to the prognosis of ICD patients, and can be used as an auxiliary indicator for disease diagnosis and prognosis prediction.

[KEY WORDS] Interleukin-8; Interleukin-6; Hypersensitive C-reactive protein; Ischemic cerebrovascular disease

缺血性脑血管病(Ischemic cerebrovascular disease, ICD)是因供血动脉痉挛、狭窄或闭塞等引起脑血流动力学异常变化致血流灌注降低而继发脑组织坏死、功能丧失的一类疾病。流行病学数据显示,我国成年人ICD发病率约占全部脑血管意外年发生率的80%,且具有较高致残率、死亡率、复发率等特征^[1]。目前血管介入治疗是ICD主要治疗手段,但其发病发展是一个复杂的过程,受诸多因素影响,相关研究显示,自由基增加、钙离子超载、相关凋亡基因异常表达及炎症反应等在ICD病理生理过程中发挥重要作用,其中炎症反应是诱发ICD的独立危险因素^[2]。但近年有研究显示,部分炎症因子在脑损伤中扮演双重角色,对神经组织具有保护作用,明确ICD介入治疗相关危险因素,及与外周血炎症因子间关系对改善预后具有重要意义^[3]。白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、超敏C-反应蛋白(Hypersensitive c-reactive protein, hs-CRP)是ICD发病发展中发挥重要作用的炎症因子^[4]。本研究尝试分析上述炎症因子在ICD手术前后表达及临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年1月至2019年9月ICD患者122例作为观察组,其中男82例,女40例,年龄31~74岁,平均(61.31±5.16)岁;另选取同期健康体检者120例作为对照组,其中男79例,女41例,年龄29~75岁,平均(60.01±5.04)岁。

纳入标准:①符合ICD诊断标准^[5];②症状性动脉直径狭窄>50%,无症状性狭窄>70%;③符合支架植入者,术前沟通且充分理解治疗风险;④既

往行支架植入后再狭窄者;⑤患者、家属知情,签署同意书。排除标准:①3个月有新发颅内出血者;②凝血功能障碍者;③对阿司匹林、肝素、造影剂过敏者;④伴恶性肿瘤、严重肝肾功能缺陷者;⑤高血压控制不理想者;⑥合并动脉瘤、动静脉畸形者。两组基础资料性别、年龄指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

观察组行血管内介入:常规血管内介入治疗,股动脉穿刺,置血管鞘,全身肝素化,导丝辅助将指引导管置病变血管近端,造影,确认靶部位;路径图指导微导丝穿越靶部位,固定;经微导丝将保护装置送入狭窄远端,释放,撤微导丝,取适宜球囊置狭窄段,透视,压力泵注射造影剂,球囊扩张满意即减压。术后常规抗感染、双联抗治疗。

1.2.2 IL-8、IL-6、hs-CRP检测

非抗凝真空管取晨空腹静脉血2 mL,离心15 min(半径8 cm,转速3 500 r/min)取血清,酶联免疫法测IL-8、IL-6、hs-CRP水平。试剂盒由南京森贝伽生物科技有限公司提供。

1.3 观察指标

对比两组血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平。对比观察组术后1、2、3个疗程时血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平。分析ICD预后的影响因素。对比不同预后患者术前、术后1、2、3个疗程血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平。分析影响ICD预后的危险因素。分析不同血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平患者生存情况。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计分析软件,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 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,两组间比较采用 χ^2 检验。

Logistic 回归系数分析危险因素。Kaplan-Meier 曲线进行生存分析,采用 Log-Rank 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平

观察组血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum IL-8, IL-6 and hs-CRP levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-8 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	hs-CRP (mg/L)
观察组	122	82.14±15.93	74.48±11.07	8.04±1.59
对照组	120	40.55±9.18	56.23±8.36	3.47±0.85
<i>t</i> 值		24.830	14.455	27.817
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 观察组手术前后血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平变化趋势

术后 1、2、3 个疗程时血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 低于术前,且呈逐渐降低趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 观察组手术前后血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of serum IL-8, IL-6 and hs-CRP levels in the observation group before and after surgery ($\bar{x} \pm s$)

时间	<i>n</i>	IL-8 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	hs-CRP (mg/L)
术前	122	82.14±15.93	74.48±11.07	8.04±1.59
术后 1 个疗程	122	63.17±12.06	64.31±8.15	6.23±1.31
术后 2 个疗程	122	52.49±10.11	59.49±5.26	5.08±1.22
术后 3 个疗程	122	44.38±6.39	54.38±5.03	3.81±1.06
<i>F</i> 值		239.814	147.933	229.677
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 单因素分析 ICD 预后影响因素

随访 1 年,脱落 6 例。血管狭窄、高血压、糖尿病、吸烟是预后的影响因素,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.4 不同预后患者手术前后血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 水平变化趋势

生存者术后 1、2、3 个疗程时血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 低于术前及死亡者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 3 单因素分析 ICD 预后影响因素 [$n(\%)$]

Table 3 Univariate analysis of influencing factors of ICD prognosis [$n(\%)$]

资料	生存者 (<i>n</i> =84)	死亡者 (<i>n</i> =32)	χ^2 值	<i>P</i> 值	
年龄(岁)	>60	48(57.14)	18(56.25)	0.008	0.931
	≤60	36(42.86)	14(43.75)		
性别	男	57(67.86)	22(68.75)	0.009	0.927
	女	27(32.14)	10(31.25)		
疾病类型	脑梗死	51(60.71)	20(62.50)	0.031	0.860
	短暂性脑缺血发作	33(39.29)	12(37.50)		
血管狭窄	有	46(54.76)	26(81.25)	6.906	0.009
	无	38(45.24)	6(18.75)		
高血压	有	52(61.90)	12(37.50)	5.580	0.018
	无	32(38.10)	20(62.50)		
糖尿病	有	69(82.14)	10(31.25)	27.629	<0.001
	无	15(17.86)	22(68.75)		
吸烟	有	54(64.29)	13(40.63)	5.317	0.021
	无	30(35.71)	19(59.38)		
饮酒	有	30(35.41)	12(37.50)	0.032	0.858
	无	54(64.29)	20(62.50)		

2.5 ICD 预后的多因素分析

以 ICD 预后情况作为因变量,将血管狭窄、高血压、糖尿病、吸烟、血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 作为自变量,Logistic 回归分析,血管狭窄、高血压、糖尿病、吸烟、血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 是缺血性脑血管预后的独立危险因素($P < 0.05$),见表 5。

2.6 生存分析

根据患者术后 3 个疗程血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 表达均数为界,分为高表达、低表达者。Kaplan-Meier 曲线显示,血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 高表达者生存率低于低表达者($\chi^2=13.418$ 、 7.237 、 16.090 , $P < 0.05$),见图 1。

3 讨论

传统治疗方式无法逆转脑血管已出现的狭窄,血管介入技术应运而生,其具有创伤小、可快速恢复脑血流等优势,被广泛应用于各级医院^[6]。但如何有效评价血管介入治疗后病情转归仍是临床急需解决的重点、难点之一。

有研究显示,炎症反应是缺血性疾病发病发展机制之一,与健康群体对比,缺血性疾病患者以 IL-8、IL-6、hs-CRP 为代表的血清炎症因子水平异常升高^[7]。ICD 发生后,缺血细胞、神经元出现炎症反应,包括炎症因子分泌、黏附分子上调,同时外周白细胞也可通过缺损区血脑屏障进入缺血区引

表4 不同预后患者手术前后血清IL-8、IL-6、hs-CRP水平变化趋势

Table 4 Changes of serum IL-8, IL-6 and hs-CRP levels before and after operation in patients with different prognosis

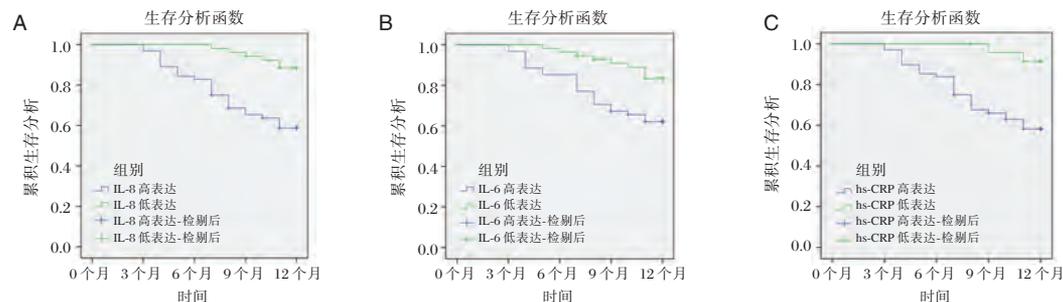
组别	<i>n</i>	术前	术后1个疗程	术后2个疗程	术后3个疗程	
IL-8(pg/mL)	生存者	84	81.97±14.78	60.42±10.20 ^a	48.77±9.03 ^a	42.15±6.34 ^a
	死亡者	32	82.59±16.03	70.39±11.44 ^a	62.26±10.17 ^a	50.23±8.79 ^a
	<i>t</i> 值		0.197	4.548	6.942	5.486
	<i>P</i> 值		0.844	<0.001	<0.001	<0.001
IL-6(pg/mL)	生存者	84	74.36±11.14	62.08±8.37 ^a	57.83±6.24 ^a	53.36±4.29 ^a
	死亡者	32	74.80±11.33	70.16±10.51 ^a	63.85±8.07 ^a	57.06±6.18 ^a
	<i>t</i> 值		0.189	4.321	4.270	3.652
	<i>P</i> 值		0.850	<0.001	<0.001	<0.001
hs-CRP(mg/L)	生存者	84	8.01±1.43	5.79±1.02 ^a	4.65±0.93 ^a	3.60±0.82 ^a
	死亡者	32	8.12±1.28	7.39±1.15 ^a	6.21±1.08 ^a	4.36±1.10 ^a
	<i>t</i> 值		0.381	7.287	7.717	4.044
	<i>P</i> 值		0.704	<0.001	<0.001	<0.001

注:已剔除脱落病例;与本组术前对比,^a*P*<0.05。

表5 ICD预后的多因素分析

Table 5 Multivariate analysis of ICD prognosis

变量	β 值	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i> / χ^2	<i>R</i> 值	95% <i>CI</i>	<i>P</i> 值
血管狭窄	1.638	0.508	10.393	5.143	3.016 ~ 8.771	<0.001
高血压	1.345	0.391	11.838	3.839	2.405 ~ 6.129	<0.001
糖尿病	0.822	0.226	13.219	2.274	1.423 ~ 3.635	<0.001
吸烟	1.401	0.407	11.843	4.058	2.351 ~ 7.004	<0.001
血清IL-8	1.693	0.535	10.019	5.438	3.249 ~ 9.102	<0.001
血清IL-6	1.120	0.362	9.565	3.064	1.738 ~ 5.400	<0.001
血清hs-CRP	1.789	0.620	8.326	5.983	2.906 ~ 12.319	<0.001



注:A为IL-8高、低表达者生存分析曲线;B为IL-6高、低表达者生存分析曲线;C为hs-CRP高、低表达者生存分析曲线。

图1 生存曲线

Figure 1 Survival curve

起下游次级炎症反应被激活,最终造成IL-8、IL-6、hs-CRP等炎症因子释放增多并形成恶性循环,这些炎症细胞及因子相互作用,共同调控脑缺血后炎症反应^[8]。这种炎性改变对血管介入治疗效果不利,而且血管支架作为异物置入血管后会一定程度上损害血管内皮,加重炎性反应,其与血管介入治疗后血管再狭窄风险相关。IL-6是具有多种生物学效能的一种炎性因子,参与、介导血小板活化、血液黏稠度增加、促血栓形成等过程^[9];IL-8主

要来自巨噬细胞、上皮细胞,是当前已知活性最强趋化因子,对中性粒细胞具有趋化作用,且可直接损害细胞,刺激神经组织炎症反应进展^[10];hs-CRP是由肝脏生成的一种急性时相反应蛋白,是介导动脉粥样硬化形成的关键炎性因子,临床已公认,hs-CRP是与动脉粥样硬化最密切相关的炎性标志物^[11]。

CD发生后刺激肝脏合成hs-CRP增加,然后通过经典途径激活补体、消耗补体持续释放炎性介质,并促进黏附分子释放,以利于损伤组织细胞增

殖、分化,但持续性缺血性刺激致 hs-CRP 异常升高可介导血管炎症反应,对病情不利^[12]。此外,基础研究证实,IL-6 除具有影响血流动力学作用外,还可刺激血管平滑肌细胞增生,继而加剧动脉硬化进展及斑块自稳定性向不稳定性进展,介导 ICD 及血管介入治疗后不良事件的发生^[13]。学者 Xiao H 等^[14]检测脑缺血大鼠模型外周血 IL-8 发现,其在脑缺血后一过性升高,且早于脑水肿发生。

综上所述,ICD 发病发展受多种因素影响,其中血清 IL-8、IL-6、hs-CRP 与 ICD 患者预后关系密切,可作为疾病诊断、预后预测的辅助性指标。

参考文献

- [1] 陶昀璐,华扬,贾凌云,等. 血脂水平与缺血性脑血管病患者颈动脉狭窄关系的多中心登记研究[J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(06):292-296.
- [2] Zuo FT, Liu H, Wu HJ, et al. The effectiveness and safety of dual antiplatelet therapy in ischemic cerebrovascular disease with intracranial and extracranial arteriostenosis in Chinese patients: A randomized and controlled trail [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(1):e5497.
- [3] 王宝,孙媛,宋康,古长维. 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):39-43.
- [4] 方靖. 缺血性脑卒中继发尿路感染时增强 CT 和炎症因子的预测价值[J]. 临床放射学杂志, 2018, 37(8):1260-1263.
- [5] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组,中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国急性缺血性脑卒中早期血管内介入诊疗指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9):683-691.
- [6] Arat A, Daglioglu E, Akmangit I, et al. Bioresorbable Vascular Scaffolds in Interventional Neuroradiology [J]. *Clin Neuroradiol*, 2018, 28(4):585-592.
- [7] Thunström E, Glantz H, Yucel-Lindberg T, et al. CPAP Does Not Reduce Inflammatory Biomarkers in Patients With Coronary Artery Disease and Nonsleepy Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial [J]. *Sleep*, 2019, 42(2):241.
- [8] Grønhøj MH, Clausen BH, Fenger CD, et al. P2625The soluble IL6 receptor and ischemic cerebrovascular disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65(1):296-311.
- [9] Sarkar S, Haberlen S, Whelton S, et al. Greater IL-6, D-dimer, and ICAM-1 Levels Are Associated With Lower Small HDL Particle Concentration in the Multicenter AIDS Cohort Study [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6(12):ofz474.
- [10] 陈静思,孙晨,阳海平,等. 过敏性紫癜患者中性粒细胞及其 IgA Fc 受体对血管内皮细胞凋亡的影响及机制[J]. 中华皮肤科杂志, 2017, 50(11):795-799.
- [11] 郭爽,肖伟,罗艺. IL-33/ST2 信号通路在缺血性脑卒中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(12):43-47.
- [12] 王景霞,王林元,王淳,等. 美藤果油对非酒精性脂肪性肝炎大鼠的保护作用[J]. 华南预防医学, 2015, 41(4):342-346.
- [13] 郭华涛,徐丽华,常征利,等. 冠脉斑块 CT 值改变及血清炎症因子与冠脉斑块稳定性的相关研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2017, 18(1):57-61.
- [14] Xiao H, Deng M, Yang B, et al. Pretreatment with 17β-Estradiol Attenuates Cerebral Ischemia-Induced Blood-Brain Barrier Disruption in Aged Rats: Involvement of Antioxidant Signaling [J]. *Neuroendocrinology*, 2018, 106(1):20-29.

(上接第 918 页)

- [6] 钟兆铭,洪敏,孙传政,等. 下调 FNDC3B 表达对舌鳞癌细胞增殖和侵袭迁移影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(16):12-17.
- [7] 扶世杰,杨本伍,舒从科,等. 少阳生骨方对大鼠在体软骨损伤关节液 IL-1β 及软骨修复组织 II 型胶原影响的实验研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, 6(3):191-197.
- [8] 赵军,王庆甫. 小针刀疗法结合功能锻炼治疗[J]. 中华全科全科 presses au [J]. 中医正骨, 2018, 30(2):65-68, 77.
- [9] 王娟,于滕波,郑占乐,等. 膝关节骨关节炎病理机制的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(10):1237-1238.
- [10] 王继成,易智. miRNA 与骨关节炎病理发展过程的相关性[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(24):3875-3881.
- [11] Dong Z, Jiang H, Jian X, et al. Change of miRNA expression profiles in patients with knee osteoarthritis before and after celecoxib treatment [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(1):e22648.
- [12] Zhang X, Zhao S, Zhang H. MiR-155-5p improves knee osteoarthritis rats through SOCS1 - STAT3 signaling pathway [J]. *Panminerva Med*, 2020.
- [13] 徐亮亮,瞿玉兴. NF-κB 在膝关节骨性关节炎治疗中的应用研究进展[J]. 按摩与康复医学, 2015, 6(12):1-3.
- [14] 王友庆,陈士芳,梅珏. 槲皮素通过抑制 NF-κB 减弱类风湿关节炎大鼠软骨细胞基质降解和细胞凋亡[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(6):485-491.
- [15] 熊瑶. miR-146a, miR-155-5p 在类风湿性关节炎中的作用机制研究[D]. 华侨大学, 2019.

大脑后动脉瘤破裂危险多因素及其治疗结果分析

陈解南¹ 周新卫² 彭冬红¹ 黄钟情^{2*}

[摘要] **目的** 探讨大脑后动脉瘤的破裂危险因素及其治疗疗效。**方法** 选择2008年7月-2018年3月大脑动脉瘤患者87例作为对象。所有患者入院后均完成CTA和/或DSA检查,并在CTA和/或DSA上采集动脉瘤几何学参数,包括:瘤体宽度、瘤颈宽度、瘤体高度、载瘤动脉直径及动脉瘤形态。在电子病例库中回顾性采集患者高血压、脑血管病家族史等。采用多因素Logistic回归分析动脉瘤的破裂危险因素。依据大脑后动脉瘤是否破裂,将其分为破裂组和未破裂组以判断动脉瘤的破裂危险因素;依据大脑后动脉瘤的治疗方法,将其分为手术夹闭组和介入栓塞组,采用改良Rankin量表评分以评估患者治疗疗效。**结果** 87例患者共发现121个动脉瘤,大脑后动脉瘤94个(伴发前循环动脉瘤17个,伴发椎-基底动脉瘤10个),破裂组35个动脉瘤,未破裂组59个动脉瘤。多因素Logistic分析结果表明:大脑后动脉瘤破裂与瘤体宽度、瘤颈宽度、瘤体高度及载瘤动脉直径无相关性($P>0.05$);而大脑后动脉瘤的形态以及患者具有高血压、脑血管病家族史有关系,均为危险因素($P<0.05$)。87例患者中,30例给予手术夹闭,20(66.7%)例患者术后随访改良Rankin量表评分 ≤ 2 ;57例给予介入栓塞治疗,50(87.7%)例患者术后随访改良Rankin量表评分 ≤ 2 ($P>0.05$)。**结论** 大脑后动脉瘤的形态以及患者具有高血压、脑血管病家族史是大脑后动脉瘤的破裂危险因素,手术夹闭或介入栓塞治疗大脑后动脉瘤患者能获得良好的预后。

[关键词] 大脑后动脉瘤;动脉瘤破裂;危险因素;影像学评估;治疗

Posterior Cerebral Artery Aneurysms rupture risk factor and treatment Outcome

CHEN Jienan¹, ZHOU Xinwei², PENG Donghong¹, HUANG Zhongqing^{2*}

(1. Department of Medical Image Center, Zhuhai Maternal and Child Health, Zhuhai Guangdong, China, 519000; 2. Department of Medical Image Center, Yuebei People's Hospital, Shantou University Medical College, Shaoguan, Guangdong, China, 512025)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the risk factors of posterior cerebral aneurysm rupture and its therapeutic effect. **Methods** eighty seven patients with cerebral aneurysm from July 2008 to March 2018 were recruited. All patients underwent CTA and/or DSA examination after admission, and geometric parameters of aneurysm were collected on CTA and/or DSA, including tumor width, tumor neck width, tumor height, parent artery diameter and aneurysm shape. The family history of hypertension and cerebrovascular disease were collected in the electronic case bank. Multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors of aneurysm rupture. According to whether the posterior cerebral aneurysm ruptured or not, it was divided into ruptured group and unruptured group to determine the risk factors of ruptured aneurysm; according to the treatment method of the posterior cerebral aneurysm, it was divided into surgical clipping group and interventional embolization group, and the treatment effect was evaluated by the modified

基金项目:广东省医学科研项目(A2017043,A2018146);珠海市医疗卫生科技计划项目(20171009E030051);
韶关市卫生计生科研项目(Y18092);韶关市科技局项目(2017 CX/010)

作者单位:1. 珠海市妇幼保健院医学影像科,广东,珠海 519000

2. 汕头大学医学院附属粤北人民医院影像诊断科,广东,韶关 512025

*通信作者:黄钟情, E-mail: langzhan144@163.com

Rankin scale. **Results** A total of 121 aneurysms were found in 87 patients, 94 posterior cerebral aneurysms (17 with anterior circulation aneurysms and 10 with vertebral-basal aneurysms), 35 aneurysms in the ruptured group and 59 aneurysms Aneurysm. The results of multivariate Logistic analysis showed that the rupture of the posterior cerebral aneurysm was not related to the width of the tumor, the width of the neck, the height of the tumor, and the diameter of the artery containing the tumor ($P>0.05$); Family history of cerebrovascular disease are risk factors, there is a correlation ($P<0.05$). Among 87 patients, 30 were given surgical clips, 20 (66.7%) patients were followed up with modified Rankin scale score ≤ 2 ; 57 patients were given interventional embolization therapy, and 50 (87.7%) patients were followed up with modified Rankin volume Table score ≤ 2 ($P>0.05$). **Conclusion** The shape of the posterior cerebral aneurysm and the family history of hypertension and cerebrovascular disease are the risk factors of the posterior cerebral aneurysm rupture. The patients with posterior cerebral aneurysm treated by surgical clipping or interventional embolization can get a good prognosis.

[KEY WORDS] Posterior cerebral aneurysm; Rupture of aneurysm; Risk factors; Imaging assessment; Treatment

大脑后动脉瘤是指大脑后动脉内腔的局限性异常扩大引起的动脉壁的一种瘤状突出^[1]。临床研究表明大脑后动脉瘤多数由于脑动脉管壁局部先天性缺陷与腔内压力增高引起,从而引起囊性膨出,是后循环蛛网膜下腔出血的主要原因。对于瘤体体积 ≤ 7 mm的小型未动脉瘤,其破裂风险较低,宜采取保守治疗^[2]。近年来,随着医学影像术的不断发展和国人健康意识的提高,小型动脉瘤的检出率增高,且全球成年颅内动脉瘤患者中66%为小型动脉瘤。与颅内其他部位的动脉瘤相比,大脑后动脉瘤临床上较少见且具有独特的临床特点^[3]。因此,本研究以大脑后动脉瘤患者作为对象,探讨大脑后动脉瘤破裂危险因素及影像学评估价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2008年7月至2018年3月大脑动脉瘤患者87例作为对象,所有患者入院后均完成CTA和/或DSA检查,并在CTA和/或DSA上采集动脉瘤几何学参数,包括:瘤体宽度、瘤颈宽度、瘤体高度、载瘤动脉直径及动脉瘤形态。在电子病例库中回顾性采集患者高血压、脑血管病家族史等。术前,根据动脉瘤是否破裂分为破裂组和非破裂组。破裂组32例,男11例,女21例,年龄(27~84)岁,平均(56.11 \pm 4.53)岁;未破裂组55例,男19例,女36例,年龄(26~84)岁,平均(49.79 \pm 4.58)岁。

纳入标准:①均经外科手术或DSA检查确诊;②符合手术夹闭或介入栓塞治疗适应证,且患者

均可耐受;③患者或患者家属已签署知情同意书;④随访时间6~14个月。排除标准:①外伤性动脉瘤;②伴发夹层动脉瘤、血管畸形者;③动脉瘤显影较差或伴有血管痉挛明显者;④失访或随访时间不足6个月。

1.2 方法

①CTA、DSA检查方法同我们的既往报道相仿^[4-6]。②手术夹闭治疗:采用气管插管静脉复合全身麻醉,显微镜下采用翼点入路,必要时离断颞弓以充分暴露术野,但手术基本原则是尽量减少脑组织牵拉,充分解剖脑底池和尽早暴露载瘤动脉近端。显微镜下分开脑池,分离并暂时性阻断载瘤动脉,确定与相邻动脉、穿支血管关系,锐性分离动脉瘤颈部,选择合适瘤夹完成瘤颈的夹闭,夹闭完毕后采用罂粟碱湿敷血管。③介入栓塞:患者全身静脉麻醉后,采用Seldinger技术,经股动脉穿刺插管,置动脉鞘,结合CTA先行全脑血管造影,确定动脉瘤的部位、大小、形状,并以此形成不同的治疗策略:①对于囊状动脉瘤,瘤颈窄且位于P1、P2段时,则行单纯弹簧圈囊内栓塞;如果瘤颈宽,可行球囊或支架辅助栓塞,尽量保留载瘤动脉;对于P3、P4段动脉瘤,若无法保留载瘤动脉,可行载瘤动脉闭塞。②对于梭形动脉瘤,先行动脉瘤囊内栓塞,边栓塞边退出微导管,后行载瘤动脉闭塞;对于闭塞载瘤动脉风险较大者,可行支架辅助栓塞或单纯支架置入术。

1.3 统计分析

采用SPSS 18.0软件进行数据分析处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表

示,组间比较行 t 检验,采用 Logistics 回归分析大脑后动脉瘤的破裂危险因素;用改良 Rankin 量表评分(modified rankin scale, MRS)评估预后。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑后动脉瘤破裂危险因素分析

87 患者共发现 121 个动脉瘤,大脑后动脉瘤 94 个(伴发前循环动脉瘤 17 个,伴发椎-基

底动脉瘤 10 个),破裂组 35 个动脉瘤,未破裂组 59 个动脉瘤。单因素 Logistic 回归分析显示大脑后动脉瘤破裂与瘤体宽度、瘤颈宽度、瘤体高度无统计意义($P > 0.05$)(表 1);与大脑后动脉瘤的形态、载瘤动脉直径及患者具有高血压、脑血管病家族史具有统计学意义($P < 0.05$);多因素 Logistic 回归分析显示大脑后动脉瘤破裂危险因素为动脉瘤的形态及患者具有高血压、脑血管病家族史。见表 2。

表 1 大脑后动脉瘤破裂危险单因素分析 [$(\bar{x} \pm s)$, mm]

Table 1 Single factor analysis of the risk of posterior cerebral aneurysm rupture [$(\bar{x} \pm s)$, mm]

组别	瘤体宽度	瘤颈宽度	瘤体高度	载瘤动脉直径	形态(囊状)	高血压	脑血管家族史
破裂组($n=35$)	3.20±0.69	2.89±0.73	3.44±0.64	2.19±0.23	19(54.3)	16(45.7)	14(40.0)
未破裂组($n=59$)	3.19±0.68	2.90±0.75	3.45±0.66	2.00±0.43	13(20.0)	11(18.6)	11(18.6)
χ^2/t 值	1.213	0.756	0.993	6.413	5.141	6.985	6.412
P 值	0.632	0.598	0.772	0.044	0.001	0.005	0.023

表 2 大脑后动脉瘤破裂危险多因素 Logistic 回归

Table 2 Multivariate Logistic Regression of Risk of Posterior Cerebral Aneurysm Rupture

多因素	OR 值	95%CI	P 值
形态	6.392	6.112~7.986	<0.001
载瘤动脉直径	1.124	0.525~6.491	>0.05
高血压	5.301	4.493~7.856	<0.001
脑血管病家族史	1.356	1.045~3.867	<0.05

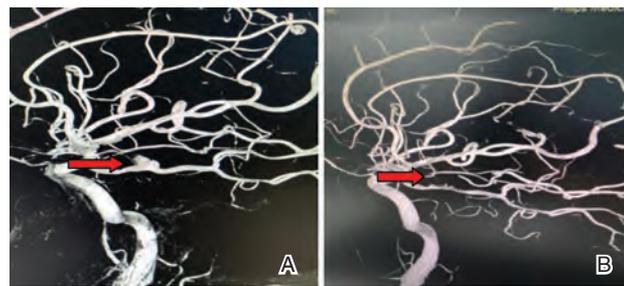
表 3 大脑后动脉瘤治疗结果 [$n(\%)$]

Table 3 Treatment results for posterior cerebral aneurysms [$n(\%)$]

组别	n	≤ 2	3	≥ 4
手术夹闭组	30	20(66.7)	8(26.7)	2(6.7)
介入栓塞组	57	50(87.7)	6(10.5)	1(1.8)
χ^2 值	/		3.141	
P 值	/		0.055	

2.2 不同治疗方法预后比较

87 患者中,30 例给予手术夹闭,57 例给予介入栓塞治疗,平均随访时间 11.5 个月。介入栓塞组,50(87.7)例患者术后随访改良 Rankin 量表评分 ≤ 2 (图 1);手术夹闭组,20(66.7%)例患者术后随访改良 Rankin 量表评分 ≤ 2 。见表 3。



注:A 图箭头所示为 DSA 显示的动脉瘤;B 图箭头所示为介入治疗后。

图 1 典型病例 DSA 检查结果

Figure 1 DSA results of typical cases

3 讨论

蛛网膜下腔出血是大脑后动脉瘤破裂最常见的并发症,但并不是所有的动脉瘤都会破裂。普遍认为颅内动脉瘤的破裂与其位置、大小、吸烟及年龄有关,不同原因还能相互作用、相互影响^[7-8]。本研究结果说明大脑后动脉瘤破裂的影响因素较多:①动脉瘤形态。动脉瘤形态是动脉瘤破裂的独立危险因素,对于瘤体形态不规则患者,破裂发生率越高;对于瘤体形态较为规则者,病情趋于稳定,瘤体不易破裂^[9]。②高血压。高血压是血流动力学改变的一种反映,血压增高将会增加颅内动脉分叉部位血管壁剪切力。同时,持续的高血压将会引起血管壁受损,增加动脉瘤的发生、发展。既往研究表明高血压能引起动脉壁结构发生变化,引起血管活性物质失衡,增加机体炎症反应,影响受损血管修复,当血压达到一定的阈值

后,则会引发动脉瘤破裂^[10]。③脑血管病家族史。脑血管病家族史对动脉瘤破裂的影响相对较小,但是对于伴有脑血管病家族史患者动脉瘤破裂发生率高于无脑血管病家族史者。

目前,临床上对于大脑后动脉瘤患者常采用手术夹闭或介入栓塞治疗^[10-11]。近年来,凭借其微创、安全以及精准的优势,正逐渐成为该部位动脉瘤的首选治疗方案。虽然PCA动脉瘤栓塞术式较多(如选择单纯动脉瘤囊内栓塞、支架或球囊辅助栓塞、闭塞瘤体和载瘤动脉等),但总体可分为闭塞载瘤动脉与保留载瘤动脉两种方法^[3,9]。血管内栓塞治疗也存在以下缺点:①复发率较高,有学者认为对于同时具有手术和栓塞指征的破裂动脉瘤,栓塞治疗和手术相比,其相对和绝对风险分别降低了22.6%、7.4%,但复发率较高,为10%~20%^[12];②对于动脉瘤近端中重度狭窄或微导管无法到达的远端动脉瘤,则不宜进行血管内介入栓塞。

综上所述,大脑后动脉瘤的形态以及患者具有高血压、脑血管病家族史是大脑后动脉瘤的破裂危险因素,手术夹闭或介入栓塞治疗大脑后动脉瘤患者能获得良好的预后。

参考文献

- [1] 陈勇春,盛文双,黄定品,等. 前交通动脉动脉瘤破裂致不同出血程度的危险因素分析[J]. 中华神经外科杂志, 2018, 34(7):669-673.
- [2] Sherif R, Shin-ichiro S, Kuniyasu N, et al. Impact of bifurcation angle and inflow coefficient on the rupture risk of bifurcation type basilar artery tip aneurysms [J]. J Neurosurg, 2017, 128(3):1-8.
- [3] Goehre F, Jahromi B R, Lehecka M, et al. Posterior Cerebral Artery Aneurysms: Treatment and Outcome Analysis in 121 Patients[J]. World Neurosurgery, 2016, 92:521-532.
- [4] Huang ZQ, Zhou XW, Hou ZJ, et al. Risk factors analysis of mirror aneurysms: A multi-center retrospective study based on clinical and demographic profile of patients [J]. Eur J Radiol, 2017, 96:80-84.
- [5] 黄钟情,新卫,孟志华,等. 运用CTA分析颅内动脉瘤破裂的危险因素[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(1):15-19.
- [6] 黄钟情,孟志华,陈振松,等. 探讨64排CTA诊断颅内动脉瘤的一致性[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(5):910-914.
- [7] 林博丽,陈丽芳,倪俊伟,等. 前交通动脉瘤破裂后继发脑梗死的相关因素研究[J]. 中华放射学杂志, 2018, 52(6):415-420.
- [8] 齐文涛,彭爱军,曹德茂,等. 破裂大脑中动脉动脉瘤的外科手术治疗:临床转归和预后因素[J]. 国际脑血管病杂志, 2017, 25(11):1023-1030.
- [9] Coert BA, Chang SD, Do HM, et al. Surgical and endovascular management of symptomatic posterior circulation fusiform aneurysms[J]. J Neurosurg, 2007, 106(5):855-865.
- [10] Cheng WK, Jia X, Li JK, et al. Relationships of Statin Therapy and Hyperlipidemia With the Incidence, Rupture, Postrepair Mortality, and All-Cause Mortality of Abdominal Aortic Aneurysm and Cerebral Aneurysm: A Meta-analysis and Systematic Review [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, Publish Ahead of Print.
- [11] 袁晓东,吴勇,周东. 显微外科夹闭和介入栓塞对颅内动脉瘤的疗效及对脑脊液白介素-6、内皮素-1水平的影响[J]. 中国临床医生杂志, 2017, 45(12):67-69.
- [12] Molyneux A, Kerr R, the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) Collaborative Group. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of Neurosurgical Clipping Versus Endovascular Coiling in 2143 Patients with Ruptured Intracranial Aneurysms: A Randomized Trial [J]. Acc Current J Rev, 2002, 11(12):52.

