



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

# 分子诊断与治疗杂志

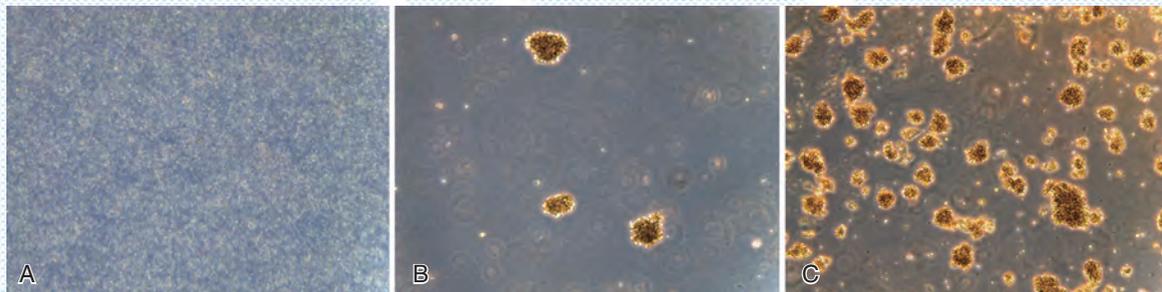
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年4月 第12卷 第4期 总第68期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 4 April 2020



注:A为第0天;B为第15天;C为第30天

图(P431) 永生化淋巴细胞系转化第0、15天和30天结果(×50)

Figure(P431) The result of immortalized lymphocyte cell line transformation on day 0, day15 and day 30 (×50)

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

04>



## 韦叶生



韦叶生,广西桂林人,医学博士,教授,主任技师,博士研究生导师,临床检验诊断学优秀学科带头人。2004年毕业于武汉大学(全日制)临床检验诊断学专业,获医学硕士学位,2008年毕业于四川大学(全日

制)免疫学专业,获医学博士学位。曾多次到欧洲、日本、新加坡等国进行培训、交流学习。

现任桂林医学院检验学院副院长,附属医院检验科主任。并担任国家自然科学基金一审专家,担任《微循环学杂志》、《分子诊断与治疗杂志》编委,担任国际期刊“J CLIN IMMUNOL”和“DNA and Cell Biology”等审稿专家。担任中国微生物学会临床微生物专业委员会副主任委员,广西医师协会检验医师专业委员会副主任委员,广西预防医学会感染性疾病检验分会副主任委员,广西医学会第四届微生物学与免疫学分会副主任委员,广西免疫学会第一届理事会理事,全国免疫学会委员,担任中国医师协会检验医师分会血液肿瘤个体化诊断检验医学专家委员等职务。

本人一直从事临床检验、教学与科学研究工作。先后承担本科生、研究生的临床免疫学、分子生物学、临床实验室管理等课程的教学工作。在脑血管疾病、肿瘤分子生物学检验领域有较深的造诣。主要研究方向为脑血管疾病及肿瘤的分子发病机制研究、基因表达调控和蛋白质组学。主攻基因突变筛选、基因转录水平、基因表达调控和基因多态性与疾病的相关研究。主持国家自然科学基金项目3项,主持广西科技厅重点项目1项,广西自然科学基金3项,广西教育厅课题、广西卫生厅重点课题等多项。获第十届广西青年科技奖、广西科技进步二等奖2项、广西科技进步三等奖3项。发表论文60多篇,其中被SCI收录30多篇。主编学术著作3部,参与编写学术著作6部。在国际核心杂志《Cancer》和《Clinical Immunology》上发表了具有创新性的文章;最近在《J Cell Mol Med》、《Front Physiol》、《中华检验医学杂志》、《中华医学遗传学杂志》、《中华微生物和免疫学杂志》等期刊上发表了开拓性的文章。近5年,培养博士生3名、硕士生7名。

# 分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年4月 第12卷 第4期 总第68期 Bimonthly Volume 12 Number 4 April 2020

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

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

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

刊号 ISSN 1674-6929  
CN 44-1656/R

邮发代号 46-283  
发行单位 广东省报刊发行局  
发行范围 国内外公开发行  
广告发布登记通知书 440100190057  
印刷 天意有福科技股份有限公司  
出版日期 2020年4月18日  
定价 RMB 15.00元

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

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

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

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

**Printing** TianYi Yofus Technology Co., Ltd.  
**Publish Date** 2020.4.18  
**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4月 第12卷 第4期

## 目次

### 述评

- 长链非编码RNA GAS5在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用  
..... 韦贵将 杨峻 韦叶生(401)