EMT不孕患者血清AcrAb、Sp17Ab水平

唐媛* 刘小娟 刘秀丽 刘芳 马玥 谢佳 李鑫

[摘要] **目的** 探讨子宫内膜异位症(EMT)不孕患者血清抗顶体蛋白酶抗体(AcrAb)、抗精子蛋白17抗体(Sp17Ab)水平及意义。**方法** 选取2017年1月至2018年12月在本院治疗的EMT不孕患者110例(观察组),其中r-AFS标准分期I~II期患者49例,III~IV期61例;同时选取健康育龄女性110例作为对照组;检测两组血清AcrAb、Sp17Ab水平,同时随访观察组术后1年妊娠情况。**结果** 观察组血清AcrAb、Sp17Ab分别为 $(3.38\pm 0.68)\mu\text{g/L}$ 和 $(5.82\pm 1.00)\mu\text{g/L}$,明显高于对照组($P<0.05$);观察组I~II期和III~IV期患者血清AcrAb、Sp17Ab水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);观察组患者术后随访1年,其中成功妊娠患者52例;成功妊娠者术后1个月、3个月血清AcrAb、Sp17Ab水平分别为 $(2.61\pm 0.67)\mu\text{g/L}$ 和 $(2.03\pm 0.63)\mu\text{g/L}$, $(4.71\pm 0.93)\mu\text{g/L}$ 和 $(3.72\pm 0.99)\mu\text{g/L}$,明显低于妊娠失败者($P<0.05$);观察组不同AcrAb、Sp17Ab水平患者妊娠成功率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** EMT不孕患者血清AcrAb、Sp17Ab水平明显升高,其术后水平可能与患者术后妊娠情况有关。

[关键词] 子宫内膜异位症;不孕症;抗顶体蛋白酶抗体;抗精子蛋白17抗体

Serum AcrAb and Sp17Ab levels in patients with EMT infertility and their significance

TANG Yuan*, LIU Xiaojuan, LIU Xiuli, LIU Fang, MA Yue, XIE Jia, LI Xin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua, Sichuan, China, 617067)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the level and significance of serum anti-acrosin antibody (AcrAb) and anti-sperm protein 17 antibody (Sp17Ab) in infertility patients with endometriosis (EMT). **Methods** 110 cases of EMT infertility (observation group) in our hospital from January 2017 to December 2018 were selected, including 49 cases of stage I–II and 61 cases of stage III–IV in r-AFS standard stage. 110 healthy women of childbearing age were selected as control group. The serum levels of AcrAb and Sp17Ab were measured in both groups, and the pregnancy of the observation group was followed up for one year after operation. **Results** The serum AcrAb and Sp17Ab in the observation group were $(3.38 \pm 0.68) \mu\text{g/L}$ and $(5.82 \pm 1.00) \mu\text{g/L}$, which were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). There were no significant difference in serum AcrAb and Sp17Ab levels between patients of stage I–II and stage III–IV in the observation group ($P>0.05$). The patients in the observation group were followed up for 1 year, including 52 cases of successful pregnancy. The serum levels of AcrAb and Sp17Ab in successful pregnancies at 1 and 3 months after operation were $(2.61\pm 0.67) \mu\text{g/L}$ and $(2.03 \pm 0.63) \mu\text{g/L}$, $(4.71 \pm 0.93) \mu\text{g/L}$ and $(3.72 \pm 0.99) \mu\text{g/L}$, which were significantly lower than those in failed pregnancies ($P<0.05$). In the observation group, there were no significant difference in pregnancy success rate among patients with different AcrAb and Sp17Ab. **Conclusion** The serum levels of AcrAb and Sp17Ab in EMT infertility patients are significantly increase, which may be related to the pregnancy after EMT.

[KEY WORDS] Endometriosis; Infertility; Anti-acrosin antibody; Anti-sperm protein 17 antibody

基金项目:攀枝花市科技计划项目(2018CY-S-6)

作者单位:攀枝花市中心医院妇产科,四川,攀枝花 617067

*通信作者:唐媛, E-mail: tyuhg889@163.com

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)是妇科较为难治的疾病之一,多见于育龄期女性,其有一定的侵袭性,很容易再次复发,难以根治。临床上对其治疗的手段多采用腹腔镜操作手术,但是该手术过程中可能会造成囊肿破裂或者囊液的播散,从而导致盆腔粘连或者不孕等并发症发生,对女性身心健康和生活质量产生重大影响^[1]。目前临床研究热点在分子生物学指标在EMT患者体内变化情况,EMT会导致患者不孕,发生的原因主要是EMT导致盆腔粘连影响卵巢功能,炎症反应导致机体免疫力下降,同时精子在宫内的存活率明显下降,研究显示抗顶体蛋白酶抗体和抗精子蛋白17抗体在生育过程中发挥重要作用,两者浓度变化会导致精子功能、与受精卵结合以及免疫性损伤等不利因素造成临床结局变差^[2]。本研究观察了子宫内膜异位症(EMT)不孕患者AcrAb、Sp17Ab水平及意义,报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本院2017年1月至2018年12月期间治疗的EMT不孕患者110例作为观察组,其中根据美国生殖学会制定的r-AFS标准分期,I~II期患者49例,III~IV期61例。纳入标准:①诊断符合《子宫内膜异位症的诊治指南》中标准^[3];②有正常性生活、配偶性功能正常,精液质量正常,未经避孕而超过1年未妊娠;③有生育要求,在本院行手术治疗;④临床随访资料完整;⑤患者及家属知情同意。排除标准:①有子宫肌瘤等其他妇科疾病;②合并有甲状腺功能疾病、自身免疫性疾病、肝肾功能障碍等其他基础性疾病者;③有子宫手术史者。选取同期健康育龄女性110例作为对照组,2组受试者就下述表格中的一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 2组患者一般资料上的比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	年龄(岁)	体重指数(kg/m ²)
观察组	110	29.02±5.58	23.12±3.28
对照组	110	28.73±6.05	23.02±3.40
t值		0.370	0.222
P值		0.712	0.825

1.2 治疗及随访方法

患者采取腹腔镜手术治疗,患者取膀胱截石位,建立气腹后置入器械,对盆腔、输卵管、卵巢

以及子宫开展探查,了解粘连情况,采用电凝刀对内膜异位病灶进行剔除,分离子宫直肠窝及盆腹腔粘连后,将盆腔正常解剖结构恢复,术后观察输卵管通畅情况,采用生理盐水冲洗盆腔并喷洒生物胶防止粘连形成。根据血清AcrAb、Sp17Ab平均水平,将观察组分不同组别观察妊娠情况。

1.3 检测方法

抽取患者空腹静脉血5 mL以3 000 r/min离心15 min分离血清,采用酶联免疫吸附双抗体夹心法测定患者AcrAb和Sp17Ab浓度变化,严格按照试剂盒说明书操作(由美国USCNLIFE公司生产)。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,行t检验,当 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组血清AcrAb、Sp17Ab水平

观察组血清AcrAb、Sp17Ab明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 两组血清AcrAb、Sp17Ab水平比较($\bar{x}\pm s$, mg/L)

Table 2 Comparison of serum AcrAb and Sp17Ab levels between 2 group ($\bar{x}\pm s$, mg/L)

分组	n	AcrAb	Sp17Ab
观察组	110	3.38±0.68	5.82±1.00
对照组	110	1.43±0.40	3.67±0.91
t值		25.924	16.678
P值		0.000	0.000

2.2 观察组不同分期患者血清AcrAb、Sp17Ab水平

观察组I~II期和III~IV期患者血清AcrAb、Sp17Ab水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 观察组不同分期患者血清AcrAb、Sp17Ab水平比较($\bar{x}\pm s$, mg/L)

Table 3 Comparison of serum AcrAb and Sp17Ab levels in different stages of patients in observation group ($\bar{x}\pm s$, mg/L)

分期	n	AcrAb	Sp17Ab
I~II期	49	3.44±0.73	5.77±1.01
III~IV期	61	3.33±0.80	5.86±0.95
t值		0.745	-0.480
P值		0.458	0.632

2.3 观察组术后成功妊娠和妊娠失败者血清AcrAb、Sp17Ab水平比较

观察组患者术后随访1年,其中成功妊娠患者52例,妊娠失败患者58例;成功妊娠者术后1个

月、3个月血清 AcrAb、Sp17Ab 水平明显低于妊娠失败者($P<0.05$)。见表4。

表4 观察组术后成功妊娠和妊娠失败者血清 AcrAb、Sp17Ab 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, mg/L)

Table 4 Comparison of Serum AcrAb and Sp17Ab Levels between Successful Pregnancy and Failed Pregnancy in Observation Group ($\bar{x}\pm s$, mg/L)

分组	n	AcrAb			Sp17Ab		
		术前	术后1个月	术后3个月	术前	术后1个月	术后3个月
成功妊娠	52	3.32±0.82	2.61±0.67	2.03±0.63	5.80±1.03	4.71±0.93	3.72±0.99
妊娠失败	58	3.43±0.70	3.00±0.54	2.67±0.71	5.84±1.00	5.22±0.81	4.62±0.73
t值		-0.759	-3.376	-4.976	-0.207	-3.074	-5.463
P值		0.450	0.001	0.000	0.837	0.003	0.000

2.4 观察组不同血清 AcrAb、Sp17Ab 水平患者成功妊娠率比较

观察组不同患者妊娠成功率比较差异无统计学意义($P>0.05$)，见表5。

表5 观察组不同血清 AcrAb、Sp17Ab 水平患者成功妊娠率比较 [$n(\%)$]

Table 5 Comparisons of Successful Pregnancy Rates of Patients with Different Serum AcrAb and Sp17Ab Levels in Observation Group [$n(\%)$]

组别	n	妊娠成功率	χ^2 值	P值
AcrAb \geq 3.38 mg/L 和 Sp17Ab \geq 5.82 mg/L	37	21(56.76)	1.516	0.679
AcrAb \geq 3.38 mg/L 和 Sp17Ab $<$ 5.82 mg/L	25	12(48.00)		
AcrAb $<$ 3.38 mg/L 和 Sp17Ab \geq 5.82 mg/L	22	11(50.00)		
AcrAb $<$ 3.38 mg/L 和 Sp17Ab $<$ 5.82 mg/L	20	8(40.00)		

3 讨论

目前的研究认为，子宫内膜异位囊肿发生的重要原因可能是移植和化生两种生物学行为引起的，正常位置内膜细胞通过附着传播至子宫外形成了子宫腺肌病，通过血管和淋巴管导致子宫内膜异位形成^[4]。目前认为子宫内膜异位症同不孕症关系密切，子宫内膜容受性降低会导致患者着床率的重要因素，有报道指出 EMT 患者卵母细胞质量及胚胎质量下降会造成患者着床率下降^[5]。

本研究分析了患者血清抗顶体蛋白酶、抗精子蛋白 17 水平变化，两者均为精子特异性抗原，均在顶体反应与受精过程中具有重要意义的精子抗原，两者功能降低同不孕症的发生具有明显的关联。血清抗顶体蛋白酶是丝氨酸蛋白溶解酶，具有 12 个半胱氨酸残基，在人体精子形成的早期具

有丰富的 PPA 基因，在顶体反应过程中可以同精子顶体内膜的顶体素酶原结合参与精子受精过程，顶体酶具有两个活性位点，主要是用于分解蛋白质的催化活性位点与与卵细胞透明带糖蛋白受体结合的结合位点^[6-7]。动物学试验研究发现在编码顶体素原真核表达载体基因免疫雌性小鼠中顶体素浓度降低后小鼠肾盂能力下降，因此证实了顶体素对于精子生育能力会产生影响，造成小鼠不孕发生^[8]。抗精子蛋白 17 属于成熟的精子细胞与精子中的特异性蛋白，可以影响精子和卵子结合过程，其在顶体的反应过程中可以和卵细胞透明带表面硫酸化碳水化合物相结合来提高受精能力^[9]。抗精子蛋白 17 一方面可以促进硫酸乙酰肝素介导的细胞间的粘附，有利于精子利用硫酸乙酰肝素和透明带进行结合^[10]；另一方面 Sp17Ab 是肝素/硫酸乙酰肝素的结合蛋白，可以同钙结合蛋白结合后调节钙离子通道活性，继而影响精子顶体反应与活力^[11]。因此两者水平变化可以评估精子生育能力重要的指标，也是临床判断患者生育能力的重要依据^[12-13]。

本研究显示，观察组血清 AcrAb、Sp17Ab 明显高于对照组，说明在 EMT 不孕患者中存在 AcrAb、Sp17Ab 显著升高。本研究优势在于证实了 AcrAb、Sp17Ab 水平在 EMT 不孕患者中存在异常表达，而且与治疗患者妊娠成功与否具有一定关系，为临床合理评价治疗效果以及预后分析提供了更为可靠的分子生物学指标，但是本研究入组病例有限，随访时间短，因此还需扩充样本量、长期随访深入研究论证。

综上所述，EMT 不孕患者血清 AcrAb、Sp17Ab 水平明显升高，其术后水平可能与患者术后妊娠情况有关。

(下转第 955 页)

· 论 著 ·

血清 PTX-3、CTRP9、MIF 水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系

袁大华 杜朴 王玉凯*

[摘要] **目的** 探讨血清正五聚蛋白 3 (PTX-3)、补体 Clq 肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (CTRP9)、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 水平与缺血性脑卒中患者神经功能及短期预后的关系。**方法** 选取本院 2017 年 7 月至 2018 年 7 月收治的缺血性脑卒中患者 180 例作为研究对象, 根据神经功能缺损情况分为重度 ($n=56$)、中度 ($n=76$)、轻度 ($n=48$)。比较不同神经功能缺损程度及不同预后患者血清 PTX-3、CTRP9、MIF 水平、美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 评分, 分析血清 PTX-3、CTRP9、MIF 与 NIHSS、生活能力评分 (mRs) 评分的相关性, 受试者工作特征 (ROC) 曲线及 ROC 曲线下面积 (AUC) 分析各血清指标对短期预后的预测价值。**结果** 血清 PTX-3、MIF 与 NIHSS、mRs 评分呈正相关, CTRP9 水平与 NIHSS、mRs 评分呈负相关 ($P<0.05$); 预测短期预后的 AUC: 治疗 5 d PTX-3 > 治疗 5 d MIF > 治疗 5 d CTRP9 > 治疗 3 d MIF > 治疗 3 d CTRP9 > 治疗 3 d PTX-3, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 治疗 5 d 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 联合预测短期预后的 AUC 为 0.915, 大于治疗 3 d 的 0.887 ($P<0.05$)。**结论** 血清 PTX-3、MIF 与缺血性脑卒中患者神经功能、短期预后呈正相关, CTRP9 水平与神经功能、短期预后呈负相关, 三者联合能可靠预测患者短期预后。

[关键词] PTX-3; CTRP9; MIF; 缺血性脑卒中; 神经功能; 短期预后

Relationship between serum PTX - 3, CTRP9, MIF levels and neurological function and short-term prognosis in patients with ischemic stroke

YUAN Dahua, DU Pu, WANG Yukai*

(Department of Neurology, Foshan First People's Hospital, Foshan, Guangdong, China, 528000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the relationship between serum polypentamin 3 (PTX-3), complement Clq tumor necrosis factor-related protein 9 (CTRP9), macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels and neurological function and short-term prognosis in patients with ischemic stroke. **Methods** 180 patients with ischemic stroke admitted to our hospital from July 2017 to July 2018 were selected as the research objects, according to the neurological deficit, they were divided into severe ($n=56$), moderate ($n=76$), mild ($n=48$). Compared serum PTX-3, CTRP9, MIF levels and National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) scores for patients with different degrees of neurological deficits and different prognosis, Pearson analysis of the correlation between serum PTX-3, CTRP9, MIF and NIHSS, viability score (mRs) scores, the receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) were performed to analyze the predictive value of each serum index for short-term prognosis. **Results** Serum PTX-3 and MIF levels were positively correlated with NIHSS and mRs scores, and CTRP9 level was negatively correlated with NIHSS and mRs scores ($P<0.05$). The AUC to predict short-term prognosis: PTX-3 level after 5 days of the

基金项目: 佛山市卫生局课题 (20190031)

作者单位: 佛山市第一人民医院神经内科, 广东, 佛山 528000

*通信作者: 王玉凯, E-mail: wykai2012@gmail.com

treatment >MIF >CTRP9 t >MIF after 3 days of the treatment >CTRP9 >PTX-3 ($P<0.05$). The AUC of serum PTX-3, CTRP9, and MIF combined to predict short-term prognosis for five days of the treatment was 0.915, greater than that of three days of treatment (0.887, $P<0.05$). **Conclusion** Serum PTX-3 and MIF levels are positively correlated with neurological function and short-term prognosis in patients with ischemic stroke, CTRP9 level is negatively correlated with neurological function and short-term prognosis. The combination of the three can reliably predict the short-term prognosis of patients.

[KEY WORDS] PTX-3; CTRP9; MIF; Ischemic stroke; Neural function; Short-term prognosis

缺血性脑卒中约占全部脑卒中的87%,是成年人致残的首要原因,亦是世界范围内第二大致死疾病^[1]。目前普遍认同神经功能缺损程度与患者预后密切相关,因此早期评估患者神经功能、预测患者预后对临床决策、干预意义重大。正五聚蛋白3(Pentraxin-3, PTX-3)是新近发现的一种炎性标志物,在脑梗死患者中表达高于健康体检者^[2]。补体Clq肿瘤坏死因子相关蛋白9(Complement Clq tumor necrosis factor-related protein 9, CTRP9)是一种脂肪因子,在无症状冠状动脉粥样硬化患者中表达较正常人群降低^[3]。巨噬细胞迁移抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)具有类似趋化因子的功能,是一类结构独特的多效免疫调节细胞因子,在急性心肌梗死患者中呈高表达^[4]。目前关于血清PTX-3、CTRP9、MIF与缺血性脑卒中患者神经功能、短期预后关系的报道较少,本研究对此进行探讨,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院2017年7月至2018年7月收治的缺

血性脑卒中患者180例作为研究对象,根据神经功能缺损情况分为重度($n=56$)、中度($n=76$)、轻度($n=48$)3组。本研究经本院伦理委员会审核通过,家属自愿签署知情同意书。不同神经功能缺损程度患者性别、年龄、体质量指数、发病至入院时间、饮酒史、吸烟史、病变位置、合并疾病等资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),均衡可比。见表1。

纳入标准:①符合急性缺血性脑血管病诊断标准^[5];②无早期大面积脑梗死影像学改变;③脑CT检查提示无颅内出血;④发病时间 <6 h;⑤首次发病。排除标准:①血小板计数 $<100\times 10^9/L$ 者;②入组前1周存在不易压迫的止血;③既往存在蛛网膜下腔出血者;④严重心、肝、肾功能不全者;⑤入组前3个月存在头颅外伤史者;⑥入组前2周接受过大型外科手术者;⑦既往存在泌尿系统或胃肠系统出血者;⑧既往存在认知功能障碍、肢体功能残疾者;⑨精神异常者。

1.2 方法

1.2.1 神经功能、预后评估

通过美国国立卫生研究院卒中量表(National

表1 3组临床资料对比 [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

Table 1 Comparison of clinical data between the 3 groups [$n(\%)$, $\bar{x}\pm s$]

资料	重度患者($n=56$)	中度患者($n=76$)	轻度患者($n=48$)	F/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	58.07±5.94	57.69±5.68	56.88±5.72	1.507	0.225
男/女	34/22	50/26	30/18	0.377	0.828
体质量指数(kg/m^2)	22.46±2.41	22.53±2.52	22.38±2.48	0.161	0.852
发病至入院时间(h)	.44±1.36	1~(3.61±1.47)	3.52±1.42	1.227	0.296
饮酒史	28(50.00)	34(44.74)	24(50.00)	0.487	0.784
吸烟史	24(42.86)	40(52.63)	22(45.83)	1.334	0.513
脑干病变	4(7.14)	6(7.89)	2(4.17)		
脑叶病变	8(14.29)	12(15.79)	10(20.83)	2.960	0.814
基底节病变	40(71.43)	48(63.16)	30(62.50)		
放射冠区病变	4(7.14)	10(13.16)	6(12.50)		
高脂血症	50(89.29)	72(94.74)	40(83.33)	4.297	0.117
糖尿病	28(50.00)	34(44.74)	20(41.67)	0.760	0.684
心脏病	12(21.43)	20(26.32)	14(29.17)	0.853	0.653
高血压	38(67.86)	44(57.89)	27(56.25)	1.848	0.397

Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS)^[6]评估患者入院时神经功能缺损情况分为:轻度、中度、重度。通过生活能力评分(Modified Rankin Scale, mRs)评估30 d预后情况,预后良好:mRs评分<2分;预后不良:mRs评分2~6分。

1.2.2 标本采集与检测

采集患者入院时、治疗3、5 d后肘部静脉血5 mL,3 000 r/min离心10 min,分别通过上海信裕生物科技有限公司、泉州市睿信生物科技有限公司、艾美捷科技有限公司酶联免疫吸附法试剂盒检测血清PTX-3、CTRP9、MIF水平。

1.3 观察指标

比较不同神经功能缺损程度患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、NIHSS评分。分析血清PTX-3、MIF、CTRP9与NIHSS评分相关性。比较不同预后患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、mRs评分。分析血清PTX-3、CTRP9、MIF与mRs评分相关性。分析血清PTX-3、CTRP9、MIF预测短期预后的截断值、敏感度、特异度。分析血清PTX-3、

CTRP9、MIF联合预测短期预后的截断值、敏感度、特异度。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较以单因素方差分析,两两比较以 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示, χ^2 检验,采用Pearson进行相关性分析,接收者操作特征(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析血清各指标对短期预后的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同神经功能缺损程度患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、NIHSS评分

重度患者血清PTX-3、MIF水平高于中度、轻度患者,CTRP9水平低于中度、轻度患者,NIHSS评分高于中度、轻度患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 不同神经功能缺损程度患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、NIHSS评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of PTX-3, CTRP9, MIF and NIHSS scores in patients with different degrees of neurological impairment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PTX-3(mmol/L)	CTRP9(mg/L)	MIF(pg/mL)	NIHSS评分(分)
重度患者	56	12.81±2.70	0.40±0.11	1 502.26±229.46	16.83±1.72
中度患者	76	10.65±2.39	0.52±0.13	1 324.51±201.83	10.76±2.44
轻度患者	48	8.54±2.06	0.64±0.15	1 155.30±172.34	4.81±1.05
<i>F</i> 值		40.673	44.168	37.643	501.539
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 不同预后患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、mRs评分

根据30 d预后情况分为预后良好患者、预后不良患者。治疗3、5 d后,预后良好患者血清PTX-3、

MIF水平低于预后不良患者,CTRP9水平高于预后不良患者,mRs评分低于预后不良患者差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 不同预后患者血清PTX-3、CTRP9、MIF、mRs评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of PTX-3, CTRP9, MIF and mRs scores in patients with different prognosis ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	<i>n</i>	PTX-3(mmol/L)	CTRP9(mg/L)	MIF(pg/mL)	mRs评分
治疗3 d	预后良好者	146	8.62±1.53	0.57±0.08	1 207.41±101.97	3.07±1.13
	预后不良者	34	10.14±1.81	0.51±0.06	1 310.26±110.85	4.43±1.42
	<i>t</i> 值		5.034	4.109	5.210	6.006
	<i>P</i> 值		<0.001	0.001	<0.001	<0.001
治疗5 d	预后良好者	146	7.11±1.29	0.64±0.10	1 012.68±124.62	2.46±1.05
	预后不良者	34	9.23±2.20	0.54±0.07	1 229.07±220.31	4.05±1.64
	<i>t</i> 值		7.417	5.519	7.232	7.065
	<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 对短期预后的预测价值

ROC 曲线分析显示,治疗 5 d PTX-3 预测短期预后的 AUC 值最大。见表 4。

2.4 联合预测

治疗 5 d 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 联合预测短期预后的 AUC 大于治疗 3 d,见表 5、图 1。

表 4 ROC 分析结果

Table 4 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z 统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值	
治疗 3 d	PTX-3	0.625	0.517~0.725	1.822	>8.07 mmol/L	94.12	31.51	0.046
	CTRP9	0.719	0.614~0.809	2.946	≤0.52 mg/L	70.59	67.12	0.003
	MIF	0.730	0.626~0.818	3.571	>1 271.64 pg/mL	64.71	75.34	<0.001
治疗 5 d	PTX-3	0.779	0.679~0.860	3.620	>8.67 mmol/L	64.71	90.41	<0.001
	CTRP9	0.739	0.635~0.826	3.754	≤0.55 mg/L	64.71	71.23	<0.001
	MIF	0.775	0.675~0.857	4.207	>1 136.19 pg/mL	70.59	73.97	<0.001

表 5 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 联合预测价值

Table 5 Combined predictive value of serum PTX-3, CTRP9 and MIF

指标	AUC	95%CI	Z 值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
治疗 3 d 三者联合	0.887	0.803~0.944	8.845	94.12	75.34	<0.001
治疗 5 d 三者联合	0.915	0.837~0.963	13.017	88.24	80.82	<0.001

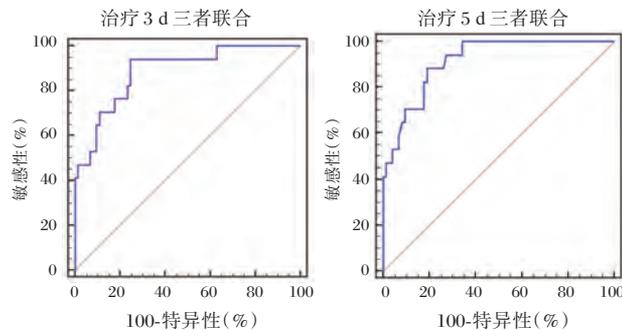


图 1 三者联合预测 ROC 曲线

Figure 1 ROC curve of the 3 joint predictions

2.5 血清 PTX-3、CTRP9、MIF 与 mRs 评分、NIHSS 评分相关性

Pearson 相关性分析,血清 PTX-3($r_1=0.463$, $r_2=0.419$, $P=0.000$)、MIF($r=0.576$, $r_2=0.625$, $P=0.000$)与 mRs 评分、NIHSS 评分呈正相关,CTRP9($r=-0.534$, $r_2=-0.638$, $P=0.000$)水平与 mRs 评分、NIHSS 评分呈负相关($P<0.05$)。

3 讨论

CTRP9 与脂联素结构高度相似,系分泌型糖蛋白,具有促进血管舒张、改善能量代谢、保护内皮细胞、抗炎等作用。戴建立等^[7]研究指出,脑梗死患者血清 CTRP9 水平低于健康人群,高水平

CTRP9 为脑梗死的保护性因素,说明 CTRP9 可能与缺血性脑卒中有关。CTRP9 可通过磷酸化腺苷活化的蛋白激酶—磷酸化的活化蛋白激酶—磷酸化的内皮型一氧化氮合酶途径扩张缺血脑血管,增加梗塞血管的血流量,并能促进内皮细胞分化为毛细血管样管状结构,有利于新生血管形成,且能改善缺血缺氧引起的氧化应激、炎症反应,抑制血小板聚集,故高表达时可改善患者神经功能、预后^[8]。同时根据 Huang C 等^[9]报道,CTRP9 的高表达还能减少促炎因子在巨噬细胞中含量,抑制动脉粥样硬化,提高斑块稳定性,从而预防缺血性脑卒中的加重。

MIF 可由单核细胞、T 细胞、内皮细胞等表达,是激活和募集 T 淋巴细胞的关键趋化因子^[10]。Li YS 等^[11]研究发现,急性缺血性脑卒中患者血清 MIF 水平高于正常人群,表明 MIF 可能与疾病有关。本研究发现 MIF 可影响缺血性脑卒中患者神经缺损程度、预后。Wang G 等^[12]研究指出,MIF 与脑卒中再发有关。同时治疗 5 d 后 MIF 预测短期预后的 AUC 大于治疗 3 d 后,能为临床预测患者预后提供量化参考。

PTX-3 由炎症反应刺激内皮细胞、成纤维细胞等后分泌,与动脉粥样硬化、细胞凋亡等息息相关^[13]。根据 Rodriguez-Grande B 等^[14]报道,PTX3

在大脑中动脉闭塞小鼠模型中显著增高,与脑水肿程度密切相关,从侧面论证了本研究结论。缺血性脑卒中后,脑部缺血缺氧可引起炎症与应激反应,刺激血管内皮细胞等释放PTX-3,故呈现出升高趋势,且PTX-3表达大量上调,可对血管内皮造成炎症损伤,介导损伤部位的凝血反应,促进血栓形成,进一步加重脑缺血程度,因此可影响患者神经功能、预后^[15]。本研究不足之处在于,纳入样本量较少,可能造成数据的偏倚,且未将此三项指标与其它疾病相关性的研究结论进行简练展示,后续有待扩大样本量进行进一步的完善、验证。

综上所述,血清PTX-3、MIF与缺血性脑卒中患者神经功能、短期预后呈正相关;CTRP9水平与神经功能、短期预后呈负相关;三者联合能较为可靠预测患者短期预后,调控PTX-3、CTRP9、MIF表达能为神经功能、预后的改善提供了一个潜在治疗思路。

参考文献

- [1] 孙海欣,王文志. 中国脑卒中患病率、发病率和死亡率调查结果发表[J]. 中华神经科杂志, 2017, 50(5): 337-337.
- [2] 梁蓉. 颈动脉超声联合血清五聚素3、脂蛋白相关磷脂酶A2检测对动脉粥样硬化脑梗死的诊断价值[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(9): 791-795.
- [3] 吴爱成,唐恒锋,黄国清. 血清hsCRP、MCP-1、CTRP9、APN、Lp-PLA2、Fractalkine和RANTES因子水平与无症状冠状动脉粥样硬化的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2018, 27(5): 534-536.
- [4] 邓湘宁,王新宇,于海奕,等. 急性心肌梗死患者巨噬细胞移动抑制因子的变化及临床意义[J]. 中国心血管杂志, 2018, 23(2): 104-109.
- [5] 中华医学会神经病学分会. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4): 246-257.
- [6] Finocchi C, Balestrino M, Malfatto L, et al. National Institutes of Health Stroke Scale in patients with primary intracerebral hemorrhage[J]. *Neurol Sci*, 2018, 39(10): 1751-1755.
- [7] 戴建立,李榕,刘海婷,等. 脑梗死患者血清CTRP9水平的改变及其临床意义[J]. 中华内科杂志, 2019, 58(6): 449-452.
- [8] Sun H, Zhu X, Zhou Y, et al. C1q/TNF-Related Protein-9 Ameliorates Ox-LDL-Induced Endothelial Dysfunction via PGC-1 α /AMPK-Mediated Antioxidant Enzyme Induction[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): E1097.
- [9] Huang C, Zhang P, Li T, et al. Overexpression of CTRP9 attenuates the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 455(1/2): 99-108.
- [10] Emontz pohl C, Stoppe C, Theißen A, et al. The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Remote Ischemic Conditioning Induced Hepatoprotection in a Rodent Model of Liver Transplantation[J]. *Shock*, 2019, 52(5): e124-e134.
- [11] Li YS, Chen W, Liu S, et al. Serum macrophage migration inhibitory factor levels are associated with infarct volumes and long-term outcomes in patients with acute ischemic stroke [J]. *Int J Neurosci*, 2017, 127(6): 539-546.
- [12] Wang G, Li C, Liu Y, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels Correlate with Stroke Recurrence in Patients with Ischemic Stroke[J]. *Neurotox Res*, 2019, 36(1): 1-11.
- [13] 杨秉融,王瑾. 术后早期PTX-3及PCT检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 1(6): 491-494, 502.
- [14] Rodriguez-Grande B, Swana M, Nguyen L, et al. The acute-phase protein PTX3 is an essential mediator of glial scar formation and resolution of brain edema after ischemic injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(3): 480-488.
- [15] 张婷婷,谢谦,邵家骧,等. MicroRNAs与脑卒中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(1): 1-10.

Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值研究

韩玉华* 周俐红 李艳丽

【摘要】 **目的** 探讨血清脂蛋白相关磷脂酶 A₂(Lp-PLA₂)、同型半胱氨酸(Hcy)及 S100 β 对缺血性脑卒中后血管性痴呆(VD)的预测价值。**方法** 选取2016年3月至2018年10月本院收治的200例缺血性脑卒中患者,选择同期健康体检者30例作为对照组,检测血清 Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 水平,缺血性脑卒中患者3个月后依据是否并发 VD 分为 VD 组及 NVD 组,比较各组血清 Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 水平差异,依据 MMSE 评分将 VD 组患者分为轻度、中度及重度,比较不同程度 VD 患者血清 Lp-PLA₂、Hcy、S100 水平差异,采用 pearson 检验分析 VD 患者血清 Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 与 MMSE 评分的相关性,绘制 ROC 曲线,分析 Lp-PLA₂、Hcy 及 S100 β 对缺血性脑卒中后 VD 的预测价值。**结果** 3 组患者的血清 Lp-PLA₂、Hcy、S100 β 比较结果:VD 组>NVD 组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);不同认知障碍 VD 患者血清 Lp-PLA₂、Hcy 和 S100 β 比较结果:重度>中度>轻度,差异有统计学意义($P<0.05$);VD 患者的血清 Lp-PLA₂ ($r=-0.547$, $P=0.000$)、Hcy ($r=-0.511$, $P=0.000$)、S100 β ($r=-0.628$, $P=0.000$) 与 MMSE 评分均呈显著的负相关关系,差异有统计学意义($P<0.05$);Lp-PLA₂、Hcy 和 S100 β 水平单独检测预测缺血性脑卒中后 VD 的 AUC 值为 0.726、0.768、0.794,联合检测预测缺血性脑卒中后 VD 的 AUC 值为 0.892。**结论** 缺血性脑卒中患者血清血清 Lp-PLA₂、Hcy 和 S100 β 水平升高,并且与 VD 的严重程度相关,联合检测 Lp-PLA₂、Hcy 和 S100 β 对缺血性脑卒中后 VD 具有较好的预测价值。

【关键词】 缺血性脑组织;血管性痴呆;脂蛋白相关磷脂酶 A₂;同型半胱氨酸;S100 β

Study on the predictive value of Lp - PLA₂, Hcy and S100 β on vascular dementia after ischemic stroke

HAN Yuhua*, ZHOU Lihong, LI Yanli

(Department of Neurology II, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan, China, 453000)

【ABSTRACT】 **Objective** To explore the predictive value of Lp-PLA₂, Hcy and S100 β in vascular dementia (VD) after ischemic stroke. **Methods** 200 cases of patients with ischemic stroke in our hospital were selected from Mar 2016 to Oct 2018, and 30 healthy people in the same period were selected as the control group. levels of Lp-PLA₂, Hcy and S100 β were measured in serum. Patients with ischemic stroke were divided into the VD group and the NVD group according to whether VD was complicated after months, levels of Lp-PLA₂, Hcy and S100 β in serum were measured in each group, patients in the VD group were divided into mild, moderate and severe condition according to MMSE score, levels of Lp-PLA₂, Hcy and S100 in VD patients were compared in different condition. Pearson test was used to analyze correlation Lp-PLA₂, Hcy and S100 β with MMSE score in VD patients. The ROC curve was drawn to analyze the predictive value of Lp-PLA₂, Hcy and S100 β for VD after ischemic stroke. **Results** The results of serum Lp-PLA₂, Hcy, and S100 β in the three groups of patients: the VD group >the NVD group >the control group. The difference was

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(2018062142)

作者单位:河南省新乡市中心医院神经内科二,河南,新乡 453000

*通信作者:韩玉华, E-mail:353624439@qq.com

statistically significant ($P < 0.05$). Comparison results of serum Lp-PLA2, Hcy and S100 β in patients with different cognitive impairment VD: severe > moderate > mild, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Serum Lp-PLA2 ($r = -0.547$, $P = 0.000$), Hcy ($r = -0.511$, $P = 0.000$), S100 β ($r = -0.628$, $P = 0.000$) of VD patients were significantly negatively correlated with MMSE scores. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The Lp-PLA2, Hcy and S100 β levels were detected separately to predict the AUC value of VD after ischemic stroke were 0.726, 0.768, 0.794, and the combined detection predicted the AUC value of VD after ischemic stroke was 0.892. **Conclusions** Serum Lp-PLA2, Hcy and S100 β levels are elevated in patients with ischemic stroke and related to the severity of VD. Joint detection of Lp-PLA2, Hcy and S100 β has a good predictive value for VD after ischemic stroke.

[KEY WORDS] Vascular dementia; Lipoprotein - associated phospholipase A2; Homocysteine; S100beta; Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein3

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是脑卒中后认知功能障碍, 缺血性脑卒中后较为常见, 在脑组织损伤后早期即可表现出认知功能障碍^[1], 早期的干预级治疗能够降低 VD 的发生, 延缓 VD 的进展, 改善患者的预后^[2]。与神经功能相关的细胞因子在脑组织损害早期即可出现改变, 能够反应脑组织结构和功能的损害程度。脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 能够通过诱导高血脂症, 加剧胆固醇及甘油三酯的沉积, 进而诱导神经元细胞的损伤^[3]; 同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 能够诱导氧化应激性反应, 加剧神经元细胞的损伤凋亡程度^[4]; S100 β 蛋白能够诱导变性蛋白的沉积, 加剧神经元细胞的坏死^[5]。均在脑血管疾病的发生及进展中发挥重要的作用。目前脑卒中后 VD 的早期预测尚缺乏有效方法, 为了探索缺血性脑卒中后 VD 早期具有价值的预测指标, 本文就 Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 在缺血性脑卒中的表达变化及其对 VD 的预测价值进行研究, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 3 月至 2019 年 12 月本院收治的 200 例缺血性脑卒中患者, 依据是否发生 VD 分为 VD 组和非 VD 组, 选取同期健康体检者 30 例, 其中非 VD 组 121 例, 年龄 52~77 岁, 平均 (62.8 \pm 8.6) 岁, 男 70 例、女 51 例; 脑梗死部位分布: 基底节区 68 例、脑叶例 33 例、脑干 14 例、其他部位 6 例; 合并高血压 75 例、糖尿病 25 例、高血脂 42 例; 吸烟 48 例; 受教育年限 (12.0 \pm 3.5) 年。NVD 组年龄 50~79 岁, 平均 (64.3 \pm 10.1) 岁, 男 48 例、女 31 例; 脑梗死部位分布: 基底节区 47 例、脑叶 20 例、脑干 9 例、其他部

位 3 例; 合并高血压 50 例、糖尿病 16 例、高血脂 23 例; 吸烟 23 例; 受教育年限 (11.6 \pm 2.7) 年。对照组年龄 49~75 岁, 平均 (61.7 \pm 7.4) 岁, 男 20 例、女 10 例; 吸烟 12 例; 受教育年限 (11.4 \pm 3.8) 年。三组年龄、性别、合并疾病情况、吸烟率、受教育年限等基线资料差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

纳入标准: ①缺血性脑卒中诊断符合中华医学会神经病学分会脑血管病学组 2016 年发布的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》中缺血性脑卒中诊断标准^[6]; ②发病时间 < 24 小时; ③患者年龄 \leq 79 岁; ④患者无意识障碍或循环、呼吸功能障碍, 预计能够 2 周后能够配合相关调查; ⑤家属对研究内容知情同意。排除标准: ①既往具有认知功能障碍、阿尔茨海默疾病或精神系统疾病; ②既往脑卒中病史或脑外伤病史; ③合并自身免疫性疾病; ④脑干梗死或大面积脑梗死。

1.2 方法

患者入组后采集空腹静脉血 5 mL, 低温分离血清, 深低温保存, 分批检测。血清 Hcy 检测采用免疫荧光法, 检测仪器为 UniCel DxI 800 免疫发光仪 (贝克曼库尔特公司), 试剂购自北京九强生物公司, Lp-PLA2、S100 β 检测采用酶联免疫吸附法, 检测仪器为酶标仪 (赛默飞世尔公司), 试剂购自南京建成生物工程研究所。

1.3 认知功能评分

患者治疗 3 个月对 VD 组患者进行认知功能评分, 简明精神状态量表 (mini-mental state examination, MMSE) 评分及分组标准^[7], MMSE 量表主要包括: 定向力 (10 分)、注意力和计算力 (5 分)、记忆力 (3 分)、回忆能力 (3 分)、语言能力 (9 分), 总分为 30 分, 轻度认知功能障碍: 13~23 分、中度认知功能障碍: 5~12 分、重度认知功能障

碍: <5分。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理, 计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用方差分析。计数资料用 $n(\%)$ 表示, 用 χ^2 检验; 相关性分析采用 Pearson 线性相关分析法; 绘制 ROC 曲线评估 Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 对 VD 的预测价

值, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者的血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β 比较

3组患者的血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β 比较结果: VD组 > NVD组 > 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β 、NLRP3 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum Lp-PLA2, Hcy, S100 β , NLRP3 and MMSE scores between 3 groups of patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	Lp-PLA2 (ng/mL)	NLRP3mRNA (相对表达强度)	S100 β ($\mu\text{g/L}$)
VD组	79	20.66 \pm 4.38	196.4 \pm 52.0	39.41 \pm 10.77	0.95 \pm 0.33
NVD组	121	17.42 \pm 3.09	133.8 \pm 29.1	35.76 \pm 8.52	0.43 \pm 0.18
对照组		12.60 \pm 3.37	106.5 \pm 25.4	27.81 \pm 8.87	0.21 \pm 0.14
<i>F</i> 值		27.203	23.104	5.501	33.296
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 不同认知障碍 VD 患者的血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β

不同认知障碍 VD 患者血清 Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 比较结果: 重度 > 中度 > 轻度, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同程度的 VD 患者的血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum Lp-PLA2, Hcy, S100 β in VD patients with different degrees of dementia ($\bar{x} \pm s$)

认知障碍程度	<i>n</i>	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	Lp-PLA2 (ng/ml)	S100 β ($\mu\text{g/L}$)
轻度	42	18.84 \pm 3.36	172.3 \pm 50.0	0.83 \pm 0.31
中度	23	24.80 \pm 3.10	238.6 \pm 48.6	1.17 \pm 0.28
重度	14	28.74 \pm 4.20	267.93 \pm 49.79	1.49 \pm 0.53
<i>F</i> 值		-17.673	-25.643	-54.775
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.3 VD 患者的血清 Lp-PLA2、Hcy、S100 β 与 MMSE 评分的关系

VD 患者的血清 Lp-PLA2 ($r = -0.547$, $P = 0.000$)、Hcy ($r = -0.511$, $P = 0.000$)、S100 β ($r = -0.628$, $P = 0.000$) 与 MMSE 评分均呈显著的负相关关系, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 对脑卒中后 VD 的预测效能

ROC 曲线分析显示, Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 水平单独检测预测缺血性脑卒中后 VD 的 AUC 值为 0.726、0.768、0.794, 联合检测预测缺血性脑卒中后 VD 的 AUC 值为 0.892。见图1。

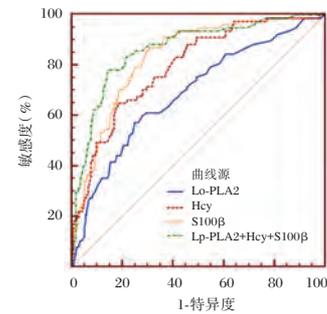


图1 Lp-PLA2、Hcy 和 S100 β 预测 VD 的 ROC 曲线
Figure 1 ROC curve of predicted VD by Lp-PLA2, Hcy and S100 β

3 讨论

VD 是常见的退行性脑病, 在缺血性脑卒中患者, VD 的发病率较高, 与卒中后脑组织结构及功能受损有关^[7]。能够导致患者的认知能力渐进性降低, 注意力、定向力等均发生不同程度受损, 引起患者的生活质量降低。也是脑卒中致残的主要原因之一, 而且并发 VD 的患者, 再次发生恶性脑血管意外的风险明显上升^[8]。而早期的干预及治疗能够改善 VD 的预后。因此对于缺血性脑卒中患者, 对 VD 进行有效的预测并进行干预对于改善预后具有积极的作用。目前对于脑卒中患者是否发生 VD 尚缺乏有效的预测指标^[9]。

Lp-PLA2 是脂质代谢相关因子, 其能够通过提高脂蛋白或者载脂蛋白的氧化代谢速度, 进而影响到氧化应激反应, 加剧神经元的凋亡; Hcy 是胱氨酸代谢相关因子, 其能够提高氮自由基及氧自

由基的释放水平,提高游离自由基对于神经元细胞鞘膜组织的损伤程度;S100 β 是变性蛋白,其过度的沉积能够诱导神经元细胞膜上ATP能量利用功能的缺陷,加剧神经元细胞的电传导的异常。S100 β 还能够影响到神经胶质细胞的损伤修复能力,进而影响到脑功能评分,尤其在脑退行性病变中,S100 β 的表达是导致神经元损害的原因之一^[10]。

本次研究发现,在缺血性脑卒中患者,Lp-PLA2、Hcy、S100 β 表达浓度均明显上升,而且在并发VD的患者,升高的更为明显,提示Lp-PLA2、Hcy、S100 β 参与了缺血性脑卒中神经功能损害的过程,而且在VD的发生中具有重要的作用^[11]。在对不同程度的VD患者比较发现,认知功能损害较重的患者Lp-PLA2、Hcy、S100 β 升高明显,提示其对脑组织的损害,可能是引起认知功能障碍的原因之一。可能与以下机制有关^[12-13]:①Lp-PLA2的表达上升能够提高下游胆固醇的沉积风险,加剧高血脂诱导的神经功能损害或者痴呆病情进展;②Hcy的高表达能够提高下游凋亡小体的浓度,增加脑组织的缺血再灌注损伤,影响到痴呆的病情进展;③S100 β 的上升能够提高神经元细胞鞘膜组织的完整性,从而导致痴呆患者神经电生理功能的障碍。张钱林等^[14]。三种血清学指标对缺血性脑卒中发生VD的预测效果分析发现,Lp-PLA2、Hcy和S100 β 联合检测对缺血性脑卒中后发生VD具有较好的预测价值。

综上所述,在VD患者中,Lp-PLA2、Hcy、S100 β 等的表达浓度明显上升,同时Lp-PLA2、Hcy、S100 β 的表达与VD患者的痴呆程度及精神状态评分密切相关,联合检测,Lp-PLA2、Hcy、S100 β 表达水平对缺血性脑卒中后发生VD具有较好的预测价值。

参考文献

- [1] 马娜,刘远洪,梁金花,等.血管性痴呆患者血清IGF-1、Lp-PLA2、NLRP3的变化及与细胞因子的相关性研究[J].实验与检验医学,2018,36(4):585-587.
- [2] Cheng M, Pan T. Prevention of hypertension-induced vascular dementia by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101-fermented products[J]. *Pharm Biol*, 2016, 55(1):487-496.
- [3] 侯辰,刘西玲,刘玥,等.血浆脂蛋白相关磷脂酶A2水平对不同类型痴呆的风险评估[J].中国医学前沿杂志(电子版),2018,10(4):11-14.
- [4] 李芳,李秀英,王东玉,等.轻中度血管性痴呆患者血浆同型半胱氨酸水平与精神行为症状的关系[J].中华行为医学与脑科学杂志,2015,24(9):800-804.
- [5] 柏华,杨波,余德军,等.核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3在阿尔茨海默病和血管性痴呆患者中的表达及相关因素研究[J].中国康复理论与实践,2016,22(3):306-309.
- [6] 贾建平,王荫华,李焰生,等.中国痴呆与认知障碍诊治指南(二):痴呆分型及诊断标准[J].中华医学杂志,2011,91(10):651-655.
- [7] Jaul E, Meiron O. Systemic and Disease-Specific Risk Factors in Vascular Dementia: Diagnosis and Prevention [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9(6):103-107.
- [8] Mayer F, Di Pucchio A, Lacorte E, et al. An Estimate of Attributable Cases of Alzheimer Disease and Vascular Dementia due to Modifiable Risk Factors: The Impact of Primary Prevention in Europe and in Italy [J]. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2018, 8(1):60-71.
- [9] 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.
- [10] 左丹丹,于露,叶新春,等.核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3炎性小体在中枢神经系统疾病中的研究进展[J].中华神经科杂志,2016,49(10):805-809.
- [11] 蔡颖源,徐慧颖,陆小伟.高血浆高半胱氨酸和脂蛋白相关磷脂酶A2水平与痴呆的相关性[J].国际脑血管病杂志,2017,25(4):342-346.
- [12] 孙芹敏,王哲,曲梦琦,等.老年痴呆患者血清同型半胱氨酸水平及临床意义[J].中国老年学杂志,2015,35(7):1729-1731.
- [13] 王慧琪,宋开义,杨平,等.不同认知损害的痴呆患者血浆同型半胱氨酸水平及VitB₁₂和叶酸的干预效果研究[J].宁夏医科大学学报,2015,37(4):393-396.
- [14] 贾东佩,朱风俊,任应国.脂蛋白相关磷酸酶A2和炎性蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):55-58+73.

TCT、HR-HPV 配合阴道镜下宫颈活检在宫颈癌临床诊断中的价值

杨东斌*

[摘要] 目的 探讨高危型人乳头瘤病毒检测(HR-HPV)、液基细胞学检查(TCT)联合阴道镜下宫颈活检对宫颈癌前病变及宫颈癌的诊断价值。方法 对1400例门诊宫颈癌筛查者资料进行分析。所有筛查者均行HR-HPV、TCT、阴道镜下宫颈活检及病理组织学检查。结果 1400例筛查者接受TCT检查,322例为ASC-US及以上病变,阳性率为23.00%(322/1400)。322例阳性进一步进行病理学检查,结果提示,ASC-US 124例,ASC-H 73例,LSIL 57例,HSIL 43例,SCC 25例。TCT、TCT+HR-HPV、TCT+阴道镜宫颈活检对于宫颈病变的阳性检出率分别为38.51%(124/322)、54.04%(174/322)、68.63%(221/322); TCT+HR-HPV与TCT+阴道镜宫颈活检阳性检出率高于单独使用TCT的阳性检出率,差异有统计学意义($P<0.05$);而TCT+HR-HPV+阴道镜宫颈活检的阳性检测率最高,为76.71%(247/322),差异均具有统计学意义($P<0.05$)。HR-HPV联合阴道镜检查对于诊断ASC-US、ASC-H、LSIL、HSIL、SCC的灵敏度分别为95.42%、96.54%、98.24%、100.00%、100.00%,特异度分别为72.15%、75.33%、65.24%、41.35%、0.00%,其灵敏度和特异度均明显高于单独使用HR-HPV或阴道镜检查,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 HR-HPV、TCT联合阴道镜下宫颈活检可显著提高临床上宫颈病变和宫颈癌的检出率,同时提高检测的灵敏度和特异度,对患者的早期诊断、早期治疗和改善预后具有重要意义。

[关键词] TCT; HR-HPV; 阴道镜; 宫颈癌; 宫颈癌前病变; 筛查; 准确率; 漏诊率

Clinical diagnostic value of TCT, HR-HPV and colposcopy cervical biopsy in cervical cancer

YANG Dongbin*

(Department of Pathology, the first people's Hospital of Ningyang County, Ningyang, Shandong, China, 271400)

[ABSTRACT] Objective To investigate the diagnostic value of high-risk human papillomavirus (HR-HPV), Thinprep liquid cytologic test (TCT), and colposcopy cervical biopsy for cervical precancerous lesions and cervical cancer. Methods The data of 1400 outpatients with cervical cancer screening were analyzed. All patients underwent HR-HPV, TCT, colposcopy cervical biopsy, and histopathological examination. Results All patients received 1400 TCT examination, the results of 322 cases of patients shown as ASC-US and more severe lesions, positive rate was 23.00% (322/1400). A further pathological examination was performed on the 322 positive patients, and the results indicated that 124 ASC-US, 73 ASC-H, 57 LSIL, 43 HSIL, and 25 SCC. The positive detection rates of cervical lesions by TCT, TCT + HR-HPV, and TCT + colposcopy for cervical lesions were 38.51% (124/322), 54.04% (174/322), and 68.63% (221/322), respectively. The positive detection rate of TCT + HR-HPV and TCT + colposcopy cervical biopsy was higher than TCT alone, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of TCT + HR-HPV + colposcopy

作者单位:山东省宁阳县第一人民医院病理科,山东,宁阳271400

*通信作者:杨东斌, E-mail: blk36642@163.com

cervical biopsy was the highest, being 76.71% (247/322), which was significantly higher than the other three groups, and the differences were diagnosis of ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, and SCC was 95.42%, 96.54%, 98.24%, 100.00%, and 100.00%, and the specificity was 72.15%, 75.33%, 65.24%, 41.35%, 0.00%, respectively, which were significantly higher than those using HR-HPV or colposcopy alone, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** HR-HPV and TCT combined with colposcopy for cervical biopsy can significantly improve the detection rate of cervical lesions and cervical cancer in the clinic, at the same time improve the sensitivity and specificity of detection, which is important for early diagnosis, treatment and Improve prognosis of patients.

[KEY WORDS] TCT; HR-HPV; Colposcopy; Cervical cancer; Cervical precancerous lesions; Screening; Accuracy rate; Misdiagnosis rate

宫颈癌是临床上常见妇科肿瘤,是影响全世界妇女的第四大最常见的癌症,在组织病理学上主要分为鳞状细胞癌、腺癌和腺鳞癌。据研究报告,2018年约有57万例宫颈癌新发病例发生,有31.1万例死亡,约占所有癌症相关死亡人数的3.3%^[1]。不同地区宫颈癌的发病率和死亡率不尽相同,亚洲的发病率大致在4.1%~17.2%,死亡率约为2.1%~10.0%。在过去的十年里,发达国家的宫颈癌发病率有所下降,而发展中国家的发病率却在上升,并且有发病年轻化趋势^[2]。在中国,宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌,是威胁女性健康的严重疾病。大量研究表明,多数宫颈癌病例是由于人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)持续感染引起^[3]。宫颈癌存在较长的癌前病变,称为宫颈上皮内瘤变(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN),早期患者无明显临床症状和体征,极易发生漏诊和误诊;后期随着CIN的进行性发展,进展至原位癌、早期癌和浸润癌,患者出现明显临床症状,但患者预后也呈下降趋势^[4]。因此,早发现、早诊断、早治疗对于宫颈癌的治疗和预后具有重要意义,为临床宫颈癌的早期诊断提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院于2017年1月至2019年12月门诊就诊的1400例宫颈癌筛查者为研究对象,所有筛查者均有性生活史,就诊原因包括无症状自行前来体检、白带异常、接触性出血等。筛查者年龄在23~69岁,平均年龄为(42.63±5.74)岁。纳入标准:①无子宫切除史;②筛查者无妊娠;③排除阴道毛滴虫、假丝酵母菌等感染;④无宫颈上皮内瘤变及

宫颈癌病史;⑤筛查者自愿加入本研究并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 HR-HPV检测

采用无菌生理盐水蘸湿棉球,擦去宫颈外口分泌物后,使用宫颈刷或棉拭子插入宫颈内,顺时针旋转宫颈刷或棉拭子3~5圈采集宫颈分泌物样本,置于无菌玻璃管后送实验室采用PCR方法定性检测HR-HPV。

1.2.2 TCT检查

采用无菌棉球清洁宫颈外口后,使用宫颈细胞取样刷插入宫颈内约1 cm处,顺时针旋转取样刷3~5圈以采集宫颈分泌物样本,随后置于细胞保存液中漂洗摇匀,密封无菌保存编号,送至实验室进行检查,检查采用新柏氏2000全自动制片机进行制片,选择质量较好的涂片(上皮覆盖率>10%),采用TBS(The Bethesda system)分级系统进行细胞学诊断^[5]:①正常范围或良性反应改变;②无明确诊断意义的非典型鳞状细胞(Atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US);③非典型鳞状上皮细胞(High-grade atypical squamous cells, ASC-H);④低度鳞状上皮内病变(Low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL);⑤高度鳞状上皮内病变(Cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL);⑥SCC;⑦腺癌(Adenocarcinoma, AC)。ASCUS及以上病变定为细胞学阳性,以下定为阴性。

1.2.3 电子阴道镜检查

对HR-HPV阳性、TCT提示为不典型鳞状细胞(ASCUS)及以上级别病变(包括CIN、SCC)的筛查者行阴道镜检查。检查应于筛查者于月经结束3~7天后进行,所有筛查者于检查前1天禁止进

行阴道用药、阴道冲洗等操作。检查应由2名以上具有3年以上电子阴道镜检查经验的主治医师进行检查和诊断,密切观察有无病灶及病灶的大小、形态、边界、颜色血管结构及碘反应等。采用Reid阴道镜评分指数(reid colposcopic index, RCI)评分对进行诊断^[6]。

1.2.3 宫颈活检

对于RCI检查阳性筛查者直接在可疑病变区域取组织进行活检,对于电子阴道镜图像不规则的筛查者,可在宫颈3、6、9、12点位置取组织进行活检,所有标本送病理科由2名及以上经验丰富的病理科医师进行检验。参照《病理学》中宫颈癌的病变诊断标准^[7]。

1.3 观察指标

以宫颈活检病理结果为金标准,对比采用TCT、TCT+HR-HPV、TCT+阴道镜活检、TCT+HR-HPV+阴道镜活检的阳性检出率。

1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0对数据进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 的形式表示,采用 χ^2 检验进行分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2. 结果

2.1 TCT检查结果

所有1400例筛查者接受TCT检查,ASC-US及以上病变阳性检出率为322(23.00%)。对这322例阳性结果检出者进一步进行病理学检查,结果提示,ASC-US 124例,ASC-H 73例,LSIL 57例,HSIL 43例,SCC 25例。

2.2 宫颈病变阳性检出率比较

研究结果表明,TCT+HR-HPV与TCT+阴道镜宫颈活检阳性检出率高于单独使用TCT的阳性检出率,差异有统计学意义($P<0.05$);而TCT+HR-HPV+阴道镜宫颈活检的阳性检测率显著高于其余3组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.3 不同检查方法灵敏度、特异度比较

与单独采用HR-HPV、阴道镜检查相比,HR-HPV联合阴道镜检查对于诊断ASC-US、ASC-H、LSIL的灵敏度和特异度较高,差异有统计学意义($P<0.05$);对于诊断HSIL,HR-HPV联合阴道镜检查的灵敏度和特异度均明显高于单独使用HR-HPV或阴道镜检查,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 不同诊断方法宫颈病变的阳性检出率对比 [$n(\%)$]
Table 1 Comparison of positive detection rates of cervical lesions by different diagnostic methods [$n(\%)$]

分组	<i>n</i>	正常/炎症	CIN/SCC
TCT	322	198(61.49)	124(38.51)
HR-HPV	322	178(55.28)	144(44.72)
TCT+HR-HPV	322	148(45.96)	174(54.04) ^a
TCT+阴道镜宫颈活检	322	101(31.37)	221(68.63) ^b
TCT+HR-HPV+阴道镜宫颈活检	322	75(23.29)	247(76.71) ^c

注:a:与TCT、HR-HPV相比, $P<0.05$;b:与TCT+HR-HPV相比, $P<0.05$;c:与TCT+阴道镜宫颈活检相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

大量流行病学资料和实验结果表明,HPV的持续感染是导致宫颈癌发生的主要原因^[8],几乎在所有的宫颈癌标本中都可检测到HPV病毒DNA。根据靶组织的不同,HPV可分为皮肤型和黏膜型,前者通常感染手和脚等基底上皮细胞,引起扁平疣等,后者又可分为高危型和低危型^[9-10]。HR-HPV主要包括HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73和82,任何以上病毒的感染都可能导致CIN,进而甚至进展为浸润型宫颈癌^[11]。TCT检查近年来广泛应用于临床上宫颈癌的筛查,与传统涂片方法相比,TCT操作对患者无创,取材方便,可以延长标本的储存时间,并且可以在一定程度上提高涂片质量,但仍存在一些不

表2 不同诊断方法对ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, SCC诊断的灵敏度、特异度结果对比

Table 2 Comparison of sensitivity and specificity of different diagnostic methods for ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, and SCC

分组	ASC-US		ASC-H		LSIL		HSIL		SCC	
	灵敏度	特异度	灵敏度	特异度	灵敏度	特异度	灵敏度	特异度	灵敏度	特异度
HR-HPV	81.35	20.38	80.61	21.11	81.22	52.34	85.54	27.34	100.00	0.00
阴道镜检查	88.64	68.54	89.52	70.34	90.24	57.24	100.00	39.64	100.00	0.00
联合检查	95.42 ^{ab}	72.15 ^{ab}	96.54 ^{ab}	75.33 ^{ab}	98.24 ^{ab}	65.24 ^{ab}	100.00 ^a	41.35 ^a	100.00	0.00

注:a:与HR-HPV相比, $P<0.05$;b:与阴道镜检查相比 $P<0.05$ 。

足,如存在细胞重叠以及有效细胞数量少等问题,因此可能存在一些假阴性和假阳性^[12]。电子阴道镜在宫颈病变的诊断中具有更准确且直观的优势,并且可以将病灶图像放大以发现肉眼难以发现的微小病灶,且在检查诊断过程中不对患者产生任何创伤,患者接受度较高^[13-14]。另一方面,对于可疑的病灶,在电子阴道镜下可直接进行定位活检,诊断的灵敏度较高,是临床上诊断宫颈病变和宫颈癌的重要辅助方式。

本研究结果显示 TCT 以及电子阴道镜检查都可用于宫颈癌的筛查,但都存在一定的假阴性和假阳性,效果不尽理想。结果提示 HR-HPV、TCT 配合阴道镜下宫颈活检可以显著提高宫颈病变的阳性检出率;本研究还进一步分析了不同检测手段的灵敏度和特异度,结果提示,HR-HPV 联合阴道镜检查对于诊断 ASC-US、ASC-H、LSIL、HSIL、SCC 的灵敏度和特异度均明显高于单独使用 HR-HPV 或阴道镜检查,提示联合检测方式可以有效提高宫颈病变和宫颈癌诊断的灵敏度和特异度,降低临床漏诊率和误诊率,这与华荃等^[15]人的研究结果一致。

综上所述,HR-HPV、TCT 配合阴道镜下宫颈活检可以综合各种单一检查方法的优势,同时又相互弥补了存在的不足,可以有效降低临床上的漏诊率和误诊率,有利于宫颈癌前病变和宫颈癌的早期发现和早期诊断,这对于改善预后具有重要意义。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68:394-424.
- [2] Swarnapriya K, Kavitha D, Reddy GMM. Knowledge, Attitude and Practices Regarding HPV Vaccination Among Medical and Para Medical in Students, India a Cross Sectional Study[J]. Asian Pac J cancer prev, 2016, 16(18):8473-8477.
- [3] Asami Yagi, Yutaka Ueda, Mamoru Kakuda, et al. Epidemiologic and Clinical Analysis of Cervical Cancer Using Data from the Population-Based Osaka Cancer Registry[J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1252-1259.
- [4] 井佳雨, 牟婧祎, 王轶英, 等. 宫颈癌及癌前病变筛查方法研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017(2):203-205.
- [5] 唐移忠, 张书忠, 余险峰, 等. TCT 和 HPV 联合检测在宫颈癌和癌前病变临床筛查的应用价值[J]. 解放军预防医学杂志, 2019(5):143-147.
- [6] 陈少敏, 张友忠, CHENShaomin, 等. 改良 Reid 阴道镜评分在 CIN 分级诊断中的应用价值[J]. 中国现代医生, 2011, 49(6):121-122.
- [7] 李玉林. 病理学[J]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 260-262.
- [8] 黎哲斌, 魏换娣. TCT、HPV-PCR 和阴道镜在宫颈癌疾病诊断中的应用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011(06): 53-56.
- [9] 许惠惠, 朱海燕, 章彤彤, 等. 高危型人乳头状瘤病毒感染在宫颈病变进展中的风险研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2017, 31(4):302-306.
- [10] Tan S C, Ismail M P, Duski D R, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus (HPV) in Malaysian women with and without cervical cancer: An updated estimate [J]. Bioscience Rep, 2018, 38(2):BSR20171268.
- [11] M. IBRAGIMOVA, M. TSYGANOV, O. SHPILEVA, et al. HPV status and its genomic integration affect survival of patients with cervical cancer [J]. Neoplasma, 2018, 65(3): 441-448.
- [12] 张云清, 韩慧慧, 张冠军, 等. TCT 联合高危 HPV 检测在早期宫颈癌的筛查应用研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2018(5):435-436.
- [13] 孙斯媛, 罗飞, 胡义忠, 等. HPV、TCT 及活检在宫颈病变筛查中的应用研究[J]. 河北医药, 2019(11):1645-1649.
- [14] Angel Chao, Huei-Jean Huang, Chyong-Huey Lai. Human papillomavirus research on the prevention, diagnosis, and prognosis of cervical cancer in Taiwan [J]. Biomed J, 2012, 35(4):297-308.
- [15] 华荃, 陈洁, 申艳. HR-HPV、TCT 联合电子阴道镜下宫颈活检在宫颈癌前病变及宫颈癌诊断中的应用[J]. 中外医疗, 2016, 35(35):11-13.

冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后 Hcy、FIB 和 CRP 的变化

戴艺¹ 刘丽¹ 欧燕² 周理国^{2*}

[摘要] 目的 分析冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后 C 反应蛋白(CRP)、纤维蛋白原(FIB)、同型半胱氨酸(Hcy)水平变化。方法 选取本院 2019 年 4 月至 2020 年 2 月收治且经 CT 血管成像或数字血管造影确诊的 63 例冠心病心绞痛患者作为研究对象(冠心病组),另选取同一时期在本院接受健康体检的 63 例体检者作为健康组。比较两组 Hcy、FIB 及 CRP 水平及冠心病组患者治疗前后 Hcy、FIB 及 CRP 水平变化,并分析冠心病患者经治疗后预后疗效情况及影响其疗效的相关因素。结果 冠心病组 Hcy、FIB 及 CRP 水平明显高于健康组,差异具有统计学意义($P<0.05$);治疗后冠心病组 Hcy、FIB 及 CRP 水平均低于治疗前,差异具有统计学意义($P<0.05$);冠心病组临床总有效率为 84.13%,显效 33 例(52.38%),有效 20 例(31.75%),无效 10 例(15.87%);经非条件多因素 logistic 回归模型分析得,年龄、有高血脂症、Hcy、FIB、CRP 水平是影响药物治疗临床疗效差的独立危险因素($P<0.001$)。结论 采用冠心舒通胶囊治疗冠心病心绞痛患者可有效改善其临床症状,降低 Hcy、FIB、CRP 水平,Hcy、FIB、CRP 表达水平与其疗效具有一定相关性。通过熟悉掌握影响疗效的危险因素,积极采取防御措施,可提高患者临床治疗效果。

[关键词] 冠心病心绞痛; C 反应蛋白; 纤维蛋白原; 同型半胱氨酸; 冠心舒通胶囊

Changes of Hcy, FIB and CRP in patients with coronary heart disease and angina pectoris treated with Guanxinshutong capsules and their correlation

DAI Yi¹, LIU Li¹, OU Yan², ZHOU Ligu^{2*}

(1. Administrative Office of Chongqing Qijiang District People's Hospital, Chongqing, China, 401420;

2. Department of Pharmacy, Chongqing Qijiang District People's Hospital, Chongqing, China, 401420)

[ABSTRACT] Objective To analyze the changes of C-reactive protein (CRP), fibrinogen (FIB), and homocysteine (Hcy) levels in patients with coronary heart disease and angina pectoris after treatment with Guanxinshutong Capsules and to analyze the correlation. Methods 63 patients with coronary heart disease and angina pectoris admitted in our hospital from April 2019 to February 2020 and confirmed by CT angiography or digital angiography were selected as the research subjects (coronary heart disease group). Another 63 healthy patients who underwent health examination in our hospital at the same time were selected as the health group. The levels of Hcy, FIB and CRP in two groups and the changes of Hcy, FIB and CRP levels of patients in coronary heart disease group before and after treatment were compared. The prognosis of patients with coronary heart disease after treatment and related factors affecting its efficacy were analyzed. Results The levels of Hcy, FIB and CRP in the coronary heart disease group were significantly higher than those in the healthy group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). After treatment, the levels of Hcy, FIB and CRP in the coronary heart disease group were lower than those before treatment ($P<$

基金项目:重庆市卫计委 2017 年医学科研计划项目(2017XMSB00013952)

作者单位:1. 重庆市綦江区人民医院行政办公室,重庆 401420

2. 重庆市綦江区人民医院药学部,重庆 401420

*通信作者:周理国, E-mail:383979208@qq.com

0.05)。In the coronary heart disease group, the total clinical effective rate was 87.30%, 33 cases were significantly effective (52.38%), 20 cases were effective (31.75%), and 10 cases were ineffective (15.83%)。Analysis by non-conditional multi-factor logistic regression model showed that age, hyperlipidemia, Hcy, FIB, and CRP levels were independent risk factors affecting the poor clinical efficacy of drug treatment ($P < 0.001$)。Conclusion The treatment of patients with coronary heart disease and angina pectoris with Guanxinshutong capsules can effectively improve their clinical symptoms and reduce the levels of Hcy, FIB and CRP. The expression levels of Hcy, FIB and CRP have a certain correlation with their efficacy. By familiarizing with the risk factors that affect the efficacy, and actively taking defensive measures, the clinical treatment effect of patients can be improved.

[KEY WORDS] Coronary heart disease and angina pectoris; C-reactive protein; Fibrinogen; Homocysteine; Guanxinshutong capsule

冠心病指冠状动脉粥样硬化使血管腔狭窄、阻塞和因冠状动脉功能改变导致心肌缺氧或坏死而引起的心脏病^[1-2]。该病的主要病因是冠状动脉粥样硬化,但有关动脉粥样硬化的原因尚未明确。冠心病根据病理解剖和病理生理变化的不同,可分为隐匿型、心绞痛型、心肌梗死型、缺血性心脏病型及猝死型五种类型^[3]。其中冠心病以心绞痛型最为常见。冠心病患者发生心绞痛时心前区和胸骨后部都会发生绞痛、闷痛,疼痛还可扩散至颈部、左肩或手臂,对患者生活造成严重影响^[4]。目前临床多采用药物治疗冠心病心绞痛,其中最为常见的是美托洛尔。近年来,大量相关研究显示,中医药联合西药治疗在冠心病心绞痛方面具有明显优势^[5-6]。故本研究就冠心病心绞痛患者经冠心舒通胶囊治疗后C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)、同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)水平变化及与其疗效的相关性进行了分析,以此提高对该病的认识与诊治水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2019年4月至2020年2月收治且经CT血管成像或数字血管造影确诊的63例冠心病心绞痛患者作为研究对象(冠心病组)。同时选取同一时期在本院接受健康体检的63例体检者作为健康组。冠心病组,男性36例,女性患者27例,年龄57~80岁,平均年龄为(68.41±4.63)岁;病程6个月~5年;心绞痛程度:轻度39例,中度24例。健康组,男性38例,女性患者25例,年龄56~81岁,平均年龄为(68.54±4.16)岁。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

纳入标准:①无其他严重疾病患者;②所有患者均自愿参与本次研究,且签署书面知情同意书;③无房颤、早搏等心律失常;④无心衰、哮喘。排除标准:①合并认知功能、神经功能障碍者;②长期药物依赖史者;③严重肝肾功能不全者;④凝血功能差。

1.2 方法

1.2.1 药物治疗

冠心病患者采用经皮冠状动脉介入治疗并加用冠心舒通胶囊(陕西步长制药有效公司,国药准字Z20020055)治疗,口服,3粒/次,3次/d。连续给药6周。

1.2.2 炎症因子检测

检查前禁食8 h以上,于次日清晨抽取受检者3 mL静脉血,抗凝、离心,随后将分离的血浆置-20℃保存。CRP采用免疫比浊法,使用BECKMAN公司生产的Array 360 System及其相应试剂盒进行测定;Hcy采用自动化的荧光偏振免疫法,使用美国雅培公司生产的AbbotIMx自动免疫分析仪及其相应试剂盒进行检测;FIB采用凝固法,使用ORCANON TEKNI-KA公司生产的血凝分析仪和四川迈克生物科技股份有限公司的相应试剂盒进行检测。具体操作方法严格按照说明书进行。

1.3 观察指标

比较冠心病组与健康组Hcy、FIB及CRP水平。比较冠心病组患者治疗前后Hcy、FIB及CRP水平变化。分析冠心病患者经治疗后预后疗效情况为显效、有效、无效^[7]。分析药物治疗后影响其疗效的相关因素。

1.4 统计学分析

采用SPSS 12.0软件进行分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)描述,采用 t 检验;计数资料采用 $n(\%)$ 表示;

采用 χ^2 检验,多元 Logistic 回归分析影响冠心病心绞痛患者临床疗效的独立危险因素,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Hcy、FIB 及 CRP 水平比较

冠心病组 Hcy、FIB 及 CRP 水平明显高于健康组,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组 Hcy、FIB 及 CRP 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of Hcy, FIB and CRP levels between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	FIB(g/L)	CRP(mg/L)
冠心病组($n=63$)	15.69 \pm 5.27	4.32 \pm 1.36	6.45 \pm 3.44
健康组($n=63$)	8.37 \pm 2.09	2.74 \pm 1.03	1.98 \pm 0.87
t 值	10.248	7.351	9.999
P 值	0.001	0.001	0.001

2.2 冠心病组患者药物治疗前后 Hcy、FIB 及 CRP 水平变化

治疗后,冠心病组患者 Hcy、FIB 及 CRP 水平均较治疗前降低,治疗前后 Hcy、FIB 及 CRP 水平比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 冠心病组患者药物治疗前后 Hcy、FIB 及 CRP 水平变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of Hcy, FIB and CRP in patients with coronary heart disease before and after drug treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	观察组($n=63$)		t 值	P 值
	治疗前	治疗后		
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	15.69 \pm 5.27	10.42 \pm 3.08	6.853	0.001
FIB(g/L)	4.32 \pm 1.36	3.52 \pm 1.14	3.578	0.001
CRP(mg/L)	6.45 \pm 3.44	2.25 \pm 1.13	9.207	0.001

2.3 冠心病组患者临床疗效分析

治疗后,冠心病组总有效率为 84.13%,其中显效 33 例(52.38%),有效 20 例(31.75%),无效 10 例(15.87%)。

2.4 影响药物治疗预后疗效因素的单因素分析

预后疗效良好患者年龄、有无高脂血症、Hcy、FIB 及 CRP 水平与预后疗效差患者比较差异具有统计学意义($P<0.05$),但两组性别、病程及有无酗酒史、吸烟史比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 影响药物治疗预后疗效因素的单因素分析 [$n(\%)$]

Table 3 Single factor analysis of factors influencing the prognosis of drug treatment [$n(\%)$]

因素		预后疗效	预后疗效差	χ^2 值	P 值
		良好 ($n=53$)	($n=10$)		
性别	男	29(54.72)	7(70.00)	0.802	0.370
	女	24(45.28)	3(30.00)		
年龄	≥ 70 岁	19(35.85)	8(80.00)	6.696	0.010
	< 70 岁	34(64.15)	2(20.00)		
病程	≥ 3 年	23(46.40)	6(60.00)	0.934	0.334
	< 3 年	30(56.60)	4(40.00)		
高脂血症	有	16(30.19)	7(70.00)	5.752	0.016
	无	38(71.70)	3(30.00)		
酗酒史	有	29(54.72)	5(50.00)	0.075	0.784
	无	24(45.28)	5(50.00)		
吸烟史	有	25(47.17)	6(60.00)	0.554	0.457
	无	28(52.83)	4(40.00)		
Hcy($\mu\text{mol/L}$)	≥ 7.89	18(33.96)	8(80.00)	7.256	0.007
	< 7.89	35(66.04)	2(20.00)		
FIB(g/L)	≥ 2.06	21(39.62)	8(80.00)	5.521	0.019
	< 2.06	32(60.38)	2(20.00)		
CRP(mg/L)	≥ 3.22	24(45.28)	9(90.00)	6.744	0.009
	< 3.22	29(54.72)	1(10.00)		

2.5 影响药物治疗预后疗效因素的多因素分析

经非条件多因素 logistic 回归模型分析,年龄、有高脂血症、Hcy、FIB、CRP 水平是影响药物治疗预后疗效差的独立危险因素。见表 4。

3 讨论

心绞痛是冠心病常见、最典型的临床症状之一,是因冠状动脉粥样硬化引起的管腔狭窄或痉挛,导致冠状动脉扩张性减弱,血流量减少所致^[8-9]。冠状动脉粥样硬化的发生、发展是一个较为复杂的过程,多种致病因素均可导致动脉内皮损坏、功能异常。血液中的炎性因子水平、尿酸及胆固醇等异常变化在冠状动脉粥样硬化发生与发展过程中具有重要意义^[10]。Hcy 是蛋氨酸代谢产生的一种含硫氨基酸,是目前医学领域研究的热点之一,被医学界认为是心血管疾病新的独立的致病因子^[11]。Hcy 浓度升高可形成同型半胱氨酸基内酯,与低密度的脂蛋白结合后,会形成复合体,最后在巨噬细胞吞噬作用下,堆积形成粥样硬化斑块泡沫细胞;同时,Hcy 可发生自发氧化,损伤内皮细胞,氧化低密度、低脂肪的蛋白,导致发生缺氧情况,促进冠状动脉粥样硬化发生^[12]。

药物治疗是临床上治疗冠心病的常用方法,其中以美托洛尔较为常见,其可有效抑制患者体内脂

表4 影响药物治疗预后疗效因素的 logistic 多因素分析

Table 4 logistic multivariate analysis of the factors influencing the prognosis of drug treatment

变量	回归系数	标准误	Wald/ χ^2 值	P值	OR(95%CI)值
年龄 ≥ 70 岁	0.624	0.243	4.783	<0.05	1.900 1.180~3.060
有高血脂症	0.815	0.264	10.382	<0.01	2.259 1.347~3.790
Hcy ≥ 7.89 $\mu\text{mol/L}$	0.715	0.256	7.048	<0.01	2.044 1.238~3.376
FIB ≥ 2.06 g/L	0.447	0.172	5.668	<0.05	1.564 1.116~2.194
CRP ≥ 3.22 mg/L	0.469	0.192	8.147	<0.01	1.598 1.097~2.329

肪的分解,降低游离脂肪酸,具有负性变力和变时作用,可有效降低心脏能量的需求;同时美托洛尔可通过降低心率、心排出量、改善心肌缺血及灌注等,使心绞痛症状得以缓解。但目前仅单用西药治疗冠心病的疗效不理想,且长期使用药物可产生一系列不良反应,导致治疗效果受到影响。冠心舒通胶囊是蒙医药名族的一种药剂。全方共五味,广枣、丹参行气活血化瘀,丁香协冰片止痛,冰片协天竺黄开窍。五药相合,以散为主,共奏活血化瘀、通经活络、行气止痛之功,而达到治疗冠心病心绞痛的目的。徐玲等研究者^[13]对冠心病冠状动脉粥样硬化发生的危险因素进行了多因素 Logistic 分析,结果显示男性、吸烟史、糖尿病、LDL-C >3.1 mmol/L、高血压均是发生冠心病的独立危险因素。

既往研究发现,Hcy、FIB、CRP水平均与动脉粥样硬化、冠心病的发生及其严重程度密切相关,临床因经常将上述因子作为治疗后的动态监测指标^[14]。Hcy水平过高可作为早期筛查冠心病心绞痛的重要指标,能够明确高危人群,进而及时给予干预^[15]。FIB是一种由肝脏合成的具有凝血功能的蛋白质,其与纤维素和粥样斑块形成的关系极为密切。CRP是一种能在Ca⁺存在时与肺炎链球菌的荚膜C多糖结合的蛋白质,具有促进吞噬、调理免疫及激活补体的作用。

综上所述,采用冠心舒通胶囊治疗冠心病心绞痛患者可有效改善其临床症状,降低Hcy、FIB、CRP水平;Hcy、FIB、CRP水平表达情况与其疗效具有一定相关性,通过熟悉影响疗效的危险因素,积极采取防御措施,可提高患者临床治疗效果。

参考文献

[1] 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、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.

[2] 刘朝晖,李德才,刘思泰,等. 急性心肌梗死冠状动脉介入术后无复流现象影响因素分析[J]. 临床误诊误治, 2019, 32

(3):367-368.

- [3] Julio ALM, Robyn LMC, Morgan G, et al. Coronary heart disease risk associated with the dyslipidaemia of chronic kidney disease[J]. Heart, 2018, 104(17):2794.
- [4] 黎洁雯,龙洁旎,李明星,等. 脂蛋白(a)水平对冠心病患者药物洗脱支架植入术后支架内再狭窄及非靶病变的影响[J]. 解放军医学杂志, 2019, 44(10):851-856.
- [5] 肖森森,倪楚民,郑康超,等. 致心律失常性右室心肌病分子机制的研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(2):191-196.
- [6] 杨可鑫,于莉,张会永,等. 冠心病心绞痛血瘀证候组成相关文献研究分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 19(11):70-73.
- [7] Bechthold A, Boeing H, Schwedhelm C, et al. Food groups and risk of coronary heart disease, stroke and heart failure: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies[J]. Criti rev food sci nutr, 2019, 59(7):1071.
- [8] 李永军. 舒血宁注射液对脑梗死患者临床疗效及血浆Hcy、UCH-L1及血清fibulin-5水平的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(1):143-146.
- [9] Robert M, Carney KE, Freedland BC, et al. Steinmeyer, et al. Residual Symptoms Following Treatment for Depression in Patients with Coronary Heart Disease [J]. Psychosomatic Med, 2018, 80(4):1.
- [10] 乔瑞省,吴霞,牛敬,等. 不同年龄段冠心病患者的临床特征及其危险因素分析[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(11):2057-2060.
- [11] Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, et al. Use of a reference material proposed by the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein (a) [J]. Clin Chem, 2020, 101(12):12.
- [12] 李云超,刘晓静,聂浩,等. 益气活血方联合大剂量阿托伐他汀对不稳定型心绞痛患者hs-CRP、Hcy、cTnI和cTnT水平的影响研究[J]. 河北医药, 2019, 47(14):563-564.
- [13] 徐玲,尹婷婷,俞吉,等. 冠心病冠状动脉粥样硬化发生的危险因素多因素 Logistic 分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 17(6):1379-1381.
- [14] 付建平,张俊岭,扈晓霞,等. 血清缺血修饰白蛋白和同型半胱氨酸水平与冠心病患者心肌缺血程度的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 26(4):13-16.
- [15] 刘冰,曹鸿雁,王金春,等. ACS患者Hcy、hs-CRP、SHG与GRACE评分的相关性研究[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2019, 14(3):718-719.

RDW、DD联合抗CCP抗体检测对RA诊断及病情活动的价值分析

杨波 徐磊 贾伟 王霜*

[摘要] **目的** 分析红细胞分布宽度(RDW)、D-二聚体(DD)联合抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体检测对类风湿性关节炎患者诊断及病情活动评估的应用价值。**方法** 选取2019年1月至2020年1月于本院收治的45例类风湿性关节炎患者作为研究组对象,再选取36例同时间段进行健康体检的非类风湿性关节炎的人群作为对照组,对比两组人群的RDW、DD及抗CCP抗体水平,分析这三项指标在类风湿性关节炎患者的诊断及病情活动程度评估的应用价值。**结果** 研究组RDW、DD及抗CCP抗体对照组显著高于($P<0.05$);RDW、DD、CCP抗体的单一检测的特异性和灵敏性均显著低于三者联合检测;类风湿性关节炎病情活动期的RDW、DD及抗CCP抗体均显著高于病情稳定期($P<0.05$);经Spearman相关分析,类风湿性关节炎患者的RDW、DD及抗CCP抗体与患者病情活动程度呈正相关($P<0.05$)。**结论** 类风湿性关节炎患者的RDW、DD及抗CCP抗体含量与患者的活动程度存在明显的相关性,三者联合检测对该疾病的诊断具有重要价值,值得推广应用。

[关键词] 类风湿性关节炎;红细胞分布宽度;D-二聚体;抗环瓜氨酸肽抗体

Analysis on the value of RDW and DD combined with of anti-CCP antibodies in the diagnosis of RA and in the evaluation of disease activity

YANG Bo, XU Lei, JIA Wei, WANG Shuang*

(Department of Nephrology, Endocrinology and Rheumatology, 960 Hospital of the People's Liberation Army, Zibo, Shandong, China, 255300)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the application value of red blood cell distribution width (RDW), D-dimer (DD) combined with anti-cyclic citrulline peptide antibody (anti-CCP antibody) in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) and in the evaluation of disease activity of patients. **Method** 45 patients with rheumatoid arthritis treated in our hospital from January 2019 to January 2020 were selected as the study group, and 36 patients without rheumatoid arthritis who underwent physical examination at the same time were selected as the control group. The expression levels of RDW, DD and anti-CCP antibodies between the two groups were measured and compared, and the application value of these three indicators in the diagnosis of rheumatoid arthritis and in the evaluation of disease activity of patients was analyzed. **Results** The RDW, DD, and anti-CCP antibodies in the study group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The specificity and sensitivity of RDW, DD, and CCP antibodies alone were all significantly lower than those of the combined examination of them. The RDW, DD, and anti-CCP antibodies of patients with rheumatoid arthritis in the active stage were significantly higher than those in the stable stage ($P<0.05$). According to Spearman correlation analysis, RDW, DD and anti-CCP antibodies in patients with rheumatoid arthritis were positively correlated with patients' disease activity ($P<0.05$). **Conclusion** The levels of RDW, DD, and anti-CCP antibodies in patients with rheumatoid arthritis has a significant correlation with the patient's

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS21078)

作者单位:解放军第九六〇医院肾病内分泌风湿科,山东,淄博255300

*通信作者:王霜, E-mail: wangshuangsd@126.com

activity level. The combined detection of them has important value in the diagnosis of the disease and is worthy of popularization and application.

[KEY WORDS] Rheumatoid arthritis; Red blood cell distribution width; D-dimer; Anti-cyclic citrullinated peptide antibody

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种致使周围关节受累的多系统性炎症性疾病,患有该疾病的患者大多表现为对称性周围性多个关节出现慢性炎症病变,例如关节疼痛、肿胀等,该疾病引起的病变一般持续时间长,且反复发作,对患者的生活质量及相关活动功能造成了严重影响^[1]。红细胞分布宽度(Red blood cell distribution width, RDW)的检查在临床上常应用于诊断贫血,有相关研究发现贫血的发生与心脑血管疾病的发生及预后存在着重要联系,而RA患者被证实患心脑血管疾病的概率远远高于正常人^[2]。D-二聚体(D-dimer, DD)则是一种可动态监测血栓变化的分子,有学者认为该分子的异常也是RA患者的心脑血管发生病变的危险因素之一^[3]。而抗环瓜氨酸肽(Anti-cyclic citrullinated peptide antibody, CCP)抗体则是一种用于诊断RA的重要指标之一,具有较高的特异性,在RA的早期即可被检测出来^[4]。故本研究通过对类风湿性关节炎患者的RDW、DD及抗CCP抗体的检测来分析其含量及方法对患者的诊断以及病情活动程度的评估价值,并获得相关成果,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院于2019年1月至2020年1月收治的45例类风湿性关节炎患者作为研究对象,患者均出现了关节肿胀、疼痛等症状,其中男16人,女29人,年龄20~74岁,平均(45.49±13.41)岁。再选取同时间段进行健康体检的非类风湿性关节炎的人群36例作为对照组,包括男13人,女23人,年龄21~75岁,平均(46.03±13.17)岁。两组患者一般资料的比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①所有患者均经相关检查符合类风湿性关节炎的诊断标准^[5];②本研究通过医院伦理会审批;③临床资料完整;④均自愿参加本次研究,并签署相关协议。排除标准:①存在其他系统疾病或恶性肿瘤等疾病患者;②伴随严重心、肝、肾功能不全患者;③合并有免疫系统的其他疾病患者;④在研究中途要求退出的患者。

1.2 方法

所有受检者在入院后和抽取3 mL清晨空腹静脉血,加入枸橼酸钠予以抗凝处理,进行3 000 r/min离心10 min后取上清液放置于-20℃恒温箱中待检。通过选用日本东亚公司生产的SYSMEX XS-1000i全自动分析仪,并使用其配套试剂盒对RDW水平含量予以测定;采用酶联免疫吸附法、使用北京欧蒙医学诊断技术有限公司生产的试剂对抗CCP抗体水平进行测定。通过使用日本SYSMEX公司生产的CA700血凝仪及其配套试剂盒严格按照其说明书对DD的水平予以检测。

1.3 观察指标

对比两组人群的RDW、DD、抗CCP抗体水平;对比研究组患者RDW、DD、抗CCP抗体的阳性率情况;对比研究组患者RDW、DD、抗CCP抗体诊断RA灵敏性及特异性情况;对比不同病情活动程度RA患者RDW、DD、抗CCP抗体表达水平;RA患者的RDW、DD、抗CCP抗体的表达的相关性分析。

1.4 判定标准

①RDW \geq 14.6%, DD \geq 0.55 μ g/mL, 抗CCP抗体 $>$ 17 U/mL即为阳性^[6]。②3项检测中出现两项指标异常即可诊断为RA^[7]。根据类风湿性关节炎活动评分(DAS28)量表进行判定^[8]:对患者28个关节的肿胀及压痛程度进行评估,若计算数值评分 $>$ 2.6分即为病情活动组,若评分 \leq 2.6分即为病情稳定组。

1.5 统计学方法

应用SPSS 18.0软件对数据进行分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;各项计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。相关性分析运用Spearman相关进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组人群RDW、DD、抗CCP抗体表达水平情况

研究组RDW、DD、抗CCP抗体水平显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组RDW、DD、抗CCP抗体表达水平比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison on expression levels of RDW, DD and anti CCP antibody between 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	RDW (%)	DD (μg/mL)	抗CCP抗体 (μg/mL)
研究组	45	16.35±4.27	275.89±67.58	76.42±13.27
对照组	36	4.57±2.19	136.01±35.16	2.81±2.05
<i>t</i> 值	-	15.034	11.251	31.983
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 研究组RDW、DD、抗CCP抗体检测灵敏性及特异性情况

RDW、DD、抗CCP抗体以及三者联合检测中,联合检测的灵敏性及特异性均明显高于单一检测。见表2。

表2 研究组RDW、DD、抗CCP抗体检测情况比较
Table 2 Comparison of detection of RDW, DD and anti CCP antibody in the study group

检测方法	灵敏性(%)	特异性(%)
RDW	84.44	73.50
DD	82.22	78.44
抗CCP抗体	71.11	97.13
RDW+DD+抗CCP抗体联合	95.56	97.45

2.3 不同病情活动程度RA患者RDW、DD、抗CCP抗体水平情况

经DAS28评估,研究组患者中有病情稳定患者25例,病情活动患者20例。且病情活动组患者的RDW、DD、抗CCP抗体均明显高于病情稳定组($P<0.05$)。见表3。

表3 不同病情活动程度RA患者RDW、DD、抗CCP抗体水平情况比较($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison on RDW, DD and anti CCP antibody levels of RA patients in different disease activity ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	RDW (%)	DD (μg/mL)	抗CCP抗体 (μg/mL)
病情稳定组	25	12.46±3.89	159.64±37.55	10.97±4.23
病情活动组	20	17.73±4.51	289.63±68.07	78.78±13.51
<i>t</i> 值	-	4.207	8.139	23.742
<i>P</i> 值	-	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 RA患者RDW、DD、抗CCP抗体表达水平与病情活动程度的相关性

经Spearman相关进行分析,RA患者RDW($r=0.499, P=0.25$)、DD($r=0.324, P=0.031$)、抗CCP抗

体表达水平与病情活动程度呈正相关($P<0.05$)。($r=0.458, P=0.028$)。

3 讨论

RA是一种以小关节病变为主的慢性、对称性、最终对人体关节造成变形的全身性、系统性的自身免疫性疾病,具有较高的致残率,我国是RA的高发地区,目前大约有400~500万人患有该疾病,发病率约占0.32%~0.36%^[9]。

RDW是反映红细胞体积异质性的参指标数,影响RDW异常的原因有许多,其中炎症和氧化应激反应是导致RDW上升的重要因素^[10]。有相关试验证实,RA患者体内的氧化应激反应均明显高于正常水平,但仍未达到活性氧诱导发生氧化损伤的水平,这样在一定程度上说明了氧化应激反应参与了RA患者关节病变的过程,而在RA病变过程中,患者体内发生的炎性反应将是RDW升高^[11]。本研究结果提示RA患者存在RDW的异常情况。

DD是一种特异性降解产物,是纤维蛋白单体经XIII、Ca²⁺交联后形成稳定的交联纤维蛋白,然后再经过纤溶酶水解产生的,该分子在临床上常应用于血栓的检测^[12]。且有学者证实DD的升高可对体内纤溶酶及凝血酶的活性有效反应^[13]。也有国外文献显示,炎性反应在一定水平下可诱导凝血功能的异常,使凝血反应加重,而血栓的形成对炎性反应的发生密切相关^[14]。故当RA患者DD水平上升也提示着患者体内存在纤溶酶及凝血酶活性异常激活^[15]。本研究有效的证实到了这一点,临床上可根据其含量对RA患者凝血功能及炎性反应进行预测。

且本研究发现三者联合检测的特异性及灵敏性均显著高于上述指标单独检测,这提示了RA患者的体内存在RDW、DD、抗CCP抗体的异常升高,可通过对其联合检测提高对该疾病的准确性,以减少疾病的误诊误治情况,及时的对患者进行治疗^[16]。同时本研究还发现,RDW、DD、抗CCP抗体的变化与患者病情活动程度呈正相关关系,上述指标的上升提示患者病情处于活动状态。

综上所述,RDW、DD联合抗CCP抗体检测对RA的诊断灵敏性、特异性高,其水平与患者的病情活动程度具有一定的相关性,临床上可根据起变化对患者的诊断、治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] 唐伟伟, 吴士明, 吴悦维, 等. 远红外热成像技术在慢性踝关节炎患者踝关节疼痛定位诊断中的应用价值[J]. 保健医学研究与实践, 2017, 13(6): 12-14.
- [2] 李鸿斌, 白莉, 吴庆军, 等. 类风湿关节炎患者合并心脑血管病的危险性分析[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(25): 1769-1773.
- [3] Laura C Cappelli, Judy Lynn Palmer, Joel Kremer, et al. Tocilizumab treatment leads to improvement in disease activity regardless of CCP status in rheumatoid arthritis[J]. *SeminArthritis Rheum*, 2017, 47(2): 1121-1123.
- [4] 刘静, 唐永霞, 司有花. 儿童系统性红斑狼疮二例误诊原因探讨[J]. 临床误诊误治, 2019, 34(6): 62-64.
- [5] 陆学丹. 类风湿性关节炎 DAS28 评分与血清 MMP-2 水平和凝血功能的关系[J]. 安徽医学, 2019(11).
- [6] Wielosz E, Majdan M, Dryglewska M, et al. Anti-CCP antibodies and rheumatoid factor in systemic sclerosis: Prevalence and relationships with joint manifestations[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(9).
- [7] 谭立明, 李华, 王巧花, 等. 血清 14-3-3 η 、DD、anti-CCP 及 CRP 检测对鉴别诊断 RA 的临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 028(032): 96-100.
- [8] 姚血明, 马武开, 唐芳, 等. 类风湿关节炎患者 DAS28 积分与疾病活动指标的相关性分析[J]. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21(1): 79-81.
- [9] 马玲, 范文强, 杨福娟. 风湿性疾病慢病管理模式在类风湿关节炎患者中的应用效果[J]. 中华现代护理杂志, 2017, 23(10): 1357-1360.
- [10] Vidal Bralo, Perez Pampin Regueiro C, et al. Anti-carbamylated protein autoantibodies associated with mortality in Spanish rheumatoid arthritis patients [J]. *plos one*, 2017, 12 (7) : 0180144.
- [11] Lin F, Wang X, Liang Y, et al. Red Blood Cell Distribution Width in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis and Osteoarthritis: True Inflammatory Index or Effect of Anemia [J]. *Ann clin lab*, 2018, 48(3): 301-307.
- [12] Emamifar A, Levin K, Hansen JIM. Patients with newly diagnosed Rheumatoid Arthritis are at increased risk of Diabetes Mellitus: An Observational Cohort study[J]. *Acta Reumatol Port*, 2017, 42(4): 42-46.
- [13] 鲁冰, 任东升, 栗明. 左卡尼汀联合血液透析对尿毒症患者 Treg/Th17 细胞、血清炎症因子和肾功能指标的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(02): 51-55.
- [14] Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(10): 606.
- [15] Mehta B B, Sharma S, Vasishta R K, et al. Blocking osteopontin-fibronectin interactions reduce extracellular fibronectin deployment and arthritic immunopathology [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 297-305.
- [16] 岳超, 刘勤, 李捷, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对类风湿关节炎的诊断效能[J]. 山东医药, 2019, 62(24): 358-360.

(上接第 934 页)

参考文献

- [1] 许丽娜, 赵静, 应仙华. 子宫内膜异位症患者血清 syndecan-1 及 MMP-9 水平变化及其临床意义[J]. 中华内分泌外科杂志, 2018, 12(4): 326-329.
- [2] 李利玲, 汪向红, 刘妮英, 等. 抑那通对子宫内膜异位症患者术后血清 HE4 及 ENA78 水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(12): 2267-2270.
- [3] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(3): 161-169.
- [4] Margareta D Pisarska, Jessica L Chan, Kate Lawrenson, et al. Genetics and Epigenetics of Infertility and Treatments on Outcomes [J]. *J clin endocrinol and metabolism*, 2019, 104(6): 1871-1886.
- [5] Doering A, Jenkins CA, Storrow AB, et al. Markers of diuretic resistance in emergency department patients with acute heart failure [J]. *Int J Emerg Med*, 2017, 10(1): 17.
- [6] Yoshikawa M, Morine Y, Ikemoto T, et al. Elevated Preoperative Serum CEA Level Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma Through the Epithelial-Mesenchymal Transition [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 1169-1175.
- [7] 王蕾, 王国华. 微型核糖核酸-29c 靶向调控血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 在子宫内膜异位症不孕中的作用[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(1): 33-36.
- [8] 郑绍英, 刘小梅. 穴位埋线联合孕三烯酮治疗子宫内膜异位症疗效及对血清 CA125、抗子宫内膜抗体水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(11): 1203-1206.
- [9] Ramalingam K, Vuthaluru S, Srivastava A, et al. Ultra structural changes occurring in duct ectasia and periductal mastitis and their significance in etiopathogenesis [J]. *Plos One*, 2017, 12(3): e0173216.
- [10] 王鑫, 黄豪光, 万美兰, 等. 子宫内膜异位症合并不孕患者血清内分泌激素、VEGF、IGF-I 水平及自身免疫抗体变化及其意义[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(15): 2299-2301.
- [11] 聂伟, 马迎萍. 子宫内膜异位症与免疫不孕的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(17): 4212-4214.
- [12] Hee-Jin Choi, Tae-Wook Chung, Hee-Jung Choi, et al. Increased α 2-6 sialylation of endometrial cells contributes to the development of endometriosis [J]. *Experimental & molecular medicine*, 2018, 50(12): 164.
- [13] Jason Abbott. Surgical treatment is an excellent option for women with endometriosis and infertility [J]. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*, 2017, 57(6): 679-681.

血清 E2、P1NP 水平对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值

方兵* 程翰林 虞红林 程杰 曹京 李要争 洪宇

[摘要] **目的** 探究血清雌二醇(E2)、I型原胶原氨基端肽(P1NP)水平对绝经后骨质疏松性合并腰椎骨折风险的预测价值。**方法** 选取2015年8月至2018年8月在本院就诊的62例绝经后骨质疏松性腰椎骨折患者作为骨折组,另取同期绝经后骨质疏松无腰椎骨折患者62例作为非骨折组。采用X射线骨密度仪检测两组患者髋部及腰部骨密度(BMD),并采用电化学法发光法检测其血清E2及P1NP水平。采用Logistic回归分析探究影响绝经后骨质疏松性腰椎骨折的危险因素,利用受试者工作曲线(ROC曲线)分析血清E2及P1NP对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值。**结果** 两组患者髋部及腰部BMD差异无统计学意义($P>0.05$)。骨折组血清E2水平明显低于非骨折组,血清P1NP水平明显高于非骨折组($P<0.05$)。Logistic回归分析显示低水平E2及高水平是导致绝经后骨质疏松性腰椎骨折的独立危险因素($P<0.05$)。血清E2及P1NP联合诊断绝经后骨质疏松性合并腰椎骨折时受试者工作(ROC)曲线下面积(AUC)为0.836,高于两者单独检测时的AUC(0.765和0.773, $P<0.05$)。**结论** 血清E2、P1NP水平与绝经后骨质疏松性腰椎骨折的发生密切相关,两者联合检测用于预测绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险具有很高的价值。

[关键词] 雌二醇; I型原胶原氨基端肽; 绝经; 骨质疏松; 腰椎骨折

The predictive value of serum E2 and P1NP levels in the risk of osteoporotic lumbar fractures in postmenopausal women

FANG Bing*, CHENG Hanlin, YU Honglin, CHENG Jie, CAO Jing, LI Yaozheng, HONG Yu
(Department of Orthopaedics, Huangshan Shoukang Hospital, Huangshan, Anhui, China, 245000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive value of serum estradiol (E2) and procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP) levels in the risk of osteoporosis combined with lumbar fractures in postmenopausal women. **Methods** A total of 62 patients with osteoporotic lumbar fractures after menopause who were diagnosed in the hospital from August 2015 to August 2018 were enrolled as fracture group. 62 patients with osteoporosis but without lumbar fractures after menopause in the same period were included as non-fracture group. The bone mineral density (BMD) at hip and lumbar of both groups were detected by X-ray bone sonometers. The serum E2 and P1NP levels were detected by electrochemistry method and luminescence method. The logistic regression analysis was used to explore the risk factors affecting postmenopausal osteoporotic lumbar fractures, and the receiver operating curve (ROC curve) was used to analyze the predictive value of serum E2 and P1NP on the risk of postmenopausal osteoporotic lumbar fractures. **Results** There was no significant difference in hip or lumbar BMD between the two groups ($P>0.05$). Serum E2 level in fracture group was significantly lower than that in non-fracture group, while serum P1NP level was significantly higher than that in non-fracture group ($P<0.05$). The logistic regression analysis showed that low levels of E2 and

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(1704f0804018)

作者单位:黄山首康医院骨科,安徽,黄山 245000

*通信作者:方兵, E-mail: lqar44630@sina.com

high levels were independent risk factors for postmenopausal osteoporotic lumbar fractures ($P < 0.05$). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) of serum E2 and P1NP for the diagnosis of osteoporosis combined with lumbar fracture after menopause was 0.836, which was higher than that of either of the two (0.765 and 0.773, $P < 0.05$). Conclusion Serum E2 and P1NP levels are closely related to the occurrence of osteoporotic lumbar fractures after menopause. The combined detection of the two is of high value in predicting risk of osteoporotic lumbar fractures after menopause.

[KEY WORDS] Estradiol; Procollagen type 1 amino-terminal propeptide; Menopause; Osteoporosis; Lumbar fracture

骨质疏松症是临床常见一种慢性疾病,其特征主要表现为骨代谢物增加,骨密度(Bone mineral density, BMD)下降,骨脆性增加,易导致骨折的发生^[1]。绝经后妇女由于卵巢功能衰退,雌激素含量下降,导致骨形成及骨吸收的平衡被破坏,因而极易受到骨质疏松及其相伴随的骨折的困扰^[2]。因此,对于绝经后妇女,预测及诊断骨质疏松性骨折显得尤为重要。目前,临床多采用检测BMD的方式的预测及诊断骨质疏松性骨折,但是该诊断方式不适用于短期随访监测,且诊断准确率不高^[3]。雌二醇(Estradiol, E2)是机体最主要的雌激素,是促进女性体内外生殖器官发育,维持女性功能及第二性征的重要激素^[4]。研究显示,血清E2水平是影响绝经后女性BMD的一个独立因素,与绝经后女性骨质疏松性骨折的发生密切相关^[5]。I型原胶原氨基端肽(Procollagen Type I Intact N-terminal Propeptide, P1NP)作为骨代谢生化指标之一,可在短期内反映I型胶原和成速率和成骨活性,对预测骨质疏松性骨折风险具有重要的参考价值^[6]。本研究对绝经后骨质疏松性腰椎骨折患者血清E2、P1NP的水平进行检测,探究血清E2、P1NP及两者联合检测对绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年8月至2018年8月在本院就诊的62例绝经后骨质疏松性腰椎骨折患者作为骨折组,另取同期绝经后骨质疏松无腰椎骨折患者62例作为非骨折组。

1.2 诊断标准

骨质疏松症:采用Peodig型双能X射线骨密度仪(美国通用医疗器械公司)对各患者骨密度进行测量,符合世界卫生组织(WHO)颁布的骨质疏松诊断标准^[7]。

1.3 纳入标准与排除标准

纳入标准:①符合上述骨质疏松诊断标准;②为原发性绝经;③骨折组患者符合绝经后骨质疏松性腰椎骨折诊断标准且为腰椎新鲜骨折;④资料完整;⑤经本院伦理委员会批准。排除标准:①合并糖尿病、高血压及心血管疾病者;②接受腰椎手术或存在由车祸、跌落等创伤引起的腰椎压缩性骨折者;③合并心、肝、肾等重要器官功能不全者;④服用激素及抗骨质疏松药物者;⑤合并骨肿瘤等影响骨代谢疾病者;⑥合并甲状旁腺功能亢进、类风湿性关节炎等代谢性疾病者。所有患者知情并同意参与本研究,且已签署知情同意书。

1.4 检测指标

1.4.1 髌部及腰部BMD测定

采用Peodig型双能X射线骨密度仪(美国通用医疗器械公司)分别检测两组患者的髌部及腰部BMD。

1.4.2 血清E2及P1NP水平检测

分别抽取各患者外周空腹静脉血5 mL,经离心(3 000 r/min, 5 min)后分离血清。采用电化学法发光法利用电化学发光仪(美国罗氏公司)及其配套检测试剂盒测定各患者血清E2、P1NP、 β -I型胶原羧基端肽(β -Carboxyl terminal peptide, β -CTX)、骨胶原N端中分子片段(Molecular fragment of osteocalcin N terminal, N-MID)、25-羟基维生素D(25-hydroxyvitamin D, 25-(OH) VitD)水平。采用速率法测定钙离子(Calcium ion, Ca^{2+})水平。

1.5 统计学方法

利用SPSS20.0软件处理数据,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。采用Logistic回归模型分析绝经后骨质疏松患者腰椎骨折的影响因素。血清E2、P1NP及两者联合的诊断价值采用ROC曲线分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者年龄、身高、体重及体重指数(Body mass index, BMI)、髌部及腰部BMD等一般资料比

较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 两组患者血清E2及PINP水平比较

骨折组患者血清E2水平明显低于非骨折组患者,血清PINP水平明显高于非骨折组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

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	n	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)	BMI(kg/m ²)	髌部BMD(g/cm ²)	腰部BMD(g/cm ²)
非骨折组	62	68.27±7.25	155.26±5.33	60.37±5.54	26.35±3.36	0.57±0.05	0.68±0.05
骨折组	62	68.97±8.33	156.34±4.87	59.64±6.03	26.52±4.54	0.56±0.04	0.69±0.06
t值		0.499	1.178	0.702	0.237	1.230	1.008
P值		0.619	0.241	0.484	0.813	0.221	0.315

表2 两组患者血清E2及PINP水平比较

Table 2 Comparison of serum E2 and PINP levels between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	E2(pg/mL)	PINP(ng/mL)
非骨折组	62	20.23±2.92	39.76±14.27
骨折组	62	17.56±2.03	58.36±15.47
t值		5.712	8.546
P值		0.000	0.000

2.4 两组患者骨代谢指标比较

两组患者血清N-MID、Ca²⁺水平无明显差异($P>0.05$);骨折组患者血清β-CTX水平高于非骨折组($P<0.05$),血清25-(OH)VitD低于非骨折组($P<0.05$)。见表3。

表3 两组患者骨代谢指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of bone metabolism indexes between the 2 groups of patients ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	β-CTX (ng/mL)	N-MID (ng/mL)	25-(OH)VitD (ng/mL)	Ca ²⁺ (ng/mL)
非骨折组	62	0.44±0.21	19.82±4.31	25.63±7.39	2.31±0.15
骨折组	62	0.59±0.23	21.26±5.27	20.49±6.12	2.28±0.13
t值		3.792	1.665	4.218	1.190
P值		0.000	0.098	0.000	0.236

2.5 绝经后骨质疏松患者发生腰椎骨多因素回归分析

以是否发生腰椎骨折为应变量,以上述分析中两组存在明显差异的因素(血清E2、PINP、β-CTX、25-(OH)VitD)为自变量,进行Logistic多元回归分析,结果显示高水平血清PINP、β-CTX及低水平血清E2、25-(OH)VitD是绝经后骨质疏松

患者发生腰椎骨折的独立危险因素($P<0.05$)。见表4。

表4 绝经后骨质疏松患者发生腰椎骨多因素回归分析
Table 4 Multivariate regression analysis of lumbar spine in postmenopausal osteoporosis patients

因素	β值	SE值	Wald/ χ ² 值	OR值	P值	95%CI
E2	-0.352	0.151	5.434	0.703	0.020	0.523~0.946
PINP	0.621	0.203	9.358	1.861	0.002	1.250~2.770
β-CTX	0.498	0.225	4.899	1.645	0.027	1.059~1.645
25-(OH) VitD	-0.275	0.127	4.689	0.760	0.031	0.592~0.974

2.6 血清E2及PINP水平预测绝经后骨质疏松性腰椎骨折的价值

血清E2联合PINP诊断绝经后骨质疏松性腰椎骨折时ROC曲线下面积,高于血清E2或PINP单独诊断时ROC曲线下面积($P<0.05$)。见图1。

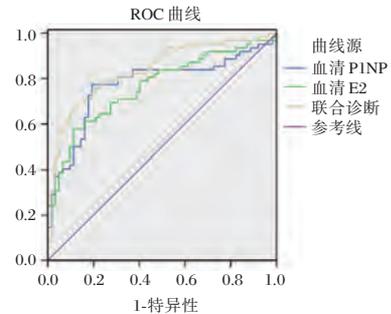


图1 血清E2、PINP及两者联合诊断绝经后骨质疏松性腰椎骨折的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of serum E2, PINP and their combination in the diagnosis of postmenopausal osteoporotic lumbar fracture

3 讨论

女性在绝经后,由于卵巢功能衰退,雌激素缺乏,使得骨代谢中骨形成及骨吸收的平衡被破坏,导致骨磷代谢失调,造成骨质疏松^[8]。临床研究显示,骨质疏松是引起腰椎骨折的独立危险因素,而腰椎骨折会引起疼痛及肺部感染等并发症,严重影响绝经后妇女的生命健康及生活质量^[9]。由于BMD与绝经后发生骨质疏松性腰椎骨折的风险负相关,临床多通过监测BMD预测绝经后发生骨质疏松性腰椎骨折的风险^[10]。但是,BMD降低只有在患者骨丢失量达到一定程度时才得以体现,无法及时、有效的反映机体骨代谢情况,用于预测绝经后妇女骨质疏松性腰椎骨折时准确率较低^[11]。在本研究中,两组患者腕部及腰部BMD比较均无明显差异,进一步证实采用BMD作为诊断指标预测绝经后妇女骨质疏松性腰椎骨折风险准确性较差。

雌激素减少是导致绝经后妇女骨质疏松发生的主要原因。Xu等^[12]研显示,绝经前切除双侧卵巢者可使失骨过程加快,BMD降低,易于引发骨质疏松。而这一结果提示雌激素含量与骨质疏松密切相关。E2是维持女性功能及第二性征最主要的雌激素^[13]。本研究结果显示,骨折组血清E2水平明显低于非骨折组,提示雌激素含量不仅与绝经后骨质疏松的发生相关,还与绝经后骨质疏松性腰椎骨折的发生相关。成骨细胞及破骨细胞中均有E2受体,E2可通过提升成骨细胞活性促进骨形成,亦可通过抑制破骨细胞活性骨抑制吸收,从而调节机体骨代谢^[14]。而对于绝经后骨质疏松症患者,当其体内血清E2含量降低时,骨吸收大于骨形成,造成骨量显著降低,从而增加并发腰椎骨折的风险^[7]。本研究多元回归分析结果显示低水平E2是导致绝经后骨质疏松患者腰椎骨折的独立危险因素,进一步证实低水平E2与腰椎骨折的发生密切相关。

机体内绝大多数骨基质是由I型胶原质组成,在形成骨纤维时,PINP与I型胶原分子等比例释放入血,血清PINP水平与血清I型胶原的含量相当,因此PINP可作为骨形成标志物,用于预测骨代谢状态具有较高的敏感度^[15]。本研究结果显示,骨折组患者PINP水平明显高于非骨折组患者,说明绝经后妇女出现骨质疏松性腰椎骨折时其体内PINP水平明显增高,相应其骨转化活性也明显增强,随着骨量的不断丢失,可引

起脆性骨折的发生^[16]。而本研究结果显示高水平PINP是绝经后骨质疏松患者腰椎骨折的独立危险因素,提示绝经后骨质疏松妇女血清PINP水平高者并发腰椎骨折的风险更高。随后,本研究采用血清E2及PINP联合诊断绝经后骨质疏松性腰椎骨折,其ROC曲线下面积为0.836,明显高于两者单独检测时的ROC曲线下面积,说明联合检测具有更高的准确性,对绝经后骨质疏松性腰椎骨折的预测价值更大。

综上所述,血清E2、PINP水平与绝经后骨质疏松性腰椎骨折的发生密切相关,可用于诊断绝经后骨质疏松性腰椎骨折,而两者联合检测用于预测绝经后骨质疏松性腰椎骨折风险具有很高的价值。

参考文献

- [1] Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, S2213858717301882.
- [2] Cosman F, Hattersley G, Hu MY, et al. Effects of Abaloparide-SC on Fractures and Bone Mineral Density in Subgroups of Postmenopausal Women With Osteoporosis and Varying Baseline Risk Factors [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(1): 17-23.
- [3] Zhang L, Yin X, Wang J, et al. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 981-986.
- [4] Park YM, Pereira RI, Erickson CB, et al. Estradiol-mediated improvements in adipose tissue insulin sensitivity are related to the balance of adipose tissue estrogen receptor α and β in postmenopausal women [J]. *Plos One*, 2017, 12(5): e0176446.
- [5] 刘海娟,李艳,周方元.血清E2和E2/T比值对绝经后女性骨质疏松诊断的临床价值[J].*中华检验医学杂志*, 2017, 40(8): 583-588.
- [6] Ohishi T, Fujita T, Suzuki D, et al. Changes of bone mineral density and serum pentosidine during a 27-month follow-up of monthly minodronate in osteoporotic patients [J]. *Endocr Res*, 2017, 42(3): 1-9.
- [7] 霍少川,董路珺,唐宏宇.骨代谢生化指标与绝经后骨质疏松性腰椎骨折相关性分析[J].*重庆医学*, 2017, 46(1): 48-50.
- [8] 何洁铭,惠耀敏.骨密度检测对老年女性骨折风险的预测价值[J].*华南预防医学*, 2017, 43(6): 583-585.
- [9] 辛力,林华.促骨形成药物干预骨质疏松性骨折临床研究进展[J].*中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2017, 10(1): 72-78.

(下转第963页)

体外诊断试剂创新产品临床试验对比方法选择及案例解析

徐超* 方丽 李冉

[摘要] 随着科技的进步、行业的发展体外诊断试剂领域创新频出,国家药品监督管理局出台一系列政策鼓励创新,多个产品实现了从实验室到临床的转化。创新产品在研发过程中产品的验证与确认离不开临床试验,诊断产品临床试验一般采用临床比对的方式进行,创新产品因目前无已上市的同类产品,或与已上市同类产品在性能上存在显著差异,临床试验对比方法选择一直是个难题。本文基于当前法规要求,结合已批准部分产品临床试验开展情况,对该类产品临床试验对比方法的选择进行探讨,给相关产品临床试验提供参考。

[关键词] 体外诊断试剂;创新产品;临床试验;对比方法

In vitro diagnostic reagent innovative product clinical trial comparison method selection and case analysis

XU Chao*, FANG Li, LI Ran

(Center for Medical Device Evaluation, NMPA, Beijing, China, 10081)

[ABSTRACT] With the development of technology and in vitro reagent industry, there are many innovations in this field. The National Medical Products Administration issued a series of policies to encourage innovation. Many products have achieved the transformation from laboratory to clinical. During the research and development of innovative products, product verification and confirmation are inseparable from clinical trials, and clinical trials of diagnostic products are generally conducted by clinical comparison. Because innovative products do not have similar products on the market or have significant differences in performance from similar products on the market, the choice of clinical trial comparison methods has been a problem. Based on the requirements of current regulations and the development of clinical trials of approved products, this article discusses the selection of comparison methods for clinical trials of such products and provides references for clinical trials of related products.

[KEY WORDS] In vitro diagnostic reagents; innovative products; clinical trials; comparison methods

1 体外诊断试剂创新情况简介

近年来,我国大力实施创新驱动发展战略。医疗器械领域的创新是高新技术的重要体现,是科技服务民生的重要途径。2017年10月,中办、国办印发《关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械

创新的意见》(厅字[2017]42号)^[1],标志着我国医疗器械审评审批制度进入了实质性改革阶段。创新医疗器械审评审批的改革是改革的重要内容,国家药监局2018年11月发布了《创新医疗器械特别审查程序》^[2],原食药监械管[2014]13号废止。自2018年12月1日起施行。新程序设置更为科学有

作者单位:国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心,北京 100081

通信作者:徐超, E-mail: xuchao@cmde.org.cn

效,有利于提升创新医疗器械审查效率,为鼓励医疗器械产业创新发展发挥积极作用。

体外诊断试剂产品从产品大类上属于医疗器械的一部分,其创新的相关情况及创新产品的处理方式应满足《创新医疗器械特别审查程序》要求。然而针对体外诊断试剂产品,哪些产品可作为创新产品申报;本文结合相关产品的审评经验认为有以下几种情况。

1.1 产品被测物为新的生物标志物,且检测结果具有明确的临床预期用途。随着蛋白质及基因检测技术的发展,在临床上开发一种新的蛋白质或基因检测的产品对于相关体外诊断试剂生产企业而言并非难事。以蛋白质和基因检测为例,目前已知的能够编码蛋白质的基因有 19 000 个,更有大量的非编码基因^[3],这些蛋白质、基因检测临床意义不显著的前提下,针对其开发的相关产品,一般不符合创新产品条件。作为一个体外诊断试剂产品,尤其是一个创新体外诊断试剂产品,其标志物的检测结果应具有明确的预期用途,其预期用途可以为疾病的预测、预防、诊断、治疗监测、预后观察和健康状态评价等。

1.2 临床上已经广泛应用的生物标志物采用新的方法检测,且产品临床性能较已上市同类产品具有显著改善。随着科技的发展,越来越多的方法学可能被开发成相关产品,应用于临床检验。以基因检测为例,常规的方法学为聚合酶链式反应(PCR)法,当前越来越多的恒温扩增、杂交免疫捕获及基因编辑(CRISPR)^[4]等技术被用于产品开发。申请人以新技术开发产品,进行创新产品申报时应重点考虑,新技术在产品临床应用的优势,产品临床性能较已上市产品未具有显著改善的情况下,不符合创新产品要求。

1.3 临床已经广泛应用的生物标志物明确具有新的预期用途,在临床能够指导相关疾病诊治。所谓产品临床预期用途与产品的适用人群、适用场景及临床适应症相关。随着科技的发展以及相关疾病研究的深入,已有的生物标志物能够拓展适用人群、扩大临床适用场景或增加临床适应症,此部分研究可考虑具有创新性。如已有标志物适应症的改变,原有适用仅适用于 A 适应症,申报产品首次可适用于 B 适应症等,可作为产品申报创新

医疗器械的条件。

1.4 申报产品与已上市同类产品相比临床意义实现突破。产品的临床意义主要为疾病的预测、预防、诊断、治疗监测、预后观察和健康状态评价等,如申报产品因临床样本检测性能的提高,比如产品分析灵敏度的提高,或产品检测标志物研究的深入,使申报产品与已上市同类产品相比具有新的临床意义,此种情况可作为产品申报创新的条件。

2 临床试验对比方法介绍

体外诊断试剂临床试验是指在相应的临床环境中,对体外诊断试剂的临床性能进行确认的研究过程^[5]。根据临床试验的目的创新产品临床试验一般包括产品临床意义及临床样本检测准确性验证两部分内容。产品临床意义验证所选的对比方法一般是现有条件下临床上可获得的能够用来确定受试者目标状态的最佳方法,通常来自临床和实验室的医学实践,包括:现有条件下公认的、可靠的、权威的疾病诊断标准(如组织病理学检查、影像学检查、病原体分离培养鉴定、长期随访所得的结论等),疾病诊疗指南中明确的疾病诊断方法,行业内的专家共识或临床上公认的、合理的方法等。临床试验过程中针对临床样本中生物标志物检测的准确性研究,可选用临床上公认的某一生物标志物检测的方法作为对比方法,如对于基因检测产品而言,基因测序技术为该产品的临床参考方法^[5];针对蛋白质、激素、有机物检测产品而言,色谱、质谱技术为该产品的临床参考方法^[6];体外诊断试剂临床试验过程中,在尚无同类已上市产品情况下,可选择临床参考方法考察待考核试剂临床性能。

对于境内已有同类产品上市的体外诊断试剂,临床试验可采用试验用体外诊断试剂与已上市同类产品(对比试剂)进行比较研究的方法,评价两种方法检测结果的一致性,对比试剂在预期用途、适用人群、样本类型等方面应与试验用体外诊断试剂具有较好的可比性。

为了更加全面地评价体外诊断试剂的临床性能,临床试验中有时需要将多个对比方法相结合进行研究,对产品的临床性能进行综合评价,从而支持有关预期用途的所有声称内容。

3 对比方法选择及案例解析

创新体外诊断试剂因其新颖性导致该类产品的尚无同类产品或与同类产品相比临床应用方面存在显著优势。创新产品这一特点使该类产品在临床验证过程中,对比方法的选择存在一定的挑战。体外诊断试剂创新产品的创新点不同,因此,针对不同创新产品其临床设计存在差异。以下结合已批准的创新产品,对常见的几种创新体外诊断试剂临床试验对比方法的选择进行探讨。

3.1 待评价试剂检测标志物为全新标志物

该产品无已上市同类产品,检测的标志物为全新的生物标志物,标志物检测准确性及标志物检测结果的临床意义均需要确认。如检测的标志物临床上存在临床参考方法,临床试验对比方法应采用临床参考标准。

案例:人类 SDC2 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法),该产品适用于临床医生建议做肠镜检查的患者的辅助诊断,不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据,仅作为辅助诊断供临床医生参考,提供给患者更多一种大肠癌辅助诊断方法的选择。该产品临床试验包括三部分研究,一是,采用肠镜(和)或病理的等临床诊断结果为对照方法,评估考核试剂检测结果与临床诊断方法的一致性,此部分研究主要是对产品临床意义的确认,入组病例数量满足不低于 1 000 例的法规要求;二是,以测序法为对照方法,评估考核试剂对临床样本中 SDC2 基因甲基化的检测性能,此部分主要为产品临床样本检测性能的评估;三是,以短期跟踪随访为对照方法,评估考核试剂检测结果与直肠癌切除根治术前病理组织的一致性,同时评估针对术后阴性患者考核试剂检测的特异性,该部分研究为产品临床意义的补充确认。综上,针对首个用于 SDC2 基因甲基化检测产品,临床试验选择了不同临床参考标准作为对比方法,充分评估产品临床价值。

3.2 待评价试剂方法学为新方法学

该类产品的特点为相关生物标志物已有检测产品上市,且该标志物临床预期用途已明确,待评价产品的方法学为新的方法学。临床试验过程中应重点验证两方面内容,一方面为该新方法学临

床样本检测性能;另一方面为方法学的改变,是否会影响该标志物临床检测的预期用途。临床试验应选择临床参考标准结合已上市同类产品作为对比方法。

案例:利用二代测序技术检测肿瘤多基因的产品,预期用途为定性检测患者经福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织标本中突变基因,用于相关药物的伴随诊断。该产品临床试验过程中,针对产品临床样本检测准确性研究可采用临床参考标准(一代测序)或者已上市同类产品作为对比方法,准确性研究入组病例数量满足不低于 1 000 例的法规要求;针对产品伴随诊断用途的研究可采用临床参考标准(病例用药后药效学跟踪随访研究)结合已上市的具有伴随诊断用途的同类产品作为对比方法。在临床试验过程中同时对产品临床样本检测的准确性及伴随诊断用途的临床意义进行研究,证明相关产品临床应用的安全有效性。

3.3 待评价试剂检测流程的优化

此类创新产品,从标志物及方法学上均有已上市同类产品,其创新点在于优化了检测流程,减少了操作步骤或缩短了操作时间。该类产品的临床验证重在评估产品优化检测流程的同时,产品性能未发生降低,流程优化后的产品仍然满足临床需求。

案例:丙型肝炎病毒核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法),该产品创新点主要在于其优化了核酸提取步骤,临床试验采用考核试剂与已上市产品对临床样本进行比较研究试验的方法验证本产品的临床性能,入组总病例数满足不低于 500 例的法规要求。因丙肝核酸检测的临床意义已经明确,临床试验无需针对其临床意义进行验证。临床试验结果证明优化后产品检测结果与已上市同类产品检测结果一致,考核试剂能够满足临床需求。

3.4 根据病例的临床处置选择对比方法

针对一些创新产品,为了能够充分验证其临床性能,在产品临床试验过程中需考虑病例的临床处置情况,科学合理的选择对比方法。

案例:胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒(半导体测序法),该产品预期用途为定性检测试管婴儿过程中体外培养胚胎的囊胚滋养层细胞

的脱氧核糖核酸(DNA),通过对胚胎部分细胞的DNA进行检测,分析胚胎染色体是否存在非整倍体数量异常,辅助临床医生判断胚胎是否植入。该产品临床试验采用对照方法选择临床临床诊断参考方法^[7]。针对染色体非整倍体检测,其临床样本检测性能的参考方法为荧光原位杂交(FISH)方法,其临床意义的验证主要为羊水穿刺活检样本/脐带血核型分析。临床试验过程中,针对考核试剂检测结果为阴性的胚胎需植入母体,因此阴性胚胎无法进行荧光原位杂交(FISH)验证,仅能通过胚胎植入妊娠后胎儿核型分析方法(羊水穿刺活检样本/脐带血)确认,阴性且需经过对比方法确认的胚胎例数不低于500例;检测结果为阳性的胚胎无法植入母体,因此阳性胚胎不能通过胚胎植入妊娠后胎儿核型分析方法(羊水穿刺活检样本/脐带血)确认,只能通过荧光原位杂交(FISH)方法验证该样本临床检测的准确性,阳性胚胎例数能够满足统计学要求。该类产品通过临床参考方法与临床参考标准,结合病例的处置对产品临床性能进行了科学合理的评估。

4 总结

临床试验在创新体外诊断试剂产品评价过程中的作用毋庸置疑,相关产品在临床试验之前应找准自己的临床定位。一方面,申请人应在前期研究基础上明确产品临床定位,确定产品的预期用途,包括预期适用人群、临床适用场景及适用

症,根据产品的临床定位有针对性的开展临床试验,有针对性的验证产品临床预期用途,避免临床试验过程中走弯路;另一方面,申请人应充分了解相关适应症的临床诊疗现状、相关标志物检测的临床参考方法,在临床试验对比方法的选择上,综合考虑产品与现有诊断方法的异同,充分考虑各种影响因素,科学全面地评价产品临床性能。

参考文献

- [1] 中华人民共和国中央人民政府网站. 中共中央办公厅 国务院办公厅印发《关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械创新的意见》. (2017-10-08). http://www.gov.cn/xinwen/2017-10/08/content_523010_5.htm
- [2] 国家药品监督管理局网站. 关于发布创新医疗器械特别审查程序的公告(2018年第83号)[EB/OL]. (2018-11-05). <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/331560.html>.
- [3] 刘顺, 屈良鹤. 人类基因知多少[J]. 科学通报, 2017, 62(7): 619-625.
- [4] Gootenberg S, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [5] 马潞林, 宋一萌, 葛力源. 基因测序技术的发展与临床应用概述[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(4): 477-479.
- [6] 盛晓燕, 段京莉. 液相色谱-质谱/质谱联用技术在临床诊断和疾病筛查中的应用[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(8): 730-732.
- [7] 张宁媛, 黄国宁, 范立青, 等. 胚胎植入前遗传学诊断与筛查实验室技术指南[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(9): 819-827.

(上接第959页)

- [10] Li H, Yang DL, Ma L, et al. Risk Factors Associated with Adjacent Vertebral Compression Fracture Following Percutaneous Vertebroplasty After Menopause: A Retrospective Study [J]. Med Sci Monit, 2017, 23(5): 5271-5276.
- [11] 谢作棒, 沈皆亮, 郝杰, 等. 骨代谢生化指标对预测绝经后骨质疏松性椎体骨折的临床意义 [J]. 创伤外科杂志, 2018, 20(5): 32-35.
- [12] Xu J, Min Y, Jie Y, et al. Bone mass improved effect of icariin for postmenopausal osteoporosis in ovariectomy-induced rats: a meta-analysis and systematic review [J]. Menopause, 2016, 23(10): 1152-1157.
- [13] Lin A Y. Estradiol Level and Menopause [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(1): 120-125.
- [14] 李凝旭, 黄莺, 涂艳, 等. 绝经后女性骨密度与雌激素水平、免疫细胞因子和骨代谢指标的相关性研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(8): 1201-1204.
- [15] 赵国权, 罗春山, 陆廷盛, 等. 颈脊髓损伤后患者 P1NP 和 β -CTX 的研究分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(12): 1617-1620.
- [16] 王福斌, 陈剑明. β -CTX、P1NP 在绝经后女性骨质疏松性骨折风险中的评价作用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 11(9): 60-62.