### COVID-19 专栏

- 基于实时荧光 RT-PCR 的新型冠状病毒的不同标本类型核酸检测  
..... 周刚 李超 郑国栋 等(406)
- 两种灭活方法对 2019 新型冠状病毒咽拭子标本病毒核酸检测结果的影响  
..... 姜蕾 张丽媛 刘大宁(410)
- 15 例新型冠状病毒肺炎患者(COVID-19)的临床表现和 CT 影像学特征分析  
..... 陈少金 王晓霞 王立程 等(414)

### 论著

- 高灵敏度 HCV RNA 检测在术前筛查中的应用  
..... 何宇婷 陈雪芳 陈培松 等(419)
- 乙醛脱氢酶 2 基因 Glu504Lys 多态性在汉族 2 型糖尿病患者人群中的分布特点  
..... 安宏亮 江海燕 张劲丰 等(423)
- 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生生化淋巴细胞系的建立  
..... 贾峥 张艳艳 孙楠 张文新 等(428)
- 脓毒症患者循环 miR-21、miR-155 变化与炎症细胞因子和心功能障碍的相关性  
..... 贾启明 张涛 贺娜娜 等(433)
- 快速检测洋葱伯克霍尔德菌巢式荧光定量 PCR 法建立 ..... 林丽英 邓穗燕 郭旭光(437)
- 56℃加热灭活对流感病毒核酸检测结果影响的初步研究  
..... 周百灵 杨光能 陈俊伶 等(441)
- 2 型糖尿病患者颈动脉中层内膜厚度与 hs-CRP、UAER 的相关性  
..... 谢军 孙媛媛 余其贵(445)
- 血清中 OPG、TNF- $\alpha$  和脂联素对妊娠期糖尿病的诊断分析  
..... 温洁 刘萍 郭蕊(450)
- 类风湿关节炎并发医院感染因素及 CRP、sCD14-ST 预测价值  
..... 孟庆防 郭冬芳 党箬 等(454)
- 17 $\beta$ -雌二醇对 rBMSCs 肝祖细胞定向分化及 Wnt 信号通路的调控作用  
..... 曾令锋 黄俊宇 熊瑶 等(459)
- 成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度及相关性及对并发脑梗死的预测价值  
..... 黄一苇 张昊 李灵真(464)
- 急性呼吸窘迫综合征患者血清 PCT、NT-proBNP 水平变化及意义 ..... 杨慧亮 李颖 巴晓彤(469)

# 分子诊断与治疗杂志

月刊 2020年4月 第12卷 第4期

## 目次

- 人附睾蛋白4和趋化因子配体9在狼疮性肾炎诊断及预后的应用价值  
..... 魏华 张彩凤 王佳丽(473)
- 宫颈磷癌组织中Survivin的表达及其与患者临床病理特征的关系  
..... 额尔德木图 贾玉玲 秦晓玲等(478)
- 退行性心脏瓣膜病患者血清LP(a)、OPN、IRF-4表达及其临床意义  
..... 王俊华 崔勤涛 韩培立等(483)
- 血清LBP、HSP70、DcR3水平预测急性呼吸窘迫综合征患者疾病转归的价值  
..... 马玲玲 杨秋伟 孔汴躲(487)
- 小儿重症肺炎不同病原抗原及抗体IgM抗体检测特点及流行趋势分析 ..... 陶珊(492)
- SAA、sTREM-1、CRP/PAB在SP患者全麻术后肺部感染的意义 ..... 孙媛 王欣 王莉(497)
- 血清TSP-1、PDGF预测脑出血短期预后的临床价值 ..... 高阳阳 李骥腾(502)
- 剖宫产产妇术后感染患者血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平的变化及其意义  
..... 仵晓峰 王冉 李宛玲(507)
- 血清 $\beta$ -hCG和孕酮表达与妊娠剧吐患者甲状腺功能和胃动素相关性  
..... 李凤 鲁海峰 崔冰漪等(511)
- CysC、 $\alpha$ 1-MG及 $\beta$ 2-MG在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性  
..... 李海燕(516)
- 老年AML患者在经地西他滨治疗中COX-2、VEGF及p53蛋白的表达及与预后关系  
..... 王战芳 张芳芳 杨海等(520)
- 外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对ITP患者疗效的预测价值  
..... 尹凤雷 尹娟 赵芳等(525)
- 乳头状肾细胞癌实性亚型1例报道并文献复习 ..... 王芳 相龙全 李倩等(529)
- 老年COPD伴严重呼吸衰竭患者血清Cys C、VEGF、IL-17、ACTA水平变化  
..... 曹婷婷 万俊 冯永海等(533)

## 综 述

- 14-3-3 $\zeta$ 蛋白在乳腺癌发生发展中的作用研究进展 ..... 董正远 杨清玲 陈昌杰(538)
- 儿童髓母细胞瘤分子分型与治疗进展 ..... 李秋 王晓江 朱剑栋等(542)