PCT、CRP在肺炎支原体肺炎患儿中的表达及与MP-IgM抗体的关系

纵雪峰^{1*} 种丽芳² 刘道路³ 周桂荣¹

[摘要] 目的 探究降钙素原(PCT)、C反应蛋白(CRP)在肺炎支原体肺炎(MPP)患儿中的表达及与MP-IgM抗体的关系。方法 选取本院2016年5月至2019年5月肺炎患儿116例作为研究对象,其中MPP患儿82例作为观察组,病毒性肺炎34例作为对照组。检测对比两组血清PCT、CRP水平,采用受试者工作特征曲线(ROC曲线)及ROC下面积(AUC)血清PCT、CRP及联合检测对MPP与病毒性肺炎的鉴别诊断价值。对比不同MP-IgM抗体滴度患儿血清PCT、CRP水平, Spearman分析血清PCT、CRP与MP-IgM抗体滴度相关性。比较不同疗效患儿治疗前后血清PCT、CRP水平变化趋势。结果 观察组血清PCT、CRP、MP-IgM抗体水平高于对照组($P<0.05$);PCT诊断MPP的AUC为0.744,CRP诊断MPP的AUC为0.787,PCT+CRP诊断MPP的AUC为0.840($P<0.05$);血清PCT、CRP水平随MP-IgM抗体滴度增加呈不断升高趋势($P<0.05$);血清PCT、CRP与MP-IgM抗体呈正相关($P<0.05$);好转患儿治疗3、5、7d后血清PCT、CRP水平低于未好转患儿($P<0.05$)。结论 PCT、CRP在MPP患儿中表达明显升高,可作为诊断MPP与疗效评估的指标,且PCT、CRP表达与MP-IgM抗体有关。

[关键词] 降钙素原; C反应蛋白; 肺炎支原体; 肺炎; MP-IgM抗体; ROC

Expression of procalcitonin and C-reactive protein in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia and its relationship with MP-IgM antibody

ZONG Xuefeng^{1*}, ZHONG Lifang², LIU Daolu³, ZHOU Guirong¹

(1. Department of Pediatrics, Suixi County Hospital, Huaibei, Anhui, China, 235100; 2. Department of Laboratory Medicine, Suixi County Hospital, Huaibei, Anhui, China, 235100; 3. Department of Pediatrics, Suixi County Hospital, Huaibei, Anhui, China, 235100)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) and the relationship with MP-IgM antibody. Methods 116 patients with pneumonia in our hospital from May 2016 to May 2019 were selected as the research object, of which 82 cases of MPP children served as the observation group, and 34 cases of viral infectious pneumonia served as the control group. Serum PCT and CRP levels were compared between the 2 groups, the value of the receiver operating characteristic curve (ROC) curve and the area under the ROC (AUC) of serum PCT, CRP and combined detection was used for the differential diagnosis of MPP and viral infectious pneumonia. Comparing serum PCT and CRP levels in children with different MP-IgM antibody titers, Spearman was used to analyze the correlation between serum PCT, CRP and MP-IgM antibody

基金项目:淮北市科技局计划项目(20110316)

作者单位:1.安徽省濉溪县医院儿一科,安徽,淮北 235100

2.安徽省濉溪县医院检验科,安徽,淮北 235100

3.安徽省濉溪县医院儿二科,安徽,淮北 235100

*通信作者:纵雪峰, E-mail:13866895604@139.com

titors. The changes of serum PCT and CRP levels before and after treatment in children with different therapeutic effects were compared. **Results** Serum PCT, CRP and MP-IgM antibody levels in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$); the AUC for MPP diagnosis by PCT was 0.744, the AUC for MPP diagnosis by CRP was 0.787, and the AUC for MPP diagnosis by PCT+CRP was 0.840 ($P<0.05$). Serum PCT and CRP levels showed an increasing trend with increasing MP-IgM antibody titers ($P<0.05$); serum PCT, CRP and MP-IgM antibody were positively correlated ($P<0.05$); the levels of serum PCT and CRP in children who improved after treatment for 3, 5, and 7 days after treatment were lower than those who did not improve ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of PCT, CRP and MP-IgM antibodies is significantly increased in children with MPP, which can be used as an indicator for the diagnosis of MPP and the evaluation of therapeutic effects. The expression of PCT and CRP is related to MP-IgM antibodies.

[KEY WORDS] Procalcitonin; C-reactive protein; Mycoplasma pneumoniae; Pneumonia; MP-IgM antibody; ROC

肺炎支原体肺炎 (Mycoplasmal Pneumoniae Pneumonia, MPP) 系肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae, MP) 引起的肺炎, 是导致儿童住院的重要病因, 以咳嗽、发热等为主要表现, 可引起气胸、肺不张、呼吸窘迫等, 威胁患儿生命健康, 故早期明确诊断意义重大^[1]。从体液、胸水、鼻咽部、咽喉中分离出肺炎支原体是诊断 MPP 的金标准, 但 MP 培养需 2 周左右甚至更长时间, 不利于临床早期诊断。血清特异性试验是诊断 MPP 的重要方法, 其中 MP-IgM 抗体是 MPP 后出现的早期抗体, 在感染后可保持 1~3 个月甚至更长时间, 对急性期和恢复期肺炎支原体抗体滴度呈 4 倍以上增高时, 可确诊为 MPP, 但由于儿童免疫功能不完善, 产生抗体能力较低, 可能出现低滴度或假阴性抗体, 影响诊断结果准确性, 因此需结合其他综合考虑^[2]。C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是急性时相蛋白, 在机体创伤、细菌感染等中呈高表达^[3-4]。降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 在健康人外周血中浓度低于 0.05 ng/mL, 是诊断感染类疾病的敏感性指标^[5]。但在 MPP 患儿中的表达及与 MP-IgM 抗体的关系、与 MP-IgM 抗体联合是否能提高临床诊断价值尚不明确, 本研究对此进行探讨, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取本院 2016 年 5 月至 2019 年 5 月肺炎患儿 116 例作为研究对象, 其中 MPP 患儿 82 例作为观察组, 病毒感染性肺炎 34 例作为对照组。其中观察组女 42 例, 男 40 例, 平均年龄 (5.74±2.55) 岁, 平

均体重 (24.55±9.18) kg; 对照组女 18 例, 男 16 例, 平均年龄 (5.68±2.50) 岁, 平均体重 (25.16±9.01) kg。两组性别、年龄、体重等资料均衡可比 ($P>0.05$)。本研究入组儿童监护人均对研究内容知情, 自愿签署知情同意书。

纳入标准: ①符合 MPP 诊断标准^[6]; ②入组前未接受过相关治疗; ③年龄≥0.5 岁; ④无自身免疫疾病; ⑤入组前无其他系统并发症; ⑥发病至入院时间 3~7 d。排除标准: ①合并细菌、病毒感染; ②凝血功能障碍者; ③合并肺结核者; ④伴有上呼吸道等其他感染类疾病者; ⑤合并哮喘者; ⑥同时伴有过敏性疾病者。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

观察组给予阿奇霉素注射液 (东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 国药准字 H20000426) 10 mg/(kg·d), 5% 葡萄糖 1:1 比例配伍后静滴, 连用 5~7 d, 并根据患儿病情给予退热、营养支持、纠正电解质紊乱、呼吸支持等对症治疗, 静脉用药停止 (4 天) 后根据病情需要给予阿奇霉素片 (华北制药有限公司, 国药准字: H20090060) 10 mg/(kg·d), 口服, 1 次/d, 共给药 3 d。同时有明显咳嗽、喘息、肺不张及肺部炎症明显者, 给予布地奈德混悬液 (普米克令舒, H20140475) 雾化吸入, 1 mg/支, 1 支/次, 1~2 次/日, 共 7 d。

1.2.2 疗效评估^[6]

好转: 治疗后体温恢复正常, 咳嗽、喘息、头痛、胸闷等临床症状明显缓解, 胸部影像学提示无明显炎症或炎症吸收; 未好转: 治疗后体温未恢复正常, 临床症状未获明显改善, 胸部影像学仍见存

在炎症。

1.2.3 各指标检测

①主要试剂、仪器:PCT、CRP试剂盒(上海罗氏);MP-IgM试剂盒(上海美旋生物科技有限公司);全自动生化分析仪(法国ALCYON300型)。
 ②检测方法:分别于入院时、治疗3、5、7d后采集肘部静脉血,3 000 r/min离心10 min采用全自动生化分析仪及化学发光免疫层析法检测血清PCT、CRP水平,采用酶联免疫吸附法检测MP-IgM。

1.3 观察指标

①比较两组血清PCT、CRP水平。②统计血清PCT、CRP及联合检测对MPP与病毒性肺炎的鉴别诊断价值。③比较不同MP-IgM抗体滴度患儿血清PCT、CRP水平。④统计血清PCT、CRP与MP-IgM抗体相关性。⑤比较不同疗效患儿治疗前后血清PCT、CRP水平。

1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0统计学软件处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较以方差分析,两两比较以 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验,采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC)曲线及ROC下面积(Area under the curve, AUC)分析血清PCT、CRP、MP-IgM抗体及联合诊断MPP的效能,采用Spearman分析血清PCT、CRP与MP-IgM抗体的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清PCT、CRP、MP-IgM抗体水平

观察组血清PCT、CRP、MP-IgM抗体水平高于对照组($P < 0.05$),见表1。

表1 两组血清PCT、CRP比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of serum PCT and CRP between the 2 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	PCT (ng/mL)	CRP (mg/L)
观察组	82	0.76±0.20	22.79±5.13
对照组	34	0.52±0.13	10.18±1.05
<i>t</i> 值		6.447	14.176
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 观察组不同MP-IgM抗体滴度患儿血清PCT、CRP水平

观察组不同MP-IgM抗体滴度患儿血清PCT、

CRP水平相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清PCT、CRP水平随MP-IgM抗体滴度增加呈不断升高趋势,见表2。

表2 观察组不同MP-IgM抗体滴度患儿血清PCT、CRP水平 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Serum PCT and CRP levels of children with different MP-IgM antibody titers in the observation group $(\bar{x} \pm s)$

MP-IgM 抗体滴度	<i>n</i>	PCT (ng/mL)	CRP (mg/L)
1:80	24	0.60±0.14	17.80±4.13
1:320	33	0.75±0.16	22.41±4.69
1:1280	25	0.93±0.18	28.08±5.94
<i>F</i> 值		25.852	26.468
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 血清PCT、CRP与MP-IgM抗体相关性

Spearman相关性分析,血清PCT($r = 0.606, P < 0.001$)、CRP与MP-IgM($r = 0.645, P < 0.001$)抗体呈正相关。

2.4 血清PCT、CRP及联合检测对MPP与病毒性肺炎的鉴别诊断价值

根据血清PCT、CRP与MP-IgM抗体水平绘制ROC曲线,PCT诊断MPP的AUC为0.744,CRP诊断MPP的AUC为0.787,PCT+CRP诊断MPP的AUC为0.840($P < 0.05$),各指标对应的截断值、敏感度、特异度见图1、表3。

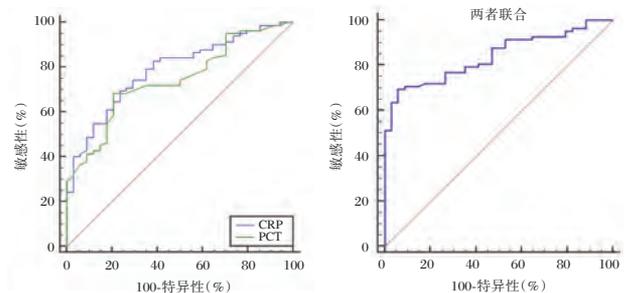


图1 血清PCT、CRP及联合检测对MPP与病毒性肺炎的鉴别诊断价值

Figure 1 The value of serum PCT, CRP and combined detection in the differential diagnosis of MPP and viral infectious pneumonia

2.5 观察组不同疗效患儿治疗前后血清PCT、CRP

治疗前,观察组不同疗效患儿入院时血清PCT、CRP相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);好转患儿治疗3d、治疗5d后、治疗7d后血清PCT、CRP水平低于未好转患儿($P < 0.05$),见表4。

表3 血清PCT、CRP及联合检测对MPP与病毒性肺炎的鉴别诊断价值

Table 3 The value of serum PCT, CRP and combined detection in the differential diagnosis of MPP and viral infectious pneumonia

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
PCT	0.744	0.654~0.820	5.185	>0.65 ng/mL	68.29	79.41	<0.001
CRP	0.787	0.701~0.857	6.553	>15.57 mg/L	69.51	76.47	<0.001
两者联合	0.840	0.760~0.901	9.525	-	69.51	94.12	<0.001

表4 观察组不同疗效患儿治疗前后血清PCT、CRP水平比较($\bar{x}\pm s$)Table 4 Comparison of serum PCT and CRP levels of children with different efficacy in the observation group before and after treatment ($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	n	入院时	治疗3d后	治疗5d后	治疗7d后
PCT(ng/mL)	好转患儿	67	0.75±0.21	0.26±0.07	0.18±0.05	0.13±0.03
	未好转患儿	15	0.80±0.24	0.34±0.10	0.35±0.09	0.32±0.07
	t值		0.812	3.680	10.089	20.421
	P值		0.419	<0.001	<0.001	<0.001
CRP(mg/L)	好转患儿	67	22.72±6.04	15.39±4.17	9.17±3.01	4.68±1.19
	未好转患儿	15	23.10±5.69	20.44±5.25	21.80±6.20	18.33±5.06
	t值		0.223	4.038	11.733	20.106
	P值		0.825	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

PCT定位于染色体11p15.4,转录后在甲状腺滤泡旁细胞粗面内质网内翻译成降钙素原前体,在内源多肽酶作用下生成PCT,生理状态下血液中几乎不能被检测到^[7]。而在细菌毒素、炎症因子等调节下,各组织器官几乎均能分泌PCT^[8]。本研究显示,观察组血清PCT高于对照组,提示MPP患儿PCT呈高表达。Neeser OL等^[9]报道显示,PCT在MPP患儿中呈高表达,对MPP具有较高的预测价值,本研究观点与之相似。MPP发生后,在MP刺激下,PCT被大量合成,且水平越高,提示感染程度越严重,是MPP患儿长时间发热和住院时间延长的危险因素^[10]。后续的ROC分析提示PCT可作为诊断MPP的一个血清学标志物。但PCT水平的升高见于多种情况,需结合临床情况进行判读,避免脱离患者具体评估,并应考虑假阴性和假阳性的可能性。同时本研究结果表明动态监测PCT水平可评估临床治疗效果。

CRP是一种血清β球蛋白,可激活补体、加强吞噬细胞的吞噬,在感染发生后6~8h即开始升高,一直是感染类疾病领域研究的热点指标,一般认为CRP增高,意味着机体存在一定程度的炎症反应^[11]。本研究显示,与正常儿童相比,MPP患儿

血清CRP水平较高,与赵波涛等^[12]报道一致,说明CRP与MPP有关,可能有助于MPP的诊断。故本研究进行了ROC分析,结果提示两者联合检测可靠性最高能为临床提供有价值的参考信息。毕颖薇等^[13]研究指出,MPP患儿病情改善的同时,伴有CRP表达的降低。

MPP发生后,可导致相应组织自身抗体的产生,形成免疫复合物,引起神经系统、胃肠道、心血管等肺外靶器官损伤,其中MP-IgM抗体是MP感染后刺激机体免疫系统产生的一种特异性抗体^[14]。目前实验室诊断MPP方法包括病原菌的分离和培养、血清学检查、PCR诊断技术,由于MP分离存在阳性率低、病原体含量少等不足,PCR检测操作繁琐,污染率高,所以现阶段主要采用MP血清MP-IgM检测。孙兰芳等^[15]报道显示,MPP患儿血清MP-IgM阳性率均明显高于健康儿童,佐证了MP-IgM抗体可诊断MPP。本研究不足之处在于,虽动态观察了不同时间点各指标疗效监测价值,但尚不明确各指标各时间点对疗效的量化评估价值,有待后续的进一步研究。

综上所述,PCT、CRP在MPP患儿中表达明显升高,可作为诊断MPP与疗效评估的指标,且PCT、CRP表达与MP-IgM有关。

(下转第973页)

miR-142-5p对癫痫发作后神经元损伤的作用机制

赵利 李海燕*

[摘要] 目的 探讨 miR-142-5p/APLN 对癫痫发作后神经元损伤的影响及其调控机制。方法 构建大鼠海马神经元癫痫模型,正常神经元细胞作为正常对照组,以此神经元细胞为癫痫细胞模型组。取癫痫大鼠神经细胞分为 anti-miR-142-5p 组(转染 anti-miR-142-5p)、anti-miR-con 组(转染 anti-miR-con)、miR-142-5p 组(转染 miR-142-5p mimics)、miR-con 组(转染 miR-con),NC 组(未经任何处理的细胞);anti-miR-142-5p+si-con 组(共转染 anti-miR-142-5p 与 si-con)、anti-miR-142-5p+si-APLN 组(anti-miR-142-5p 与 si-APLN)。qRT-PCR 与 Western blot 检测两组神经细胞中 miR-142-5p 与 APLN 的表达。ELISA 法检测 GSH 与 MDA 含量。流式细胞仪检测细胞凋亡能力变化。双荧光素酶报告基因鉴定 miR-142-5p 的靶基因。Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达。结果 miR-142-5p 在癫痫细胞模型组神经细胞中表达上调($P<0.05$)。干扰 miR-142-5p 表达后大鼠神经细胞中 GSH 含量明显增加,MDA 含量明显减少($P<0.05$),细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),Bax 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);双荧光素酶报告基因实验证明 miR-142-5p 可直接靶向结合 APLN;沉默 APLN 的表达可部分逆转干扰 miR-142-5p 的表达对大鼠癫痫神经细胞的保护作用。结论 干扰 miR-142-5p 表达可能上调 APLN 的表达抑制神经细胞凋亡从而减轻癫痫发作后神经元损伤。

[关键词] miR-142-5p; APLN; 癫痫; 神经元

Mechanism of miR-142-5p on neuronal damage after epilepsy

ZHAO Li, LI Haiyan*

(Department of Neurology, Anyang People's Hospital, Anyang, Henan, China, 455000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the effect of microRNA-142-5p (miR-142-5p)/Apelin (APLN) on neuronal damage after seizure and the mechanism. Methods The rat hippocampal neuron epilepsy model was constructed. Normal neuron cells were used as normal control group. Rat hippocampal neuron epilepsy model neuron cells were epilepsy cell model group. Nerve cells from epileptic rats were divided into anti-miR-142-5p group (transfected with anti-miR-142-5p), anti-miR-con group (transfected with anti-miR-con), and miR-142-5p group (Transfected miR-142-5p mimics), miR-con group (transfected miR-con), NC group (untreated cells); anti-miR-142-5p + si-con group (co-transfected anti-miR-142-5p and si-con), anti-miR-142-5p + si-APLN group (anti-miR-142-5p and si-APLN). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression of miR-142-5p and APLN in the two groups of neurons. The content of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Flow cytometry was used to detect the change of neuronal apoptosis ability in each group. The dual luciferase reporter gene identified the target gene of miR-142-5p. The expression of Bax, Bcl-2 and AKT signaling pathway-related proteins was detected by western blot. Results The expression of miR-142-5p was up-regulated in the neurons of the epileptic cell model group, and the difference was statistically significant compared with the normal control group ($P<0.05$). Significant increase

基金项目:河南省医学科技攻关计划(2018021009)

作者单位:安阳市人民医院神经内科,河南,安阳 455000

*通信作者:李海燕, E-mail:lihaiyan1718@163.com

in GSH content in rat neurons after interference with miR-142-5p expression, the MDA content was significantly decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was significantly decreased ($P<0.05$). The expression level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P<0.05$), the expression level of Bax protein was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of p-AKT and p-GSK3 β were significantly increased ($P<0.05$). The dual luciferase reporter gene assay demonstrated that miR-142-5p can directly target APLN. Silencing of APLN expression partially reversed the protective effect of miR-142-5p expression on rat epileptic neurons. **Conclusion** Interfering with miR-142-5p expression inhibits neuronal apoptosis and thus reduces neuronal damage after epileptic seizures by up-regulating the expression of APLN.

[KEY WORDS] miR-142-5p; APLN; epilepsy; neurons

癫痫属于慢性脑功能障碍性疾病,神经元细胞凋亡、神经再生、神经炎症及神经功能异常等均可导致癫痫的发生^[1-2]。已有报道指出微小RNA(miRNA)异常表达与癫痫发生及发展密切相关^[3]。微小RNA-142-5p(miR-142-5p)在大鼠癫痫模型中表达升高,但关于其具体作用机制尚未阐明^[4]。Apelin(APLN)是一种血管活性肽并可调控多种生物学过程,并可降低神经兴奋性缓解癫痫发作^[5]。利用TargetScan预测发现APLN可能是miR-142-5p的靶基因。因此,本研究主要探讨miR-142-5p在癫痫发作后神经元细胞损伤中的作用及其对PI3K/AKT信号通路的影响,并验证APLN是否为miR-142-5p的靶基因,为揭示癫痫发病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠神经元细胞购自上海康朗生物科技有限公司。胎牛血清、RPMI 1640培养基、胰蛋白酶均购自美国Sigma公司;蛋白提取试剂盒、反转录试剂盒、RNAisoPlus反转录试剂盒与实时荧光定量PCR试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司;兔抗鼠APLN抗体购自美国Abcam公司;兔抗鼠Bcl-2、Bax、 β -actin单克隆抗体均购自上海赛信通生物试剂有限公司;miR-142-5p抑制剂(anti-miR-142-5p)(AAAGAGACCGGUUCACGUGA)、miR-142-5p抑制剂的阴性对照anti-miR-con(CAGUACUUUUGUGUAGUACAA)、miR-142-5p模拟物(mimics)(UCACGUGAACCGGUCUCUUU)、miR-142-5p过表达的阴性对照miR-con(UUCUCCGAACGUGUCACGUUU)均购自百奥迈科生物技术有限公司;Lipofectamine2000转染试剂购自上海阳光生物科技有限公司;APLN小干扰RNA(si-APLN)(AGGGAGGTCGGAGGAAAUU)、乱序无

意义阴性对照序列(si-con)(CAGUAAUUUAUGCAAAGCA)均购自上海吉玛制药技术有限公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司;HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自美国Santa Cruz公司;GSH与MDA ELISA检测试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建大鼠海马神经元癫痫模型

正常维持液内培养大鼠海马神经元,14 d后弃掉原维持液,用低镁细胞外液清洗,随后用低镁外液培养(每孔2 mL),参照相关文献构建大鼠海马神经元癫痫模型^[6],根据氧化应激水平升高预示模型构建成功。将未经处理的正常神经元细胞作为正常对照组,同时将大鼠海马神经元癫痫模型大鼠神经元细胞为癫痫细胞模型组。

1.2.2 细胞转染及分组

收集处于对数生长期癫痫大鼠神经细胞分为anti-miR-142-5p组(转染anti-miR-142-5p)、anti-miR-con组(转染anti-miR-con)、miR-142-5p组(转染miR-142-5p mimics)、miR-con组(转染miR-con),NC组(未经任何处理的细胞);anti-miR-142-5p+si-con组(共转染anti-miR-142-5p与si-con)、anti-miR-142-5p+si-APLN组(anti-miR-142-5p与si-APLN),参照Lipofectamine2000转染试剂盒进行操作。转染6 h更换含有10%胎牛血清及双抗的RPMI 1640完全培养基,继续培养48 h后收集细胞。

1.2.3 qRT-PCR检测细胞中miR-142-5p、APLN mRNA表达水平

取各组神经元细胞,按照Trizol试剂提取细胞总RNA,参照反转录试剂盒合成cDNA,根据实时荧光定量PCR试剂盒说明书检测miR-142-5p、APLN mRNA相对表达量。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-

142-5p、APLN mRNA 相对表达量。miR-142-5p 正向引物 5'-AACGATACAGAGAAGATT-3', 反向引物 5'-GGAACGCTTCACGAAT-3'; APLN 正向引物 5'-GGAACGATACAGAGAAGATT-3', 反向引物 5'-GGAACGCTTCACGAAT-3'。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 APLN、Bax、Bcl-2 蛋白表达

用蛋白裂解液裂解各组神经元细胞,离心细胞后提取细胞总蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜,封闭 1 h,加入蛋白一抗稀释液,4℃ 孵育 24 h 后加入二抗稀释液(1:5 000),滴加 ECL 显影,置于凝胶成像系统成像,观察蛋白条带灰度值。

1.2.5 检测 GSH 与 MDA 含量

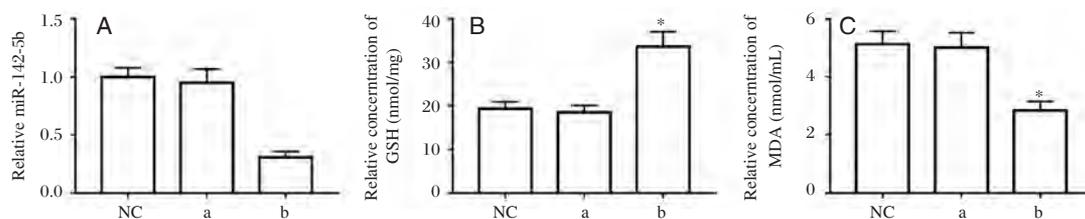
取各组神经元细胞,胰蛋白酶消化细胞,4℃ 条件下,3 000 r/min 转速离心 10 min(离心半径 5 cm),吸取 1 mL 上清液利用 ELISA 检测 GSH 与 MDA 含量,同时需绘制标准品线性回归曲线,根据曲线方程计算样本中 GSH 与 MDA 浓度值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集转染 48 h 后各组癫痫大鼠神经细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 洗涤,加入 Binding Buffer 200 μ L 重悬细胞,依次分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 与 PI,充分混匀后置于室温下避光孵育 15 min,加入 300 μ L Binding Buffer,利用流式细胞仪检测各组神经细胞凋亡情况。

1.2.7 荧光素酶报告基因检测

TargetScan 预测 miR-142-5p 的靶基因可能是 APLN,构建野生型载体 APLN-WT、突变型载体 APLN-MUT,取对数生长期癫痫大鼠神经细胞共转染 APLN-WT(100 ng)与 miR-142-5p mimics 或 miR-con,共转染 APLN-MUT 与 miR-142-5p mimics 或 miR-con,继续培养 48 h,根据双荧光素酶报告基因试剂盒说明书检测各组细胞荧光素酶活性值。



注:与 anti-miR-con 组比较,* $P < 0.05$ 。a 为 anti-miR-con; b 为 anti-miR-142-5p

图2 检测大鼠神经细胞中 GSH、MDA 含量(48 h)

Figure 2 Detection of GSH and MDA in rat nerve cells (48 h)

1.3 统计学处理

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

2 结果

2.1 miR-142-5p 和 APLN 在大鼠癫痫神经细胞中的表达

NC 组与癫痫细胞模型组大鼠神经细胞中 miR-142-5p 的表达水平分别为(1.03 \pm 0.11)、(4.28 \pm 0.37); APLN mRNA 的表达水平分别为(1.03 \pm 0.21)、(0.62 \pm 0.06); APLN 蛋白相对表达量分别为(0.54 \pm 0.06)、(0.28 \pm 0.04),NC 组与癫痫细胞模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

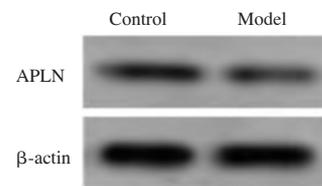


图1 Western blot 检测大鼠癫痫神经细胞 APLN 蛋白表达
Figure 1 Western blot analysis of APLN protein expression in rat epilepsy neurons

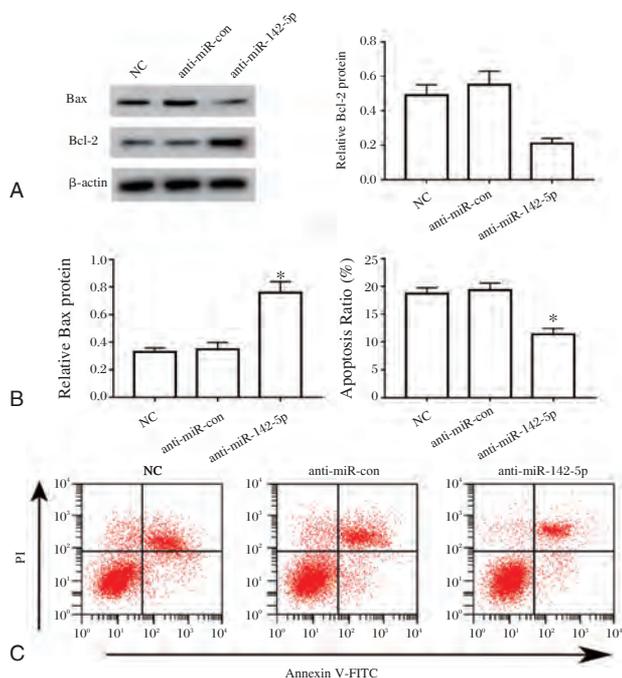
2.2 大鼠神经细胞干扰 miR-142-5p 表达对大鼠癫痫神经细胞氧化应激参数 GSH 和 MDA 含量的影响

相较于 NC 组、anti-miR-con 组,anti-miR-142-5p 组大鼠神经细胞中 GSH 含量明显增加,而 MDA 含量明显减少($P < 0.05$),见图 2。

2.3 干扰 miR-142-5p 表达对大鼠癫痫神经细胞凋亡的影响

anti-miR-142-5p 组癫痫大鼠神经细胞凋亡率与 NC 组、anti-miR-con 组比较差异有统计学意义

(图 3D、3E) ($P < 0.05$), 进一步检测发现 anti-miR-142-5p 组癫痫大鼠神经细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 NC 组、anti-miR-con 组 ($P < 0.05$), 而 Bax 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$) (图 3A、3B、3C)。



注: A-与 anti-miR-con 组比较, $^*P < 0.05$ 。C: Western blot 检测大鼠癫痫神经细胞 Bax 和 Bcl-2 表达; D-E: 流式细胞仪检测神经细胞凋亡率。

图 3 干扰 miR-142-5p 表达后对大鼠癫痫神经细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of interference with miR-142-5p expression on apoptosis of rat epileptic neurons

2.4 miR-142-5p 靶向 APLN

靶基因预测结果显示 APLN 是 miR-142-5p 的靶基因, 见图 4A。双荧光素酶报告基因实验显示, 共转染 APLN-WT 与 miR-142-5p mimics 后, 癫痫大鼠神经细胞荧光素酶活性较转染 miR-con 组明显下降 ($P < 0.05$), 而共转染 APLN-MUT 与 miR-142-5p mimics 后, 癫痫大鼠神经细胞荧光素酶活性较转染 miR-con 组无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。转染 miR-142-5p mimics 后, 癫痫大鼠神经细胞中 APLN 蛋白的表达水平较转染 miR-con 组降低 ($P < 0.05$), 而转染 anti-miR-142-5p 后, 癫痫大鼠神经细胞中 APLN 蛋白的表达水平较转染 anti-miR-con 组升高 ($P < 0.05$), 见图 4B、表 2。

2.5 沉默 APLN 部分逆转干扰 miR-142-5p 对大鼠癫痫神经细胞的保护作用

如图 5、表 3 所示, 共转染 anti-miR-142-5p 与

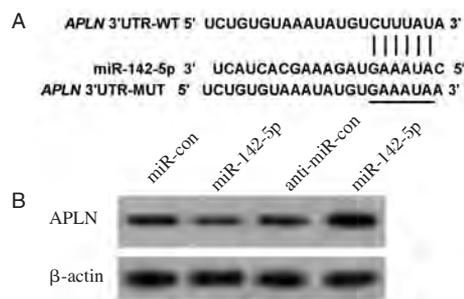


图 4 miR-142-5p 与 APLN 靶向序列和调控 APLN 蛋白表达

Figure 4 miR-142-5p and APLN targeting sequences and regulation of APLN protein expression

表 1 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Dual luciferase reporter experiment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

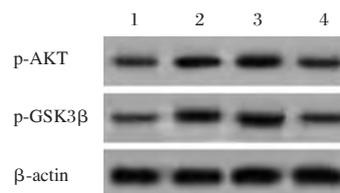
分组	APLN-WT	APLN-MUT
miR-con	1.00±0.12	0.96±0.09
miR-142-5p	0.47±0.06	1.17±0.12
<i>t</i> 值	6.842	2.425
<i>P</i> 值	0.002	0.072

表 2 miR-142-5p 调控 APLN 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 miR-142-5p regulates the expression of APLN protein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	APLN 蛋白
miR-con	0.61±0.08
miR-142-5p	0.34±0.05
anti-miR-con	0.64±0.07
anti-miR-142-5p	0.92±0.08
<i>F</i> 值	33.401
<i>P</i> 值	0.000

si-APLN 后, 癫痫大鼠神经细胞凋亡率较共转染 anti-miR-142-5p+si-con 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bax 蛋白表达水平升高, 而 Bcl-2 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 1. anti-miR-con; 2. anti-miR-142-5p; 3. anti-miR-142-5p+si-con; 4. anti-miR-142-5p+si-APLN。

图 5 Western blot 检测大鼠癫痫神经细胞 Bax 和 Bcl-2 表达

Figure 5 Western blot analysis of Bax and Bcl-2 expression in rat epileptic neurons

表3 沉默 APLN 部分逆转干扰 miR-142-5p 对大鼠癫痫神经细胞 APLN、Bax 和 Bcl-2 的表达以及细胞凋亡率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of silencing APLN partial reversal of miR-142-5p on the expression of APLN, Bax and Bcl-2 and apoptosis rate in rat epileptic neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	APLN	Bax	Bcl-2	凋亡率(%)
anti-miR-con	0.39±0.04	0.64±0.06	0.27±0.03	19.35±1.13
anti-miR-142-5p	0.79±0.08	0.36±0.04	0.59±0.06	12.37±0.89
anti-miR-142-5p+si-con	0.83±0.07	0.33±0.03	0.56±0.07	11.41±1.08
anti-miR-142-5p+si-APLN	0.61±0.06	0.51±0.06	0.35±0.05	15.38±0.97
F 值	29.358	25.485	24.832	36.699
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表4 APLN 和 miR-142-5p 表达对大鼠癫痫神经细胞 AKT 信号通路相关蛋白 p-AKT 和 p-GSK3 β 的表达
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Expression of APLN and miR-142-5p on AKT signaling pathway-associated proteins p-AKT and p-GSK3 β in rat epileptic neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-AKT	p-GSK3 β
anti-miR-con	0.44±0.05	0.31±0.05
anti-miR-142-5p	0.67±0.08	0.69±0.08
anti-miR-142-5p+si-con	0.71±0.07	0.72±0.07
anti-miR-142-5p+si-APLN	0.52±0.06	0.46±0.05
F 值	11.058	28.000
P 值	0.003	0.000

3 讨论

miR-142-5p 在动脉粥样硬化组织中呈高表达,其可通过抑制靶基因转化生长因子 β 2(TGF- β 2)表达进而诱导人巨噬细胞凋亡^[7]。miR-142-5p 通过靶向 Utk1 进而破坏猪血凝性脑脊髓炎病毒感染的神经元形态^[8]。本研究结果表明癫痫细胞模型组神经细胞中 miR-142-5p 的表达水平显著升高,干扰 miR-142-5p 表达后癫痫大鼠神经细胞氧化应激指标 GSH 含量显著升高,而 MDA 含量显著降低。GSH 属于抗氧化系统酶类,而 MDA 属于氧化系统酶类,氧化系统与抗氧化系统失衡可促使脑组织或细胞损伤^[9]。提示干扰 miR-142-5p 表达可通过抑制神经细胞氧化应激反应进而减缓神经元损伤程度。Bcl-2 可抑制细胞凋亡,而 Bax 可促进细胞凋亡^[10]。本研究结果发现,干扰 miR-142-5p 表达后,癫痫大鼠神经细胞中 Bcl-2 表达水平明显升高,而 Bax 表达水平显著降低。提示干扰 miR-142-5p 表达可通过减轻神经细胞氧化应激反应及抑制细胞凋亡进而减缓癫痫大鼠神经元损伤。

APLN 可在多种组织中表达,并可参与氧化应激、炎症反应及心肌缺血再灌注损伤等多种生理病理过程^[11]。APLN 可作为内源性神经保护因子,并可在神经元遭受兴奋性毒性损伤时发挥抗神经细胞凋亡的作用^[12]。与上述研究结果相似,本研究结果表明癫痫细胞模型组中神经细胞中 APLN 的表达水平明显降低,进一步证实 miR-142-5p 可负向调控靶基因 APLN 表达,anti-miR-142-5p 与 si-APLN 共转染癫痫大鼠神经细胞后,细胞凋亡率明显增加。提示干扰 miR-142-5p 表达可通过上调 APLN 表达进而对癫痫发作后神经元损伤发挥保护作用。

综上所述,干扰 miR-142-5p 表达可能通过调控 APLN 的表达进而抑制癫痫发作后神经细胞凋亡,并可能通过抑制神经细胞氧化应激反应进而对神经元损伤发挥保护作用,其可能通过激活 AKT 信号通路而发挥作用,为进一步研究 miR-142-5p 在癫痫发病过程中的作用机制奠定理论基础,为临床诊断及治疗提供一定依据。

参考文献

- [1] 肖昌琼,陈碧,黄晓亮,等. CYP2C19 基因多态性与苯妥英钠治疗癫痫疗效的关系[J]. 中华生物医学工程杂志, 2014, 20(5):389-392.
- [2] Tiwari D, Peariso K, Gross C. MicroRNA-induced silencing in epilepsy: Opportunities and challenges for clinical application[J]. Dev Dyn, 2018, 247(1):94-110.
- [3] Aksoy-Aksel A, Zampa F, Schrat G. MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship[J]. Philos Trans R Soc B Biol Sci, 2014, 369(1652):20130515-20130526.
- [4] Kretschmann A, Danis B, Andonovic L, et al. Different MicroRNA Profiles in Chronic Epilepsy Versus Acute Seizure Mouse Models[J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(2):466-479.
- [5] 董晗. miR-182/124-APLN 对癫痫发作后神经元损伤调控机制研究[D]. 吉林大学, 2017:1-107.

- [6] 苏婕, 吴原, 吴月娟, 等. 体外培养癫痫细胞模型中整合素 $\alpha 2$ 表达的变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2011, 37(8):482-485.
- [7] 李玉东, 杨清泉, 张明磊, 等. miR-142-5p 靶向调控 TGF- $\beta 2$ 促进人巨噬细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(5):475-479.
- [8] Li Z, Lan Y, Zhao K, et al. miR-142-5p Disrupts Neuronal Morphogenesis Underlying Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Infection by Targeting Ulk1 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7(1):155-165.
- [9] 林恒州, 张猛, 陈保东, 等. 大鼠中度液压颅脑损伤后氧化应激反应实验研究[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2015, 1(1):7-10.
- [10] 李杨, 王聚信, 赵姗姗, 等. 褪黑素抑制新生大鼠脑缺血缺氧损伤后海马内 Bcl-2/Bax 的下调和 caspase-3 的活化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(3):216-222.
- [11] Faraji Shahrivar F, Badavi M, Dianat M, et al. Exogenous apelin changes alpha and beta myosin heavy chain mRNA expression and improves cardiac function in PTU-induced hypothyroid rats[J]. *Gene*, 2016, 595(1):25-30.
- [12] Cook DR, Gleichman AJ, Cross SA, et al. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury[J]. *J Neurochem*, 2011, 118(6):1113-1123.

(上接第 967 页)

参考文献

- [1] Wu H, Ding X, Zhao D, et al. Effect of montelukast combined with methylprednisolone for the treatment of mycoplasma pneumoniae[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(6):2555-2561.
- [2] Chen A, Song L, Chen Z, et al. Immunoglobulin M profile of viral and atypical pathogens among children with community acquired lower respiratory tract infections in Luzhou, China [J]. *BMC Pediatr*, 2019, 19(1):280.
- [3] 王宝, 孙媛, 宋康, 等. 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1):39-43.
- [4] 杨韵鸥, 李昕睿, 丁丁, 等. 冠心病患者血清镁离子浓度与冠状动脉狭窄程度研究[J]. 华南预防医学, 2015, 41(3):201-206.
- [5] Cheng Z, Yang YJ, Jing XG, et al. Diagnostic value of HBP, PCT combined with APACHE II score respectively in ventilator-associated pneumonia[J]. *Natl Med J China*, 2019, 99(22):1698-1702.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17):1304-1308.
- [7] Stockmann C, Ampofo K, Killpack J, et al. Procalcitonin Accurately Identifies Hospitalized Children With Low Risk of Bacterial Community-Acquired Pneumonia [J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2018, 7(1):46-53.
- [8] Zhou Q, Zhang L, Wang X, et al. Clinical efficacy of nutrition support therapy combined with antibiotics in the patients of community-acquired pneumonia and its influence on serum pct and crp [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32(5(Special)):2477-2480.
- [9] Neeser OL, Vukajlovic T, Felder L, et al. A high C-reactive protein/procalcitonin ratio predicts Mycoplasma pneumoniae infection [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(10):1638-1646.
- [10] Jeong JE, Soh JE, Kwak JH, et al. Increased procalcitonin level is a risk factor for prolonged fever in children with Mycoplasma pneumoniae [J]. *Korean J Pediatr*, 2018, 61(8):258-263.
- [11] Alcoba G, Keitel K, Maspoli V, et al. A three-step diagnosis of pediatric pneumonia at the emergency department using clinical predictors, C-reactive protein, and pneumococcal PCR [J]. *Eur J Pediatr*, 2017, 176(6):815-824.
- [12] 赵波涛. 化学发光法检测支原体肺炎患儿降钙素原和 C-反应蛋白的水平变化[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(20):2461-2463, 2466.
- [13] 毕颖薇, 王红, 王未, 等. 环酯红霉素对支原体肺炎临床症状改善情况、免疫球蛋白水平变化及作用机制分析[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(17):1295-1298.
- [14] Montagnani F, Rossetti B, Vannoni A, et al. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections: data analysis from clinical practice [J]. *New Microbiol*, 2018, 41(3):203-207.
- [15] 孙兰芳, 刘德山, 于海涛. 肺炎支原体快速培养及血清抗体检测在儿童支原体肺炎早期诊断中的价值[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 43(1):107-109, 113.

非编码RNA在类风湿关节炎中的研究进展

陈宇婷¹ 李琼¹ 隋础阳¹ 接力刚³ 毋静³ 杜红延^{2*}

[摘要] 随着研究的深入,基因表达过程所受的关注已不仅仅局限在“DNA-mRNA-蛋白质”。长久以来被忽略的非编码RNA(non-coding RNA, nc RNA)在基因表达过程中所发挥的调控作用逐渐被发现,其广泛参与人体生理、病理过程的调节。类风湿关节炎(RA)是一种自身免疫性疾病,影响其发生发展的因素很多,目前尚未明确,但越来越多的研究发现部分非编码RNA在RA发病过程中出现差异表达并产生显著影响。本篇综述主要总结了近年来研究发现的在RA中表达异常的微小RNA(miRNA)、长链非编码RNA(lncRNA)、环状RNA(circRNA)以及它们参与RA可能的调控机制。

[关键词] 非编码RNA; 微小RNA; 长链非编码RNA; 环状RNA; 类风湿关节炎

Research Progress of Non-coding RNA in Rheumatoid Arthritis

CHEN Yuting¹, LI Qiong¹, SUI Chuyang¹, JIE Ligang³, WU Jing³, DU Hongyan^{2*}

(1. First College of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 2. School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510515; 3. Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, China, 510282)

[ABSTRACT] With the deepening of research, the attention that the gene expression process has received is not limited to “DNA-mRNA-protein”. The long-neglected non-coding RNA (ncRNA) played a regulatory role in the gene expression process, which was gradually discovered, and widely involved in the regulation of human physiological and pathological processes. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease. The factors that affect RA's pathogenesis and development remain unclear. However, more and more studies have found that some ncRNAs are differentially expressed during the pathogenesis of RA and have significant impact. This review summarizes the microRNAs (miRNAs), long noncoding RNAs (lncRNAs) and circular RNAs (circRNAs) that have been differentially expressed in RA and their possible regulatory mechanisms in recent studies.

[KEY WORDS] Noncoding RNA; MicroRNA; Long noncoding RNA; Circular RNA; Rheumatoid Arthritis

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,可引发关节软骨和骨的进行性破坏,难以有效治疗,且目前机制尚未明确^[1]。非编码RNA(nc RNA)是一类不编码蛋白质的RNA,包括微小RNA(microRNA, miRNA)、

长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)等。2008年,Stanczyk等^[2]揭示了RA中miRNA表达水平的显著变化。随后研究发现可能与RA患者炎症关节和外周血循环中某些miRNA失调有关^[3]。

基金项目:国家自然科学基金(81601397, 81102688);广东省自然科学基金(2016A030313624)

作者单位:1. 南方医科大学第一临床医学院,广东,广州 510515

2. 南方医科大学检验与生物技术学院,广东,广州 510515

3. 南方医科大学第二临床医学院(珠江医院)风湿免疫科,广东,广州 510282

*通信作者:杜红延, E-mail: dhy48321@smu.edu.cn

circRNA 可以充当“miRNA 海绵”, 隔离目标 miRNA, 阻止其调节其它内源靶基因^[4]。circRNA 也可以与 RNA 结合蛋白相互作用, 调节基因转录^[5]。另外, 越来越多的证据表明 lncRNA 在免疫功能和自身免疫的调节中起着关键作用, lncRNA 的表达变化对 RA 的发生发展具有重要意义^[6]。近年来, 非编码 RNA 在类风湿关节炎的发病发展过程中的表达量变化、调节功能和作用机制受到越来越广泛的关注, 本文就近年来 nc RNA 在 RA 进展中的作用研究进行综述, 有望对 RA 发病机制的揭示提供参考和借鉴。

1 miRNA 概况

miRNA 是一类长度约为 21-25 个核苷酸的短链非编码 RNA, 对转录起负调节作用^[7]。miRNA 可以对 mRNA 进行靶向切割或翻译抑制, 从而在多细胞生物中发挥重要的基因调控作用^[8]。大多数 miRNA 基因首先由 RNA 聚合酶 II (pol II) 转录, 产生初级 miRNA (pri-miRNA)^[9], pri-miRNA 由被称为微蛋白处理器的 Drosha-DGCR8 复合物在细胞核内进行底物识别和催化反应。在成熟的 miRNA 选择性地加载到 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC) 后, 通过已知的 7 至 8 个核苷酸长度的序列将复合物导向靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (UTR), 随后的 mRNA 降解或翻译抑制^[10]。

1.1 miR-410-3p 调节 FLS 的增殖和凋亡

RA 患者的滑膜和成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 中 miR-410-3p 的水平降低。通过瞬时转染使 FLS-RA 中 miR-410-3p 过表达发现 miR-410-3p 的上调可抑制 FLS 的生长增殖, 而加入 miR-410-3p 干扰片段下调其表达则促进了 FLS-RA 的增殖。另外, miR-410-3p 可促进 FLS-RA 的凋亡并促进其细胞周期从 G1 期向 S 期的转变^[11]。YY1 基因与细胞活力有关, 其过表达在包括乳腺癌^[12]、胃癌^[13]、大肠癌^[14]等多种癌症中被发现。同样测得 YY1 在 RA 患者滑膜组织中高表达, 且被证实 miR-410-3p 可与 YY1 基因在 3'UTR 区结合, 而加入 miR-410-3p 干扰片段后 YY1 的 mRNA 及蛋白质水平均增加。以上研究结果提示 miR-410-3p 通过靶向 YY1 抑制 FLS-RA 增殖, 促进其凋亡及 G1-S 相变。

1.2 miR-124a 低表达促进白细胞趋化

比较来自 RA 患者与骨关节炎 (osteoarthritis,

OA) 患者的 FLS 中的 miRNA 表达谱, 发现 miR-124a 在 RA-FLS 中显著下调^[15]。而且, 体外实验表明, RA-FLS 中 miR-124a 的过表达可以通过靶向 PIK3/Akt/NF- κ B 途径诱导 G1 期细胞周期的停滞从而抑制 RA-FLS 的增殖, 抑制 RA-FLS 对 TNF- α 、IL-6 等细胞炎症因子的产生和分泌^[16]。在 miR-124a 诱导下, 单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的表达也被抑制^[17]。MCP-1 属于趋化因子的 CC 亚族, 在 RA 患者的滑膜组织和滑液中高表达, 并通过对单核吞噬细胞向关节的募集参与 RA 发病机制。该结果提示 RA 发病期间 miR-124a 的低水平表达可通过上调 MCP-1 的表达促进白细胞的趋化, 对 RA 的发生发展起重要作用。

1.3 miR-29b 高表达抵抗细胞凋亡

RA 患者的外周血单核细胞 (PBMC) 中 miR-29b 的表达显著上调, 且这种上调与 RA 疾病活动相关, 提高 miR-29b 的表达可以增加 PBMC 对自发或 Fas 诱导的凋亡的抵抗^[18]。另外, miR-29b 的过表达促进 PBMC 促炎细胞因子的产生, 如 TNF- α 、IL-1、IL-6, 这些细胞因子可将更多的白细胞募集到炎症关节, 引起急性期反应并诱导软骨损伤, 而促炎反应的失调在 RA 的进展中起关键作用^[19]。HBPI (high-mobility group box-containing protein 1, HBPI) 是一种与细胞凋亡相关的转录因子, 参与多个细胞进程, 包括终末分化, 衰老诱导和肿瘤抑制^[20]。在 PBMC 中, miR-29b 高表达在转录和翻译上均抑制 HBPI 的表达, 并且证实了 miR-29b 与 HBPI 的 3'-UTR 直接结合。反过来, HBPI 的稳定表达又可以抵消 miR-29b 表达对分化的 THP-1 细胞的抗凋亡作用。因此, miR-29b 至少部分地通过 HBPI 信号的负调节来介导 miR-29b 对 PBMC 凋亡抗性的增强^[18]。

1.4 miR-145-5p 调节 MMP 表达促进 RA 骨损伤

RA 患者 PBMC 和滑膜组织中的 miR-145-5p 表达水平显著上调, miR-145-5p 的过表达增加了 RA-FLS 中 MMP-3, MMP-9 和 MMP-13 的表达。在正常的生理过程中, 关节软骨基质蛋白的合成和降解处于动态平衡状态。然而, RA 患者滑膜液和外周血中各种 MMP 的水平升高, 导致基质蛋白的过度降解, 平衡被破坏, 关节软骨被侵蚀和破坏, 关节完整性逐渐丧失。另外, miR-145-5p 增加了 p65 的磷酸化水平和核转位, 同时显著降低了 I κ B- α 的水平, 提示 miR-145 可以通过靶向激活 NF- κ B 途径来促进 RA 患者 MMP-9 水平的升高, 从而加速骨侵蚀

的进程,增加 RA 患者的疾病严重程度^[21]。

2 lncRNA 概况

lncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的长链非编码调节 RNA,其主要功能之一是在多个步骤中调节特定基因表达,包括基因转录机制的募集和表达,转录后修饰和表观遗传学。lncRNA 可以显示复杂的二级和三级结构,与基因组 DNA 元件结合,例如基因启动子区域,并调节基因转录;可以与其他 RNA 结合并参与 mRNA 剪接、编辑、亚细胞分布和稳定性的调节;部分 lncRNA 具有短开放阅读框(ORF),具有编码肽链的能力;还可以作为催化性 RNA(核酶)^[22]。

2.1 lnc-ITSN1-2 表达增加影响 RA 活动性

与正常 FLS 相比,RA-FLS 中 lnc-ITSN1-2 表达增加,已有研究证明 lnc-ITSN1-2 与疾病活动性及进展相关。最近的研究证明敲低 lnc-ITSN1-2 基因可以抑制 RA-FLS 增殖,促进其凋亡,同时,抑制了 RA-FLS 分泌 INF- γ 、TNF- α 、IL-17 等细胞炎症因子,增加了 IL-10,即减轻了 RA-FLS 炎症^[23]。NOD2 是一种细胞内的模式识别受体,在树突状细胞、巨噬细胞等细胞中大量表达,是 Toll 样受体(TLRs)家族的重要一员。在自身免疫和炎性疾病如克罗恩氏病和皮炎中,NOD2 在先天和适应性免疫应答中起重要调节作用,与炎症进展密切相关。lnc-ITSN1-2 与 NOD2 的表达呈正相关。lnc-ITSN1-2 敲低通过介导 RA-FLS 中的 NOD2/RIP2 信号传导途径抑制细胞增殖、炎症,同时促进细胞凋亡。

2.2 lncRNA HIX003209 显著增加促进 RA 炎症进展

RA 患者的 PMBC 和 CD14⁺单核巨噬细胞中的 lncRNA HIX003209 表达升高。而且 PMBC 中 lncRNA HIX003209 的表达与 CRP,ESR 和 RF 之间存在正相关,提示与疾病活动相关。同时,在 RA 中 lncRNA HIX003209 的表达与 TLR2 和 TLR4 正相关。TLRs 及其下游通路,如 MAPK、Wnt、NF- κ B 等,在 RA 滑膜炎反应及骨重塑中的作用已经被证实^[24],提示 lncRNA HIX003209 经 TLR2/TLR4 途径,通过提高巨噬细胞炎症反应而参与 RA 发病。另外,lncRNA HIX003209 还通过 NF- κ B 途径提高巨噬细胞的增殖和活化。更重要的是,lncRNA HIX003209 可以通过有效结合 miR-6089 来充当竞争性内源性 RNA,从而恢复巨噬细胞中 TLR4 的

表达和下游信号分子 NF- κ B 的激活^[25]。

2.3 Hotair 在不同部位出现不同表达水平

在 RA 患者的 PMBC 和血浆外泌体中,Hotair 的表达水平显著升高,引导活化巨噬细胞的迁移。在分化的破骨细胞和 RA-FLS 中检测到较低水平的 Hotair,而 Hotair 的高表达导致 MMP-2 和 MMP-13 水平显著下调^[26]。Zhang 等^[27]研究发现 Hotair 通过抑制 LPS 诱导的软骨细胞中 miR-138 介导的 NF- κ B 信号传导的激活,起到软骨保护的作用。并且体内、外研究均表明 Hotair 的过表达可通过增加细胞增殖和炎症抑制对 RA 起到保护作用。而最近有研究建立了由 Hotair 介导的调节 MMP-13 表达的 Wnt/ β -catenin 途径的动态网络,以研究该网络参与软骨损伤的发病机制^[28],这些结果提示 Hotair 可能作为 RA 的潜在治疗靶点。

2.4 PVT1 升高抑制 RA-FLS 凋亡,促进增殖和炎症反应

RA 大鼠滑膜组织和 RA-FLS 中 PVT1 的表达升高,而 sirt6 的表达则降低。哺乳动物的 sirtuin 家族由 sirt1 至 sirt7 组成,已证明过表达 sirt6 在胶原诱导的关节炎小鼠中可减轻关节炎的严重程度,抑制炎症反应并改善关节破坏程度,也被认为是预防软骨细胞复制性衰老和 IL-1 β 诱导的骨关节炎改变的有利因素^[29]。启动子高甲基化是至关重要的基因沉默机制。PVT1 可以募集 DNA 甲基转移酶(DNMT1, DNMT3A 和 DNMT3B)至 sirt6 启动子区域,从而抑制 sirt6 的转录。随着 sirt6 表达的下调,RA-FLS 的凋亡被抑制,增殖和侵袭得到增强^[30]。

3 circRNA 概况

环状 RNA (circRNA) 是一类独特的内源性 RNA 它不具有游离的 3' 或 5' 端,但形成共价闭合的连续环^[31-32],这有助于它们抵抗 RNA 外切核酸酶的作用,保持稳定的表达,使得它们比其他类型的 RNA 更适合作生物标记物^[33]。虽然已有研究证明 circRNA 可能参与 RA 的发病机制,但目前研究较少,有待深入探究。

3.1 hsa_circ_0092285 与 hsa_circ_0058794 显著过表达

hsa_circ_0092285 来源于 *PNKP* 基因,而 *PNKP* 与 RA 中氧化应激和炎症的发展有关。hsa_circ_0058794 是从 *AGAPI* 基因剪接的。RA 滑膜细胞的特征之一是软骨的侵袭和迁移。迁移到未受影响

的关节是疾病进展的表现。侵袭和迁移需要细胞外环境中集成的信号和重塑肌动蛋白骨架,而 *AGAPI* 影响影响肌动蛋白细胞骨架的动力学,所以 *hsa circ 0058794* 可能影响软骨的侵袭和迁移^[34]。

4 小结与展望

类风湿关节炎发病机制复杂、影响因素众多,虽然近年来该领域受到了许多关注,研究不断增加,但其发病机制仍未明确,还需要深入广泛的探索。非编码RNA在基因表达过程中的调控作用,为类风湿关节炎的研究提供了新的思路,可能为RA的诊断、治疗等提供新的靶点。相对于编码RNA,人们对非编码RNA的了解还比较初步,且非编码RNA体系庞大、机制复杂、功能多样,有着广泛的研究前景。相信随着研究的深入和技术的发展,非编码RNA在类风湿关节炎中的作用机制会逐步明确,为类风湿关节炎的诊断和治疗带来突破。

参考文献

- [1] Araki Y, Mimura T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 1-10.
- [2] Stanczyk J, Pedrioli DML, Brentano F, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4): 1001-1009.
- [3] Churov AV, Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential[J]. *Autoimm Rev*, 2015, 14(11): 1029-1037.
- [4] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [5] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nature Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-461.
- [6] Wu G, Pan H, Leng R, et al. Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases[J]. *Autoimm Rev*, 2015, 14(9): 798-805.
- [7] He L, Hannon GJ. Erratum: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-531.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [9] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [10] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(5): 515-524.
- [11] Wang Y, Jiao T, Fu W, et al. miR-410-3p regulates proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes by targeting YY1 in rheumatoid arthritis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109426.
- [12] Zhang Q, Wan M, Shi J, et al. Yin Yang 1 promotes mTORC2-mediated AKT phosphorylation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(3): 232-243.
- [13] Wang AM, Huang TT, Hsu KW, et al. Yin Yang 1 is a target of microRNA-34 family and contributes to gastric carcinogenesis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(13): 5002-5016.
- [14] Tang W, Zhou W, Xiang L, et al. The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 663.
- [15] Furer V, Greenberg J D, Attur M, et al. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases[J]. *Clin Immunol*, 2010, 136(1): 1-15.
- [16] Yang B, Ge Y, Zhou Y, et al. miR-124a inhibits the proliferation and inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting PIK3/NF- κ B pathway[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(4): 208-215.
- [17] Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, et al. MicroRNA -124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1294-1304.
- [18] Ren B, Liu J, Wu K, et al. TNF-alpha-elicited miR-29b potentiates resistance to apoptosis in peripheral blood monocytes from patients with rheumatoid arthritis[J]. *Apoptosis*, 2019.
- [19] Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 571.
- [20] Pan K, Chen Y, Roth M, et al. HBPI-mediated transcriptional regulation of DNA methyltransferase 1 and its impact on cell senescence[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(5): 887-903.
- [21] Wang X, Tang K, Wang Y, et al. Elevated microRNA-145-5p increases matrix metalloproteinase-9 by activating the nuclear factor- κ B pathway in rheumatoid arthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2703-2711.
- [22] Hu G, Niu F, Humburg BA, et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(26): 18648-18663.
- [23] Yue T, Fan X, Zhang Z, et al. Downregulation of lncRNA ITSNI-2 correlates with decreased disease risk and activity of rheumatoid arthritis (RA), and reduces RA fibroblast-like synoviocytes proliferation and inflammation via inhibiting NOD2/RIP2 signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4650-4666.
- [24] Sujitha S, Rasool M. MicroRNAs and bioactive compounds on TLR/MAPK signaling in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 473: 106-115. (下转第986)

生长因子在肺动脉高压发病中的作用研究进展

李凯泽 刘广雁 陈建英*

[摘要] 生长因子主要包括血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、血小板源性生长因子(PDGF)、结缔组织生长因子(CTGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)等,早期探讨上述生长因子在肺动脉高压(PAH)发展中的作用机制,明确其在PAH治疗中的应用价值,以期为临床鉴别诊断、对症治疗提供新方向。

[关键词] 生长因子;肺动脉高压;发病机制

Recent progress in the research of growth factors in the pathogenesis of pulmonary hypertension

LI Kaize, LIU Guangyan, CHEN Jianying

(Division 3, Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong, China, 524000)

[ABSTRACT] Growth factors include vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), connective tissue growth factor (CTGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF). Early exploration of the mechanism of the above growth factors in the development of pulmonary hypertension (PAH) defines the application value in the treatment of PAH and provides a new direction for clinical differential diagnosis and symptomatic treatment.

[KEY WORDS] Growth factor; Pulmonary hypertension; Pathogenesis

肺动脉高压(Pulmonary arterial hypertension, PAH)主要病理特征为肺动脉平滑肌细胞失控性增生、肺动脉内皮细胞功能障碍、肺血管阻力呈进行性增高^[1-3],并伴有原位血栓形成、肺动脉痉挛等特点,易增加右心衰竭发生危险性^[4-5]。近年来,研究发现,生长因子与PAH发病机制可能存在一定关联性^[6]。基于此,本研究对生长因子在PAH发病机制中的作用综述如下。

1 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)

VEGF具有改善血管通透性、促进细胞外基质辩证性血管内皮细胞迁移增殖及血管形成等多种功

能^[7]。目前,临床发现VEGF与PAH具有紧密联系,VEGF结合受体VEGFR-2形成复合体,能作用于血管内皮细胞,诱导自身磷酸化,激发酶促级联反应,调节内皮细胞诱导因子,进一步抑制细胞凋亡。因此,VEGF及受体VEGFR-2在防治血管增殖方面具有重要作用。

同时,马义丽等^[8]通过40只Wistar新生大鼠还发现,缺氧诱导因子1 α (Hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)、VEGF共同参与了新生大鼠缺氧性PAH的发生、发展。白波等^[9]研究也指出,缺氧引起HIF-1 α 、VEGF1水平升高,在新生儿缺氧性PAH发生过程中起着重要作用。VEGF在早期PAH中扮演保护性角色,能促进多种细胞DNA、

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81370242);广东医科大学附属医院干细胞临床前研究项目(2018PSSC006)

作者单位:广东医科大学附属医院心血管内科三区,广东,湛江 524000

*通信作者:陈建英, E-mail: jychen275@163.com

RNA、蛋白质等大分子物质的合成,加快细胞有丝分裂,同时其还能促进细胞膜 Na^+/H^+ 交换,诱导细胞碱性化,调节磷酸肌醇循环,刺激S6激酶等。然而随病情不断加重,在缺氧环境刺激下,VEGF基因启动区缺氧反应元件,通过结合HIF-1 α ,利用复杂信号转导途径,直接参与肺血管重塑,从而引发肺动脉压力升高。故HIF-1 α 可为探讨VEGF水平在缺氧性PAH中的表达提供科学指导。

2 转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β)

TGF- β 主要类型为:TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4及TGF- β 5,其中活化TGF- β 1通过激活下游Smad2/3信号通路,调控炎症介导、血管增生及纤维化等多种反应,参与心血管疾病的发生、发展。研究进一步表明^[10],PAH患者TGF- β 1水平明显上调,可通过调控p38丝裂原活化蛋白激酶信号通路,上调 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达,进而加快平滑肌细胞增殖、分化。同时,TGF- β 1通过激活PI3K/Akt信号通路,能提高B淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)含量,从而预防肺动脉平滑肌细胞凋亡,增强平滑肌细胞活力。邓凯等^[11]通过蛋白免疫印迹法检测右肺组织TGF- β 1表达水平可知,TGF- β 1水平在野百合碱诱导的PAH大鼠肺组织呈异常升高表达,是肺血管重塑及肺动脉纤维化形成的重要调节因子。另外,Tang W等^[12]证实,TGF- β 1激活p38/MAPK信号通路,能增加基质金属蛋白酶水平,破坏基质金属蛋白酶与组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)平衡,呈剂量、时间依赖性上调TIMP-1表达,抑制细胞外基质蛋白降解,反之,MMP-2、MMP-9一定程度会促进TGF- β 1释放,加重血管重构。此外,低剂量TGF- β 1通过激活素受体样激酶1(AKT1)激活Smad 1/5蛋白,不仅能强化肺动脉内皮细胞功能,促进内皮细胞增殖、迁移,还能诱导血管生成,相反,高剂量TGF- β 1经AKT5激活Smad 2蛋白,会严重影响内皮细胞功能及存活,可见维持TGF- β 1/ALK5/Smad 2/3信号通路、TGF- β 1/ALK1/Smad 1信号通路平衡对保护PAH患者肺动脉内皮细胞功能、预防肺血管重塑发挥关键作用。

另外,骨形成蛋白受体-2(Bone morphogenetic protein receptor2, BMPR-2)为TGF- β 1重要家族成

员,与80.0%家族性PAH及10.0%~40.0%其他形式的PAH均存在一定关联性^[13]。BMPR-2基因杂合需借助缺氧或炎症反应,从而形成不同类型PAH,且相关遗传性PAH伴有微小RNA加工过程的变异^[14],同时,国外学者证实^[15],口服活性小分子TGF- β 受体抑制剂有助于抑制PHA病程进展,预防肺血管重塑,从而进一步说明BMPR-2细胞内转导及磷酸化调控有望成为PAH在TGF- β 中的治疗新靶点。

3 血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)

PDGF是一种促间质细胞增殖因子,主要包括AA、BB、AB三种异构体形式,现已有研究证实,PDGF受体特异性结合PDGF,会刺激酪氨酸残基二聚化,加快自身磷酸化,进而激活ERK1/2通路,顺序启动酶联活化反应,引发PAH^[16]。同时,彭虹艳^[17]研究还认为,PDGF可促进有氧条件下培养的主动脉血管平滑肌细胞糖酵解增强,结合、活化PDGFR,而活化PDGFR通过PI3K/AKT/mTOR信号转导通路上调HIF1 α 表达,从而降低丙酮酸脱氢酶(Pyruvate dehydrogenase, PDH)磷酸化活性,激发肺动脉平滑肌细胞Warburg效应,Warburg效应通过强化HIF1 α 活性正反馈其本身,从而导致肺动脉平滑肌细胞异常增殖,参与肺动脉重构的发生、发展。另外,通过逆转录聚合酶链反应发现^[18],PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-Ra、PDGF-R13 mRNA在重度特发性PAH患者中呈异常升高表达,可靶向作用于PDGFR的酪氨酸激酶抑制剂如伊马替尼抑制性治疗,防止肺动脉平滑肌细胞增殖、迁移,抑制PAH病情发展,从而进一步证明PDGF在平滑肌细胞异常增殖所致PDH中发挥关键作用,可为干预治疗PAH提供新方向。

4 结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)

张蕙等^[19]研究认为,肺血管重构不仅是PAH病情持续发展的关键因素,也是导致药物治疗发生抵抗的重要原因。CTGF能调控细胞外基质蛋白含量,参与血管生成、纤维化等重要生理病理过程。近期研究表明^[20],高肺血流亦可造成CTGF表达增多,有力佐证了CTGF与PAH肺血管重构存在密切联系。分析机制在于:一方面,缺氧刺激