## 专家风采

- 韦叶生 ..... (封二)

## 实验室巡礼

- 桂林医学院检验科 ..... (封三)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 4 April 2020

## CONTENTS

### COMMENTS

- The Role Of LongNon-Coding RNA GAS5 In The Occurrence And Development Of Atherosclerosis And Atherosclerosis-related Diseases  
*WEI Guijiang, YANG Jun, WEI Yesheng* ..... (401)

### COVID-19 Column

- Nucleic Acid Detection of Different Specimen Types of SARS-CoV-2 Base on Real-time Fluorescent RT-PCR  
*ZHOU Gang, LI Chao, ZHENG Guodong, LIU Hongtao, ZHOU Rongrong, WANG Hongtao, WANG Gangping* ..... (406)
- The effect of 2 different inactivation methods on the results of viral nucleic acid in 2019 new coronavirus throat swab specimens  
*JIANG Lei, ZHANG Liyuan, LIU Daning* ..... (410)
- Analysis of the clinical manifestations and computed tomography characteristics of patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19)  
*CHEN Shaojin, WANG Xiaoxia, WANG Licheng, CHEN Hai, ZHANG Meng* ..... (414)

### ORIGINAL ARTICLES

- Application of high-sensitivity HCV RNA detection in preoperative screening  
*HE Yuting, CHEN Xuefang, CHEN Peisong, HUANG Hao, YU Xuegao, HUANG Bin* ..... (419)
- Distribution characteristics of Glu504Lys polymorphism of acetaldehyde dehydrogenase 2 gene in Type 2 Diabetes Mellitus in Han Nationality  
*AN Hongliang, JIANG Haiyan, ZHANG Jinfeng, LI Weixuan, SU Rong, HE Xian, LV Weifeng* ..... (423)
- Establishment of immortalized lymphocyte cell lines with mutation of the glucose -6- phosphate dehydrogenase gene  
*JIA Zheng, ZHANG Yanyan, SUN Nan, ZHANG Wenxin, GAO Fei, SUN Jing, HUANG Jie, QU Shoufang* ..... (428)
- Correlation between changes of miR-21, miR-155 and inflammatory cytokines and cardiac dysfunction in patients with sepsis  
*JIA Qiming, ZHANG Tao, HE Nana, WEI Lei* ..... (433)
- Establishment of nested fluorescent quantitative PCR for rapid detection of *Burkholderia cepacia*  
*LIN Liying, DENG Suiyan, GUO Xuguang* ..... (437)
- Preliminary study on the effect of 56°C heat inactivation on the detection of influenza virus nucleic acids  
*ZHOU Bailing, YANG Guangneng, CHEN Junling, FENG Xingxing, XU Bin, KUI Liyue, DU Tingyi* ..... (441)
- Correlation between carotid intima thickness and hs-CRP, UAER in patients with type 2 diabetes mellitus  
*XIE Jun, SUN Yuanyuan, YU Qigui* ..... (445)
- Diagnostic analysis of serum OPG, TNF- $\alpha$  and adiponectin in gestational diabetes mellitus  
*WEN Jie, LIU Ping, GUO Rui* ..... (450)
- Nosocomial infection factors and prediction of CRP and sCD14-ST in patients with rheumatoid arthritis  
*MENG Qingfang, GUO Dongfang, DANG Zheng, LIU Zhe* ..... (454)
- Regulation of 17 $\beta$ -estradiol on the differentiation of hepatic progenitor cells and Wnt signaling pathway in rBMSCs  
*ZENG Lingfeng, HUANG Junyu, XIONG Yao, ZHANG Zhidong, WANG Jinghao, HUANG Shuo, WEI Hongcheng* ..... (459)
- Estimated value of serum MIF level in assessing hypoxia, sleep disorder and vascular endothelial injury in adult OSAHS patients  
*HUANG Yiwei, ZHANG Hao, LI Lingzhen* ..... (464)
- Changes and significance of serum PCT and NT-proBNP levels in patients with acute respiratory distress syndrome  
*YANG Huiliang, LI Ying, BA Xiaotong* ..... (469)

# JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 4 April 2020

---

## CONTENTS

The application value of human epididymis protein 4 and chemokine ligand 9 in the diagnosis and prognosis of lupus nephritis <i>WEI Hua, ZHANG Caifeng, WANG Jiali</i> .....	(473)
The expression of Survivin in cervical phosphorous carcinoma and its relationship with clinicopathological features <i>Eerdemutu, JIA Yuling, QIN Xiaoling, NIU Li rong, BAO Ying na, YU Zhilong</i> .....	(478)
Expressions and clinical significance of serum LP(a), OPN, IRF-4 in patients with degenerative heart valve disease <i>WANG Junhua, CUI Qintao, HAN Peili, LIU Xiaochen</i> .....	(483)
The value of serum LBP, HSP70, DcR3 levels in predicting the outcome of patients with acute respiratory distress syndrome <i>MA Lingling, YANG Qiuwei, KONG Bianduo</i> .....	(487)
Detection characteristics and epidemiological trend analysis of different pathogenic antigens and IgM antibodies in children with severe pneumonia <i>TAO Shan</i> .....	(492)
Significance of SAA, sTREM-1, CRP/PAB in pulmonary infection after general anesthesia in SP patients <i>SUN Yuan, WANG Xin, WANG Li</i> .....	(497)
Clinical value of serum TSP-1 and PDGF in evaluating short-term prognosis in patients with intracerebral hemorrhage <i>GAO Yangyang, LI Jiteng</i> .....	(502)
Changes and Significance of Serum TNF-alpha, PCT and IL-1beta Levels in Patients with Postoperative Infection after Cesarean Section <i>WU Xiaofeng, WANG Ran, LI Wanling</i> .....	(507)
Correlation of serum $\beta$ -hCG and progesterone expression with thyroid function and motilin in patients with hyperemesis gravidarum <i>LI Feng, LU Haiheng, CUI Bingyi, QIN Chunyi</i> .....	(511)
The detection and significance of CysC, $\alpha$ 1-MG, $\beta$ 2-MG of early kidney injure in patients with chronic obstructive pulmonary disease <i>LI Haiyan</i> .....	(516)
Expressions of COX-2, VEGF and p53 in elderly AML patients treated with decitabine and their prognosis <i>WANG Zhanfang, ZHANG Fangfang, YANG Hai, CHEN Chaohua</i> .....	(520)
The predictive value of peripheral blood CD40, CD40L expression and serum BAFF level on the efficacy of patients with immune thrombocytopenic purpura <i>YIN Fenglei, YIN Juan, ZHAO Fang, ZHANG Rui, LIU Jing, ZHANG Wei, LI Shuchen, WANG Juan</i> .....	(525)
Solid variant of papillary renal cell carcinoma: a case report and literature review <i>WANG Fang, XIANG Longquan, LI Qian, WANG Haiqing, CHENG Jun, LIN Fanzhong</i> .....	(529)
Changes of serum Cys C, VEGF, IL-17, and ACTA levels in elderly patients with COPD and severe respiratory failure <i>CAO Tingting, WAN Jun, FENG Yonghai, CHU Heying</i> .....	(533)

## REVIEWS

14-3-3 $\zeta$ and breast cancer <i>DONG Zhengyuan, YANG Qingling, CHEN Changjie</i> .....	(538)
Molecular subgroups and treatment progress of pediatric medulloblastoma <i>LI Qiu, WANG Xiaojiang, ZHU Jiandong, ZHANG Yong, XIE Mingxiang</i> .....	(542)

## 长链非编码RNA GAS5在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用

韦贵将<sup>1,2,3</sup> 杨峻<sup>1</sup> 韦叶生<sup>1\*</sup>

**[摘要]** 长链非编码RNA(LncRNA)是一类位于细胞核或胞质内长度大于200 nt的非编码RNA。LncRNA GAS5是一名近年开始受到关注的LncRNA家族成员,它的基因位于人类1号染色体长臂2区5带,全长4 087 nt,由12个外显子组成。多项研究表明,LncRNA GAS5参与炎症反应,介导血管内皮细胞损伤,在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中起重要的作用。本文就它在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用作一评述。

**[关键词]** LncRNA GAS5; 动脉粥样硬化; 冠心病; 糖尿病

### The Role Of LongNon - Coding RNA GAS5 In The Occurrence And Development Of Atherosclerosis And Atherosclerosis-related Diseases

WEI Guijiang<sup>1,2,3</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, WEI Yesheng<sup>1\*</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China, 541000; 2. Medical College of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China, 530000; 3. Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, China, 533000)

**[ABSTRACT]** LongNon-Coding RNA (LncRNA) is a type of RNA that is located in the nucleus or cytoplasm and is longer than 200 nt. LncRNA GAS5 is a member of the LncRNA family that has attracted attention in recent years. The encoding gene is in the q25 regio of human chromosome 1, has a total length of 4 087 nt and consists of 12 exons. Several studies have shown that LncRNA GAS5 is involved in inflammation, mediates vascular endothelial cell damage, and plays an important role in the development of atherosclerosis and related diseases. This article reviews the role of LncRNA GAS5 in the occurrence and development of atherosclerosis and atherosclerosis-related diseases.

**[KEY WORDS]** LncRNA GAS5; Atherosclerosis; Coronary heart disease; Diabetes

长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一类位于细胞核或胞质内长度大于200 nt的非编码RNA<sup>[1]</sup>。现有研究证据表明,LncRNAs通过转录和转录后水平调控直接或间接

地影响一系列蛋白质的转录,是控制多种细胞机制的核心因子,参与细胞周期、生长和凋亡等多种生理过程调控和多种疾病的发生发展<sup>[2-4]</sup>。LncRNA GAS5是1988年从生长停滞小鼠纤维原

基金项目:国家自然科学基金项目(81560552);广西重点研发课题(2018AB58018);广西自然科学基金(2018GXNSFAA138120)

作者单位:1. 桂林医学院附属医院检验科,广西,桂林 541000

2. 广西大学医学院,广西,南宁 530000

3. 右江民族医学院附属医院检验科,广西,百色 533000

\*通信作者:韦叶生, E-mail: wyshi22@163.com

细胞中筛选出来的差异表达基因<sup>[5]</sup>,但由于当时对 LncRNAs 的研究手段和认识匮乏,和大多数 LncRNAs 一样,人们对 LncRNA GAS5 的功能了解甚少,LncRNA GAS5 的功能研究进展缓慢。随着全基因组分析等先进技术的发展,关于 LncRNA GAS5 的功能分析报道逐渐增多,LncRNA GAS5 在生理功能和疾病发生发展过程中的作用也逐渐被人们揭示<sup>[6-8]</sup>。LncRNA GAS5 的基因定位于1号染色体的1q25.1,除编码 LncRNA GAS5 外,还编码核小RNAs。该基因由12个外显子和11个内含子组成,只包含一个不编码功能蛋白的短的开放阅读框<sup>[9]</sup>。很多学者研究发现 LncRNA GAS5 具有广泛的生物学功能。Mourtada 等首先研究了它在人T细胞中的生物学功能。淋巴细胞群的生长控制对免疫系统的生理调节至关重要,这种控制是通过调节细胞周期和细胞死亡来实现的。对数生长期细胞增殖率高,细胞死亡率低;随着细胞密度的增加,细胞周期延长,随着种群进入生长停滞期,细胞凋亡变得更加频繁。Mourtada 等<sup>[10]</sup>的实验发现,LncRNA GAS5 过度表达导致细胞凋亡的增加和整个细胞周期的进展速度的降低,LncRNA GAS5 下调抑制了细胞凋亡并维持一个更快速的细胞周期,这表明 LncRNA GAS5 对细胞凋亡和细胞周期的调控具有重要意义。随后 Mourtada<sup>[11]</sup>研究团队的另一个研究结果表明,相对于癌旁的正常乳腺上皮组织,乳腺癌样本中 LncRNA GAS5 转录水平显著降低;利用功能性表达克隆技术发现,LncRNA GAS5 在受到复杂的转录后处理后,其高表达使乳腺癌细胞对细胞凋亡因子更加敏感,这表明 LncRNA GAS5 对乳腺癌细胞凋亡和细胞群生长的调控至关重要。鉴于细胞凋亡和增殖在多种生理病理过程中发挥着重要作用,LncRNA GAS5 调控细胞凋亡和增殖的分子机制引起科研人员越来越多的兴趣并开始被深入而广泛地研究,同时 LncRNA GAS5 在动脉粥样硬化及其相关疾病发生发展中的作用和机制也被逐步地揭示。

## 1 LncRNA GAS5 在动脉粥样硬化发生发展中的作用

作为转录后调控的重要参与者,目前多种 LncRNAs 被报道参与动脉粥样硬化相关血管内皮细胞凋亡调控<sup>[12-13]</sup>。根据 Chen 等<sup>[14]</sup>报道,LncRNA GAS5 在动脉粥样硬化患者的动脉粥样硬化斑块

中高表达,上调的 LncRNA GAS5 可能与血管内皮细胞凋亡相关。为了解 LncRNA GAS5 与血管内皮细胞凋亡的关系,Liang 等用 qRT-PCR 检测动脉粥样硬化患者血浆和 ox-LDL 处理的人主动脉内皮细胞中 LncRNA GAS5 的表达水平。结果表明,动脉粥样硬化患者血浆和 ox-LDL 处理的人主动脉内皮细胞中 LncRNA GAS5 表达上调。此外,LncRNA GAS5 基因敲除抑制细胞凋亡,而 LncRNA GAS5 基因上调则逆转敲除对细胞凋亡的抑制作用<sup>[15]</sup>。除此之外,Yao 等<sup>[16]</sup>在实验中也发现,LncRNA GAS5 基因敲除可能通过 PI3K/AKT 信号抑制血管内皮祖细胞增殖,促进凋亡。

在动脉粥样硬化发生过程中,除了在关键起始阶段中发挥重要作用的血管内皮细胞<sup>[17-18]</sup>的参与外,血管平滑肌细胞<sup>[19-20]</sup>和巨噬细胞<sup>[21-22]</sup>等也参与了随后的阶段。研究表明,LncRNA GAS5 可以通过调控血管平滑肌细胞和单核细胞的增殖、凋亡和迁移等活动来参与动脉粥样硬化的发生和发展。在一项旨在探讨 LncRNA GAS5 与血管平滑肌细胞异常增殖和迁移关系的研究中,Liu 等<sup>[23]</sup>发现,LncRNA GAS5 在 PDGF-bb 处理的血管平滑肌细胞中显著下调,LncRNA GAS5 的过表达显著抑制 PDGF-bb 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移。Tang 等<sup>[24]</sup>通过体外培养的血管平滑肌细胞模型和大鼠颈动脉球囊损伤模型,研究 LncRNA GAS5 对血管平滑肌细胞存活的调控作用,通过过表达或基因敲除调控 LncRNA GAS5 表达后发现,LncRNA GAS5 过表达促进 p53 表达并诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期,同时抑制血管平滑肌细胞增殖,抑制球囊损伤诱导的新内膜形成;在机制上,LncRNA GAS5 直接与 p53 和 p300 结合,稳定 p53-p300 相互作用,通过诱导 p53 下游靶基因调控血管平滑肌细胞存活;总之,Tang 等研究结果进一步验证了 Liu 等的结论,即 LncRNA GAS5 对血管平滑肌细胞增殖具有负向调控作用。但是,由 Sun 等主持的一项研究得到的结果与 Liu 等和 Tang 等的不尽相同,他们采用 MTT 法和 Transwell 法分别检测血管平滑肌细胞增殖和迁移,qRT-PCR 检测 LncRNA GAS5、miR-137 和 IGFBP-5 mRNA 表达,Western blot 检测 IGFBP-5 蛋白水平;研究结果显示,PDGF-bb 上调 LncRNA GAS5 和 IGFBP-5 在人主动脉平滑肌细胞中的表达,下调 miR-137 表达,LncRNA GAS5 基因敲除降低 PDGF-bb 诱导的人

主动脉平滑肌细胞增殖、迁移和IGFBP-5的表达,上调miR-137表达;总之,LncRNA GAS5可以促进人主动脉平滑肌细胞增殖和迁移,与Liu等和Tang等的不尽相同,这其中的原因可能是因为LncRNA GAS5在不同血管平滑肌细胞系之间的差异有关,或者LncRNA GAS5在血管平滑肌细胞中的作用仍有争议,有待后续更多实验进一步阐明<sup>[25]</sup>。在Shen等主持的一项旨在证实LncRNA GAS5在动脉粥样硬化发生发展中作用及其分子机制,他们建立了高脂饲料喂养的APO-E缺陷小鼠模型和oxLDL处理的THP-1巨噬细胞模型,采用qRT-PCR法和Western blot分别检测了PPAR $\alpha$ 和CPT1的表达水平,用双荧光素酶报告实验验证了LncRNA GAS5与miR-135a的靶向作用;结果显示,LncRNA GAS5在动脉粥样硬化小鼠模型血浆和oxLDL处理THP-1巨噬细胞模型中上调,LncRNA GAS5沉默减轻动脉粥样硬化小鼠和oxLDL处理THP-1巨噬细胞的脂质代谢紊乱和炎症,此外,LncRNA GAS5直接靶向miR-135a并抑制miR-135a的表达,而miR-135a表达上调可以缓解oxLDL处理THP-1巨噬细胞的脂质代谢紊乱和炎症;总之,该研究表明沉默LncRNA GAS5可以上调miR-135a表达,进而抑制动脉粥样硬化的恶性进展<sup>[26]</sup>。在另外一项关于LncRNA GAS5与THP-1巨噬细胞关系的研究中,Chen等发现,敲除LncRNA GAS5可以减少oxLDL处理的THP-1巨噬细胞的凋亡。相反,LncRNA GAS5过表达显著增加oxLDL刺激后THP-1巨噬细胞的凋亡和包括Caspases在内的凋亡因子的表达,THP-1巨噬细胞的凋亡将会释放其吞噬的脂质,加速动脉粥样硬化斑块脂质核心的形成<sup>[27]</sup>。

综上所述,LncRNA GAS5可以促进血管内皮细胞和THP-1巨噬细胞的凋亡,促进血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移,从而促进动脉粥样硬化的发生。因此,抑制LncRNA GAS5可能是动脉粥样硬化治疗的有效途径。但是,未来在将LncRNA GAS5作为动脉粥样硬化治疗的靶点时,有必要考虑到LncRNA GAS5在不同组织或者细胞中的表达差异和对不同组织或者细胞的作用差异。因此,精准调控特定组织中LncRNA GAS5的表达比如靶向给药,尽量避免副反应,成为我们在应用LncRNA GAS5治疗动脉粥样硬化时需要考虑的要素。

## 2 LncRNA GAS5在冠心病发生发展中的作用

冠心病是一种与动脉粥样硬化密切相关的常见心脑血管疾病<sup>[28-29]</sup>。为了探讨LncRNA GAS5对冠心病的诊断价值及其在冠心病中的作用机制,Yin等选择30名冠心病患者和30名健康对照作为研究对象,采用qRT-PCR检测病例对照组血浆LncRNA GAS5的表达,通过受试者工作特性曲线分析LncRNA GAS5对冠心病的诊断价值,同时用Western blot检测血管内皮细胞中受LncRNA GAS5调控的下游因子如mTOR和磷酸化mTOR的表达水平。与健康对照相比,冠心病患者血浆中LncRNA GAS5表达水平明显低于对照组。受试者工作特性曲线表明,LncRNA GAS5可能是一种有前途的冠心病生物标志物。LncRNA GAS5基因敲除和过表达对血管内皮细胞mTOR水平无明显影响,但是LncRNA GAS5基因敲除显著提高磷酸化mTOR水平,过表达显著降低磷酸化mTOR水平,LncRNA GAS5作为mTOR通路的上游调节因子参与冠心病的发生发展<sup>[30]</sup>。在另一项独立开展的,旨在探讨LncRNA GAS5在冠心病诊断中的临床价值及其对冠心病大鼠心肌损伤的保护作用的实验中,Li等<sup>[31]</sup>选择102例冠心病患者和98例健康对照组作为研究对象,检测LncRNA GAS5的表达,还建立了冠心病大鼠模型,观察LncRNA GAS5对冠心病大鼠高脂血症、心肌损伤、心肌细胞凋亡、氧化应激、炎性损伤和Wnt/ $\alpha$ -catenin信号通路的影响。结果显示,LncRNA GAS5在冠心病患者和冠心病大鼠中表达显著下调,LncRNA GAS5在冠心病大鼠中的过度表达可改善心肌组织中高脂血症、抑制心肌细胞凋亡、减轻心肌损伤、氧化应激和炎性损伤以及抑制Wnt/ $\alpha$ -catenin信号通路在心肌组织中的异常激活。Li等的结果部分验证了Yin等发现的LncRNA GAS5在冠心病患者血浆中下调现象及其在冠心病发生中的保护作用,LncRNA GAS5可能是一种有前景的冠心病生物标志物或者治疗靶标。

## 3 LncRNA GAS5在糖尿病发生发展中的作用

糖尿病是一种代谢性疾病,它是动脉粥样硬化心脑血管疾病发病的重要相关因素<sup>[32-33]</sup>。Carter

等采用 qRT-PCR 方法对 96 份美国退伍军人血清标本进行 LncRNA GAS5 水平分析,结果表明,血清 LncRNA GAS5 水平降低与 2 型糖尿病相关,血清 LncRNA GAS5 下调的个体相比其他个体有 12 倍的几率罹患糖尿病。受试者工作特性曲线显示,当曲线下面积为 0.81 时,血清 LncRNA GAS5 qRT-PCR 分析法有 85.1% 敏感性,67.3% 特异性去区分 2 型糖尿病与非糖尿病个体。总之,2 型糖尿病患者血清中下降的 LncRNA GAS5 水平可能可以作为糖尿病的诊断标志物<sup>[34]</sup>。在另外一项同样关于 LncRNA GAS5 与 2 型糖尿病关系的研究中,Shi 等<sup>[35]</sup>同样发现了 2 型糖尿病患者血清中 LncRNA GAS5 水平下降的现象,LncRNA GAS5 的下降导致脂肪组织葡萄糖摄取减少,进一步分析发现,LncRNA GAS5 通过调控胰岛素信号通路中的关键酶-蛋白激酶 B 的磷酸化水平,来调控葡萄糖的代谢。为进一步了解 LncRNA GAS5 的作用机制和作为治疗 2 型糖尿病的潜在候选药物的可能性,仍有必要在小鼠模型上进行系统的体内研究,以进一步评估 LncRNA GAS5 的治疗潜力。

总而言之,LncRNA GAS5 在动脉粥样硬化疾病中可以促进血管内皮细胞和 THP-1 巨噬细胞的凋亡,促进血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移,从而促进动脉粥样硬化的发生;同时,LncRNA GAS5 还与冠心病和糖尿病发生发展密切相关,是动脉粥样硬化、冠心病和糖尿病的诊断和治疗新潜在靶标。但是,总体而言,目前关于 LncRNA GAS5 在动脉粥样硬化及相关疾病发生发展中的作用的研究数量仍然较少,研究的内容仍然不够全面,有待后续研究进一步揭示。

## 参考文献

- [1] Kopp Florian, Mendell Joshua. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3):393-407.
- [2] Bao Meihua, Szeto Vivian, Yang Burton, Zhu Shuzhen, Sun Hongshuo, Feng Zhongping. Long Non-Coding RNAs in Ischemic Stroke[J]. Cell Death and Dis, 2018, 9(3):e281.
- [3] Kondo Yutaka, Shinjo Keiko, Katsushima Keisuke. Long Non-Coding RNAs as an Epigenetic Regulator in Human Cancers[J]. Cancer Sci, 2017, 108(10):1927-1933.
- [4] Atianand Maninjay, Caffrey Daniel, Fitzgerald Katherine. Immunobiology of Long Noncoding RNAs[J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35(1):177-198.
- [5] Schneider Claudio, King Robert, Philipson Lennart. Genes Specifically Expressed at Growth Arrest of Mammalian Cells[J]. Cell, 1988, 54(6):787-793.
- [6] Caldwell Kevin, Hafez Alexander, Solomon Elizabeth, Cunningham Matthew, Allan Andrea. Arsenic Exposure During Embryonic Development Alters the Expression of the Long Noncoding RNA Growth Arrest Specific-5 (GAS5) in a Sex-Dependent Manner[J]. Neurotoxicol and Teratol, 2018, 66(1):102-112.
- [7] Chen LiuJun, Chen Lang, Zuo Luoshiyuan, Gao Ziang, Shi Yingying, Yuan Peipei, et al. Short Communication: Long Noncoding RNA GAS5 Inhibits Hiv-1 Replication through Interaction with miR-873[J]. AIDS Res Human Retroviruses, 2018, 34(6):544-549.
- [8] Lyu Kexing, Xu Yang, Yue Huijun, Li Yun, Zhao Jing, Chen Lin, et al. Long Noncoding RNA GAS5 Acts as a Tumor Suppressor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Via miR-21[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11(1):8487-8498.
- [9] Goustin Anton, Thepsuwan Pattaraporn, Kosir Mary, Lipovich Leonard. The Growth-Arrest-Specific (GAS)-5 Long Non-Coding RNA: A Fascinating LncRNA Widely Expressed in Cancers[J]. Non-coding RNA, 2019, 5(3):e46.
- [10] Mourtada - Maarabouni miRNA, Hedge Vanessa, Kirkham Lucy, Farzaneh Farzin, Williams Gwyn. Growth Arrest in Human T-Cells Is Controlled by the Non-Coding RNA Growth-Arrest-Specific Transcript 5 (GAS5). J Cell Sci, 2008, 121(7):939-946.
- [11] Mourtada - Maarabouni miRNA, Pickard Mag, Hedge Vanessa, Farzaneh Farzin, Williams Gwyn. GAS5, a Non-Protein-Coding RNA, Controls Apoptosis and Is Downregulated in Breast Cancer. Oncogene, 2009, 28(2):195-208.
- [12] He Xiaoying, Zhao Xuan, Su Le, Zhao Baoxiang, Miao Junying. MROH7 - TTC4 Read - through LncRNA Suppresses Vascular Endothelial Cell Apoptosis and Is Upregulated by Inhibition of ANXA7 GTPase Activity[J]. FEBS J, 2019, 5(1):e15038.
- [13] Luo Yanli, Fang Zhao, Ling Youpeng, Luo WanJun. LncRNA-H19 Acts as a ceRNA to Regulate HE4 Expression by Sponging miR - 140 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells under Hyperglycemia with or without Alpha-Mangostin[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118(1):e109256.
- [14] Chen Lei, Yao Hong, Hui Jiyuan, Ding Shenghao, Fan Yiling, Pan Yaohua, et al. Global Transcriptomic Study of Atherosclerosis Development in Rats[J]. Gene, 2016, 592(1):43-48.
- [15] Liang Weijie, Fan Taibing, Liu Lin, Zhang Lianzhong. Knockdown of Growth-Arrest Specific Transcript 5 Restores Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Impaired Autophagy Flux Via Upregulating miR - 26a in Human Endothelial Cells[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 843(1):154-161.

- [16] Yao Jiamei, Shi Zanhua, Ma Xinhua, Xu Daomiao, Ming Guangfeng. LncRNA GAS5/miR-223/NAMPT Axis Modulates the Cell Proliferation and Senescence of