下,内皮细胞功能紊乱,导致血管内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)、TGF- β 分泌增加,发挥血管收缩及细胞增殖作用,参与肺血管重构,提高 CTGF 基因表达;另一方面,CTGF 过度上调会激活 ERK1/2 通路,结合血管平滑肌细胞膜上受体,引发酶促级联反应,刺激细胞内信号分子,明显提高 MMP-2 活性,产生大量胶原、纤维结合素等细胞外基质,从而诱发血管平滑肌细胞异常增殖、迁移。同时冀璐^[21]发现 50 例先天性心脏病伴 PAH 患儿均存在心肌纤维化与肺血管重构现象,且病情随肺动脉压力升高呈明显加重趋势。应用野百合碱导致大鼠 PAH 模型进一步发现^[22],CTGF mRNA 在肺动脉与小动脉肥大平滑肌细胞中过度表达。推测 CTGF 有望成为诊断 PAH 的新生物标志物,为临床实施针对性治疗方案提供循证支持。

5 成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)

FGF 主要分为碱性分子(bFGF)、酸性分子(aFGF)2种形式,经体外实验可知^[23],将 FGF 加入毛细血管内皮细胞培养中,加快细胞增殖、分裂,生成毛细血管样管腔,可见 FGF 对血管内皮细胞具有较强趋化作用。另外,缺血、缺氧会损害细胞完整性,导致机体释放大量 FGF,会损伤动脉内壁,促进肺动脉平滑肌细胞增殖、分裂及细胞外基质沉积,提高血管狭窄发生风险,增加动脉压力。另外,王永丽^[24]通过对比 70 例慢性阻塞性肺疾病并发 PAH 患者、45 例 COPD 未发生 PAH 患者发现,随病情程度不断加重,COPD 并发 PAH 患者血清 bFGF 水平出现降低趋势,并与肺动脉收缩压呈明显负相关关系。bFGF 不仅能促进纤维丝等多种细胞外基质成分的合成,还能诱导内皮细胞移行,构建新血管,同时其还能促进血管平滑肌细胞等多种细胞迁移,且 PDGF 促进血管平滑肌细胞迁移也是通过诱导内源性 bFGF 发挥作用。此外,缺氧环境下会激活丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein, MAP)介导途径,进而上调 FGF-1、FGF-2、PDGF 及成纤维细胞内皮素 A 型受体的表达,促进肺动脉血管收缩及血管重塑。

6 胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)

IGF 为促进生长的多肽类物质,包括 2 种亚型:

IGF-1、IGF-2,其中低氧条件下,IGF-1 可刺激大血管平滑肌细胞 DNA 合成,诱导肺血管结构重建,参与细胞异常增殖与凋亡,其机制可能与受体结合后激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEK 1)通路,活化转录因子环磷酸腺苷反应成分结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB),促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,从而达到抑制凋亡的最终目的^[25]。另外,IGF-1 及其受体抗凋亡作用,一定程度会破坏血管壁细胞增殖与凋亡平衡,异常增殖肺血管壁细胞,减少凋亡,从而导致肺血管重建。由此可知,IGF-1 及其受体在低氧性肺血管重建中具有重要作用,可为 PAH 发病机制提供新的解释。近年来,随医疗技术日益成熟,IGF-1 拮抗剂抑制或运用反义 IGF-1 基因技术被逐渐应用于抑制肿瘤生长方面,取得了良好成效,因此,推测此方法可能成为阻止肺血管重建、治疗 PAH 的有效方法。

7 肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)

HGF 经信号转导,能发挥抗纤维化作用,避免器官结构重建^[26]。吉圣珺等^[27]研究指出,HGF 通过抑制血管内皮细胞凋亡,有助于保护肺血管结构完整性,延缓 PAH 进程。原因在于:一方面,HGF 通过激活血管内皮细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶等信号通路,诱导血管内皮细胞参与 PAH 血管形成与内皮再生,从而降低 PAH 发生危险性^[28];另一方面,当血管内皮细胞损伤时,HGF 可激活细胞外调节蛋白激酶 1/2 信号转导通路,保证细胞核 RNA 稳定性,提高肺微血管内皮细胞增殖率及体外培养时细胞贴壁率,抑制一氧化氮(Nitric oxide, NO)及细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM 1)表达,从而缓解缺氧损伤所致肺微血管内皮细胞损伤,保护其正常生理功能。此外,研究还发现,HGF 可与其他生长因子及细胞因子相互协同,减少肺组织内 ET-1 含量,起着预防血管收缩的作用^[29]。由此可见,HGF 一定程度可通过防止 ET-1 释放,延缓 PAH 形成进程,为临床治疗 PAH 指引新方向,但仍需进一步临床试验数据验证。

8 结语

VEGF、TGF- β 、PDGF、CTGF、FGF、HGF 等生长因子在 PAH 病理基础中发挥重要作用。早期通

过分子生物学技术与方法,探讨生长因子的表达,不仅利于临床明确PAH发病机制,也有助于通过调控相关生长因子水平,可为临床早期诊断PAH、实施对症治疗、逆转PAH病程奠定科学基础。

参考文献

- [1] Saito T, Miyagawa K, Chen S Y, et al. Upregulation of Human Endogenous Retrovirus-K Is Linked to Immunity and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension [J]. *Circulation*, 2017, 136(20):1920-1935.
- [2] Ghosh R K, Ball S, Das A, et al. Selexipag in Pulmonary Arterial Hypertension: Most Updated Evidence From Recent Preclinical and Clinical Studies [J]. *J Clin Pharmacol*, 2017, 57(5):547-557.
- [3] 陈辉,权薇,郝蓬. 斯克兰顿肺动脉高压心电图积分系统在急诊室内肺动脉高压诊断中的应用价值[J]. *中国医药*, 2017, 12(2):195-198.
- [4] Mihai C, Antic M, Dobrota R, et al. Factors associated with disease progression in early-diagnosed pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis: longitudinal data from the DETECT cohort [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 77(1):128-123.
- [5] 林志武,程生稞,付勇,等. miR-19a 调控 BMPR2 与 VEGF 在肺动脉高压大鼠肺血管重构中的作用[J]. *山东医药*, 2018, 58(42):22-25.
- [6] 侯万举,曹洁. 生长因子在肺动脉高压发病机制中的研究进展[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(2):116-119.
- [7] 常亚伟,李赛,据绍坦. 血管内皮生长因子基因 936C/T 位点多态性与急性心肌梗死的关系[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(02):151-155.
- [8] 马义丽,王乐,李明霞. 缺氧诱导因子 1 α 及血管内皮生长因子在新生大鼠缺氧性肺动脉高压发病机制中的作用[J]. *中国新生儿科杂志*, 2017, 32(1):64-68.
- [9] 白波,陈波,李广洪,等. 血清缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子及内皮素-1 水平在新生儿缺氧性肺动脉高压中的变化及临床意义[J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 25(12):943.
- [10] 王丹妹,方莲花,杜冠华. 转化生长因子 β 1 在肺动脉高压中作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(6):741-744.
- [11] 邓凯,邹勇,廖志新,等. 肺动脉高压大鼠肺组织中 TGF- β 1 和 IL-6 的表达水平及意义[J]. *新医学*, 2018, 49(9):633-637.
- [12] Tang W, Yang J, Zhang F, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Sp1 may contribute to the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induced by transforming growth factor- β 1 in human pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(2):225-33.
- [13] 杜永胜,周思静,周学欣,等. 骨形成蛋白 2 型受体及其基因突变与肺动脉高压[J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(8):1531-1533.
- [14] 王瑾,向莉莉,李晓晖. 骨形成蛋白 II 型受体信号通路与肺动脉高压:新进展与希望[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(2):119-130.
- [15] Wu J, Jia J, Liu L, et al. Schisandrin B Displays a Protective Role against Primary Pulmonary Hypertension by Targeting Transforming Growth Factor- β 1 [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2017, 11(3):148-157.
- [16] 张欣. 异钩藤碱在肺动脉高压及 PASMCs 增殖中的保护作用[D]. 山东大学, 2015:1-58.
- [17] 彭虹艳. PDGF 通过 PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α 途径增强 Warburg 效应促进肺动脉血管平滑肌细胞增殖[D]. 南华大学, 2017:1-74.
- [18] 魏丽. 橙皮素对血小板源性生长因子-BB 所致肺动脉平滑肌细胞增殖的作用研究[D]. 武汉大学, 2016.
- [19] 张蕙,刘宏津,黄文辉,等. 左心疾病所致的肺动脉高压大鼠模型中肺血管重构特点[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(28):2269-2274.
- [20] 冯迎军. 先天性心脏病合并肺动脉高压患者的心肌纤维化评价[J]. *山东医药*, 2016, 56(5):32-34.
- [21] 冀璐. 结缔组织生长因子在先天性心脏病合并肺动脉高压中的表达和意义[D]. 山西医科大学, 2015:1-40.
- [22] 廉国超. 结缔组织生长因子在 PCPA 抑制野百合碱诱导的大鼠肺内 ECM 重机制探讨[D]. 中国医科大学, 2013:1-55.
- [23] Chen A, Liu J, Zhu J, et al. FGF21 attenuates hypoxia-induced dysfunction and apoptosis in HPAECs through alleviating endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3):1684-1694.
- [24] 王永丽. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 VEGF、bFGF 水平与肺动脉高压的关系研究[J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(5):849-852.
- [25] Connolly M, Garfield BE, Crosby A, et al. miR-322-5p targets IGF-1 and is suppressed in the heart of rats with pulmonary hypertension [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(3):339-348.
- [26] Caenepeel S, Cooke K, Wadsworth S, et al. MAPK pathway inhibition induces MET and GAB1 levels, priming BRAF mutant melanoma for rescue by hepatocyte growth factor [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17795-17809.
- [27] 吉圣璐,郑韶欣. 肝细胞生长因子抗血管内皮细胞凋亡信号通路的研究进展[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2016, 22(2):172-176.
- [28] 梁明亭. 肝细胞生长因子对肺高血压的作用及其机制的研究[D]. 山东大学, 2017:1-141.
- [29] 陈晓辉,翁国星,邓玉洁,等. 大鼠肺动脉高压模型建立及作用机制[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2015, 31(10):619-622.

基于高通量测序的伴随诊断试剂临床评价方法及运用

高宇 吕允凤*

[摘要] 随着分子生物学技术的发展,靶向治疗药物已经在临床广泛应用,但药物的治疗效果存在着较大的个体差异,需要伴随诊断试剂对可获益患者进行区分。与此同时,高通量测序作为高通量测序具有速度快、准确性高、报告位点多、所需样本量小等优势,将高通量测序作为伴随诊断试剂指导用药有着强烈的需求。但如何对高通量测序可同时报告多个位点的性能进行临床评价是研究人员还是监管者都面临的巨大挑战。美国FDA提出了Follow-on临床评价方法,通过外部等效性研究评价二者的临床性能的一致性。本文基于在美国使用该临床评价方法已上市的产品对基于高通量测序的伴随诊断试剂的评价方法进行阐述,以期为我国研究人员和生产企业在该类产品研发、申报时提供参考。

[关键词] 高通量测序;伴随诊断;Follow-On;靶向治疗

Clinical evaluation methods and using of companion diagnostic reagents based on next-generation sequencing

GAO Yu, LV Yunfeng*

(Clinical Evaluation and Biometrics Division II, Center For Medical Device Evaluation, NMPA, Beijing, China, 100081)

[ABSTRACT] With the development of molecular biology technology, targeted therapeutic drugs have been widely used in clinical practice. Still, there are significant individual differences in the therapeutic effects of drugs, and it is necessary to distinguish between patients who can benefit from a diagnostic test. At the same time, second-generation sequencing as a high-throughput sequencing has the advantages of fast speed, high accuracy, many reporting sites, small sample size, etc. There is a strong demand for second-generation sequencing as a guide for companion diagnostic reagents. But how to conduct a clinical evaluation of the performance of second-generation sequencing that can report multiple sites at the same time is a huge challenge for researchers and regulators. The US FDA has proposed a Follow-on clinical evaluation method to evaluate the consistency of the clinical performance of the two through external equivalence studies. In this article, based on the products that have been marketed in the United States using this clinical evaluation method, the evaluation method of companion diagnostic reagents based on Next-generation sequencing technology is described in order to provide reference for Chinese researchers and manufacturers in the development and application of such products.

[KEY WORDS] NGS; Companion diagnostic; Follow-On; Targeted therapy

随着分子生物学技术的发展,靶向治疗作为一种低毒、高效的肿瘤疗法已经成为研究热点,并得到了广泛的应用^[1]。靶向治疗药物在临床应用时需通过有效手段将可能从靶向药物中获益的患者筛选出^[2-5],该试剂被命名为伴随诊断试剂

(Companion Diagnostics, CDx)^[6]。为了确认在临床应用时伴随诊断试剂对可获益患者的筛选性能,伴随诊断试剂上市前的临床评价研究需要通过受试者的药物治疗效果进行评价^[7],是一种难度较高的临床评价方法。通常,每个临床试验仅能

作者单位:国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心临床与生物统计二部,北京 100081

*通信作者:吕允凤, E-mail: lvyf@cmde.org.cn

针对一种药物及其伴随诊断试剂的相关性验证。然而随着靶向药物的增加以及高通量测序技术的发展,传统伴随诊断试剂及其临床评价模式已经难以满足临床的需要。

传统伴随诊断试剂一次检测通常仅能针对一种药物的应用进行指导,如果一种疾病有多种伴随诊断药物,就需要进行多次检测,不仅增加了检测费用及时间,同时增加了所需要的活检样本量。高通量测序技术可以通过一份样本对于几乎全部感兴趣的基因位点进行检测,一次检测可以同时指导多个以基因检测结果作为伴随诊断位点的药物的使用^[8]。这虽然在技术层面解决了传统伴随诊断试剂所造成的问题,但当其作为一个产品进行上市评价时,按照传统临床评价方式逐一进行检测位点与药物相关性之间的临床验证,这也是不现实的。

前美国FDA审评员Li于2015年9月提出伴随诊断Follow-On临床评价方法并于2016年9月公开发表论文对该评价方法的统计原理进行了详细的阐述^[9]。该方法的基本原理是通过与已上市试剂进行符合率(Percentage of Agreement)研究推导二者的临床应用时的等效性(Concordance)。2017年,美国FDA首次使用Follow-On临床评价方法批准了

基于高通量测序技术的伴随诊断试剂FoundationOne CDx上市。本文基于Follow-On临床评价方法的统计学原理,结合美国FDA公开的已批准上市产品的安全有效性数据综述(Summary of Safety And Effectiveness Data, SSED)^[10-12],分析美国FDA对于Follow-On临床评价方法的评价思路以及高通量测序体外诊断试剂的评价思路,以期为我国同类型产品的临床评价提供参考。

1 已上市产品临床评价概述

1.1 入组及检测

FoundationOne CDx基于高通量测序方法学共检测324个基因的突变,其中检测7个基因的突变为用于指导用药(见表1)以及不单独用于指导用药的300余个基因。不单独用于指导用药的位点包括用于计算肿瘤突变负荷(Tumor Mutation Burden, TMB)、检测微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)以及其他具有显著临床意义^[13]的基因位点。在临床上,TMB指标用于临床医生决策PD-L1药物的使用^[14],但FDA并未将该用药指导列入预期用途。本文仅针对指导用药的伴随诊断位点的临床评价方法。

表1 FoundationOne CDx伴随诊断检测基因突变对应肿瘤及相应药物

Table 1 Tumor Mutations of FoundationOne CDx and Corresponding Drugs

基因	突变类型	肿瘤类型	药物
EGFR	19外显子插入/缺失或21外显子L858R	非小细胞肺癌	阿法替尼 吉非替尼 厄洛替尼
	20外显子T790M	非小细胞肺癌	奥西替尼 曲妥珠单抗
EBBR2	基因扩增 (amplification)	乳腺癌	Kadcyla [*] 帕妥珠单抗
			艾乐替尼
ALK	重排	非小细胞肺癌	克唑替尼 色瑞替尼
KRAS NRAS	KRAS 12、13外显子 KRAS 2、3、4外显子和NRAS 2、3、4外显子	结直肠癌	西妥昔单抗
		结直肠癌 非小细胞肺癌	帕尼单抗 [*] 达拉非尼 [*] 与曲美替尼 [*] 合用
BRAF	V600E	黑色素瘤	达拉非尼 [*] 威罗菲尼 [*]
	V600E和V600K	黑色素瘤	曲美替尼 [*] 考比替尼 [*] 与威罗菲尼 [*] 合用
BRCA1/2	突变	卵巢癌	瑞卡帕布 [*]
PIK3CA	PIK3CA C420R, E542K, E545A, E545D [仅1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R, H1047L, H1047R, H1047Y 突变	乳腺癌	Alpelisib ^{**}

注:*未在中国上市;**2019年12月3日通过桥接临床研究方法上市

根据 Follow-On 临床评价方法的统计学原理, 应入组数量基本相等的阳性和阴性样本(各约 150 例), 对入组样本进行两次对比试剂(Comparator Companion Diagnostic, CCD)检测及一次考核试剂检测(Follow-on Companion Diagnostic, FCD)。分别以对比试剂第一次(记为 CCD1)及第二次(记为 CCD2)检测结果为基准, 计算另一次对比试剂检测结果及考核试剂检测结果与基准检测符合率的差

值, 从而评价 FCD 与 CCD 的临床等效性。样本入组的预筛试剂可以是包括对比试剂在内的任意检测试剂, 而对比试剂必须选择已上市的伴随诊断试剂。如果使用对比试剂作为预筛试剂, 预筛检测结果可以作为等效性研究的两次对比试剂检测结果中的一次使用。FoundationOne CDx 临床试验所选择的预筛选试剂、第一次对比试剂(CCD1)检测试剂、第二次对比试剂(CCD2)检测试剂参见表 2。

表 2 FoundationOne CDx 临床试验试剂的选择
Table 2 Test Selection in FoundationOne CDx Clinical Trail

基因	突变	入组筛选	CCD1	CCD2
EGFR	19 外显子插入/缺失或 21 外显子 L858R	F1 LDT* (NGS) 外部提供	cobas v2 (ARMS-PCR)	cobasV2 (ARMS-PCR)
EGFR	20 外显子 T790M	cobas v1 (ARMS-PCR) cobas v2 (ARMS-PCR)	cobas v1 (ARMS-PCR) cobas v2 (ARMS-PCR)	cobasV2 (ARMS-PCR)
ERRB2	扩增	外部提供	Dako FISH(原位杂交)	Dako FISH(原位杂交)
KRAS	2、3、4、12、13 外显子	F1 LDT (NGS)以及外部提供	theraScreen (ARMS-PCR)	theraScreen (ARMS-PCR)
ALK	重排	Ventana ALK(免疫组化)	Ventana ALK (免疫组化)	Vysis ALK(原位杂交)
BRAF	V600(V600E、V600K)	F1 LDT(NGS)外部提供	cobas BRAF V600(PCR)	cobas BRAF V600(PCR)

注: F1 LDT 为 FoundationOne CDx 上市前的试验室自建检测(Laboratory Developed Test, LDT)产品, 由美国 FDA 和医疗保障服务中心(Centers for Medicare & Medicaid Services, CMS)共同监管, 可以进行检测服务但不属于上市产品。二者均基于 Illumina NGS 平台。

1.2 数据展示及统计

统计分析时, 根据指标在预期人群阳性率(Prevalence)及入组人群比例校正计算 CCD1 分别与 FCD 和 CCD2 的符合率的差值、CCD2 分别与 FCD 和 CCD1 的符合率的差值, 并通过 Bootstrap 法得到差值的 95% 置信区间^[15]。在 Li 的文

献中, 非劣效界值设定为 5%。但在 SSED 中, 所有基因位点中与之对应的差值 ζ 最大 95% 置信区间上限最大值为 13.6%。可以看出在产品临床评价中对非劣效界值的设定根据产品的实际情况进行了调整。见表 3。

表 3 Follow-On 临床试验结果表格
Table 3 the Form of Follow-on Clinical Trail Results

指标	CCD1+				CCD1-			
	CCD2+	CCD2-	CCD2 Missing	总	CCD2+	CCD2-	CCD2 Missing	总
FCD+	a ₁	b ₁	f ₁	m ₁	a ₀	b ₀	f ₀	r ₁
FCD-	c ₁	d ₁	g ₁	m ₀	c ₀	d ₀	g ₀	r ₀
FCD Missing	h ₁	j ₁	k ₁	p ₁	h ₀	j ₀	k ₀	p ₀
总	n ₁₁	n ₁₀	q ₁	n ₁	n ₀₁	n ₀₀	q ₀	n ₀

1.3 样本注释分析

在 6 个试验的结果表格中有 3 个对于不一致样本的结果进行了注释, 所注释单元格均为 FoundationOne CDx 检测与两次 CCD 之间检测结果不一致的样本, 即 FoundationOne CDx 为阳性而两次 CCD 检测结果为阴性样本、FoundationOne CDx 为

阴性而两次 CCD 检测结果为阳性样本。对于其他的结果数量并未进行注释。

2 Follow-On 临床评价方法

Follow-On 可理解为是一种临床应用模拟评价的方法。当已上市试剂的两次检测均为检测结

果阳性,则判定样本来源受试者使用相应药物可获益,而考核试剂的检测结果应与之一致。试验的实施与一般体外诊断试剂临床符合率研究相似,但评价的方法却有较大区别。

为有效评价阴阳性符合率,该临床评价方法以检测结果作为入组标准。以任意的检测结果入组阴、阳性样本各约150例。如以对比试剂结果作为入组依据,该结果可作为正式试验的一次对比试剂检测结果。在对比试剂选择时,不限制于对比试剂方法是否相同,但应尽量选择检测同一生物标志物的试剂。

数据汇总时,应剔除 CCD1、CCD2、FCD 结果不完整的样本。统计分析时,应根据标志物在预期人群阳性率及入组受试者阳性率进行校正计算。当基于样本全集的统计结果表明与对比试剂有较大差异时,可以通过分层分析考察影响因素,如样本量、人口学特征等。如调整后具有较好的临床等效性,应当基于分层统计结果将影响因素写入说明书中“局限性”部分。对于检测不一致样本,应当着重对申报试剂与两次 CCD 之间检测结果不一致的样本进行分析,分析结果同样应当写入说明书中“局限性”部分。

3 评价要点

3.1 对比试剂的选择

在对比试剂的选择时,方法学的一致性并非主要考虑因素,但必需具有同样的伴随诊断预期用途。当有多个针对同一药物的伴随诊断试剂时,应选择方法学更加准确的伴随诊断试剂作为对比试剂。例如,ALK 重排的研究中,样本基于免疫组织化学试剂结果入组并作为 CCD1 结果,但考虑到免疫组织化学的在临床使用中可能遇到的内部质控难度的问题^[16],将 CCD2 改为原位杂交伴随诊断试剂。

3.2 非劣效界值的设定

在 FoundationOne CDx 的 SSED 临床评价部分开篇就明确了所使用的是按照 Li 所提出的 Follow-On 的伴随诊断试剂临床有效性评价方法进行研究。该文献中的举例中的样本量与实际产品临床试验的样本量相似。但 FoundationOne CDx 临床试验中,部分突变位点 ζ 的置信区间与文献中所提及的 5% 非劣效界值有较大差异。因此在实际的临床评价中,正如 Li 在文章中说“非劣效界值

δ 的设定需要考虑试剂、临床、统计、监管等多方面因素”。

3.3 分层分析

在 FoundationOne CDx 的临床试验数据中有部分位点的临床试验 ζ 的 95% 置信区间上限较高。对于高 ζ 的情形,应当基于样本信息进行分层分析,包括但不限于基因型、人种、性别等。根据高通量测序的流程,样本体积是否充足是影响检测准确性的重要因素。在 FoundationOne CDx 临床试验的统计分析时也分别对全样本集和大于 0.6 mm^2 的样本集进行了分层分析。根据统计结果,大于 0.6 mm^2 的样本具有更好的符合率从而可以推定更好的等效性。据此,在 SSED 所记载的检测流程中 0.6 mm^2 规定为是有核细胞充足的判定标准,而在 Foundation Medicine 网站所公布的样本要求中更为保守地规定了最小样本体积为 1 mm^2 ^[17]。

3.4 不一致样本分析

在统计结果表格中,除免疫组织化学和原位杂交为方法学的对比试剂外,均在检测结果中对 FoundationOne CDx 与两次 CCD 之间检测结果不一致的样本进行了注释,解释了不一致的原因,并将相应的解释写入说明书中。这些注释表明,在评价的过程中应重点分析在临床有较大用药可能的样本检测结果不一致的原因,而 CCD1、CCD2 本身检测结果不一致样本的检测相对弱化。

4 小结

高通量测序伴随诊断试剂使用 Follow-On 临床评价方法可以进行多位点多药物伴随诊断性能的临床评价。Follow-On 伴随诊断试剂评价方法是通过特殊的临床实验设计更多地依靠统计学方法进行评价的临床评价方法。由于脱离了药物治疗效果的研究,不仅需要考虑产品评价方法,还应在临床评价方法适用性方面有更深入的考虑。设定产品的接受标准时也应结合产品的实际情况,根据患者的风险及获益评价其临床性能。此外,该方法虽然在一定程度上解决了用药受试者样本稀缺的问题,但对于阳性样本数量的要求会高于传统的伴随诊断试剂临床试验。同时由于需要进行 3 次检测,纳入样本的样本体积也会有“硬性”的要求,需要完成三次检测。这也高于传统的伴随诊断试剂临床试验。

参考文献

- [1] Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics[J]. Trends mol med, 2001, 7(5):201-204.
- [2] Torlakovic E, Lim HJ, Adam J, et al. "Interchangeability" of PD-L1 immunohistochemistry assays: a meta-analysis of diagnostic accuracy[J]. Mod Pathol, 2019: 1-14.
- [3] Torres S, González Á, Cunquero Tomas AJ, et al. A profile on cobas® EGFR Mutation Test v2 as companion diagnostic for first-line treatment of patients with non-small cell lung cancer[J]. Exp Rev Mol Diagn, 2020: 1-8.
- [4] Ford L, Wolford JE, Brown SM, et al. A profile on the FoundationFocus CDxBRCA tests [J]. Exp rev mol diagn, 2020: 1-8.
- [5] Kawaoka T, Ando Y, Yamauchi M, et al. Incidence of microsatellite instability - high hepatocellular carcinoma among Japanese patients and response to pembrolizumab [J]. Hepatol Res, 2020.
- [6] U.S. FDA. Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. In Vitro Companion Diagnostic Devices [EB/OL]. U.S.: U.S. FDA, 2016; 7[2019.10]. <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM262327.pdf>.
- [7] Li M, Yu T, Hu YF. The impact of companion diagnostic device measurement performance on clinical validation of personalized medicine[J]. Stat med, 2015, 34(14): 2222-2234.
- [8] Lin E, Chien J, Ong FS, et al. Challenges and opportunities for next-generation sequencing in companion diagnostics [J]. Exp rev mol diagn, 2015, 15(2): 193-209.
- [9] Li M. Statistical methods for clinical validation of follow-on companion diagnostic devices via an external concordance study[J]. Statist Biopharm Res, 2016, 8(3): 355-363.
- [10] U.S. FDA. Summary Of Safety And Effectiveness Data [EB/OL]. 2017; 37-54 [2019.10]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf.
- [11] U.S. FDA. Summary Of Safety And Effectiveness Data [EB/OL]. 2019; 23 - 36 [2020.3]. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019S006B.pdf.
- [12] Allegritti M, Fabi A, Buglioni S, et al. Tearing down the walls: FDA approves next generation sequencing (NGS) assays for actionable cancer genomic aberrations [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 47.
- [13] U.S. FDA. CDRH'S APPROACH TO TUMOR PROFILING NEXT GENERATION SEQUENCING TESTS [EB/OL]. 2018[2020.3]. <https://www.fda.gov/media/109050/download>.
- [14] Yarchoan M, Albacker LA, Hopkins AC, et al. PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers [J]. JCI insight, 2019, 4(6).
- [15] Efron B. Missing data, imputation, and the bootstrap [J]. J Am Stat Assoc, 1994, 89(426): 463-475.
- [16] Heinmöller P, Bänfer G, Grzelinski M, et al. Quality Control of Immunohistochemical and In Situ Hybridization Predictive Biomarkers for Patient Treatment: Experience from International Guidelines and International Quality Control Schemes [M]. Predict Biomark Oncol. Springer, Cham, 2019: 525-537.
- [17] Foundation Medicine. Specimen Instructions [EB/OL]. 2018; 1 [2020.3]. https://assets.ctfassets.net/vhribv12lmne/6ms70iT5PaQgGiMWue2MAM/2d91048be64b72e73ffa0c1cab043c0/F1CDx_Specimen_Instructions.pdf.
- (上接第 977 页)
- [25] Yan S, Wang P, Wang J, et al. Long Non-coding RNA HIX003209 Promotes Inflammation by Sponging miR-6089 via TLR4/NF-κB Signaling Pathway in Rheumatoid Arthritis [J]. Front Immunol, 2019, 10.
- [26] Song J, Kim D, Han J, et al. PBMC and exosome-derived HotaIR is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis [J]. Clini Exp Med, 2015, 15(1): 121-126.
- [27] Zhang H, Wei Q, Wang S, et al. LncRNA HOTAIR alleviates rheumatoid arthritis by targeting miR-138 and inactivating NF-κB pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 283-290.
- [28] Zhou W, He X, Chen Z, et al. LncRNA HOTAIR-mediated Wnt/β-catenin network modeling to predict and validate therapeutic targets for cartilage damage [J]. BMC Bioinformatics, 2019, 20(1).
- [29] Wu Y, Chen L, Wang Y, et al. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF-κB mediated inflammatory responses in osteoarthritis development [J]. Sci Rep, 2015, 5(1).
- [30] Zhang C, Wu X, Liu D, et al. Long non-coding RNA PVT1 knockdown suppresses fibroblast-like synoviocyte inflammation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis through demethylation of sirt6 [J]. J Biol Eng, 2019, 13(1).
- [31] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs [J]. Cancer Let, 2015, 365(2): 141-148.
- [32] Chen L, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388.
- [33] Ouyang Q, Huang Q, Jiang Z, et al. Using plasma circRNA_002453 as a novel biomarker in the diagnosis of lupus nephritis [J]. Mol Immunol, 2018, 101: 531-538.
- [34] Zheng F, Yu X, Huang J, et al. Circular RNA expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients, based on microarray chip technology [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 8029-8036.

玉溪市人民医院检验医学科

玉溪市人民医院检验医学科位于音乐家聂耳的故乡,为云南省临床检验质量控制中心玉溪地区分中心、玉溪市临床检验质量控制中心,是一个“医教研一体化”的综合性临床实验室。检验医学科开设临床生物化学实验室、临床免疫学实验室、临床检验实验室、临床微生物学实验室、临床血液学室、自身免疫性疾病诊断实验室、临床分子生物学诊断实验室、门急诊实验室等8个亚专业组,各亚专业组都采用现代化先进设备、拥有高水平专业技术人员,且已形成完备的科学管理体系,保证严格的质量控制及结果的客观性,能快速、准确地为临床提供实验诊断数据,有效地为临床诊疗服务。

科室坚持任人唯才、德才兼备原则,多层次引进创造性、实用性人才,加快人才队伍建设步伐,提高医院专业技术人员业务能力,建立了一支业务素质高、结构合理的人才队伍。科室现有专业技术人员53人。主任检验师8人,副主任检验技师7人;医学博士1人、医学硕士11人;昆明医科大学博士研究生导师1人。是一个德才兼备、爱岗敬业、结构合理、具有创新能力的研究团队。

建院以来,本院检验医学科硬件环境不断改善,从传统的手工检测转变为如今现代的自动化检测。目前我科采用现代化先进的医疗大型检验设备,拥有罗氏生化和免疫流水线、罗氏 Cobas 480 全自动核酸提纯及实时荧光定量 PCR 分析仪、罗氏超微量核酸检测仪、博奥微流控及微阵列基因芯片检测平台、BD 流式细胞仪、梅里埃质谱细菌鉴定系统、STAGO 全自动血凝仪、超低温冰箱等大型检验设备等。始终把实现检验事业自动化、智能化、微量化、快速化作为追求的目标,已于2007年11月作为云南省首家获得 HbA1c 检测 NGSP 认证的医院,欲进一步引进高通量测序仪及串联质谱检测平台,以完善、提高临床检验和科研技术能力。

玉溪市人民医院坚持走“科教兴院、人才强院”道路,不断加大对科研、教学的投入,加大对科教成果奖励力度,充分调动专业技术人员的积极性、主动性。科室科研氛围浓烈,现有云南省科技厅中青年学术技术带头人1人,云南省卫生高层次人才1人,玉溪市中青年学术和技术带头人4人。近五年检验医学科主持国家自然科学基金2项,以第一作者或通信作者发表论文:SCI收录12篇,国家或省级期刊72篇。共培养12名硕士研究生,在读全日制硕士研究生6人。

目前检验医学科全科人员团结一心、积极努力构建合格的组织架构、编写标准化操作文件、优化工作流程、提高业务水平等,以通过 ISO 15189 认证作为最高目标,努力将检验质量、管理水平与技术能力达到了国际标准。科室一直遵循“严谨、求实、团结、奉献”的院训,以严谨的医疗作风、精湛的医疗技术和严格的科学管理,努力为患者提供更多更优质的医疗服务。



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。

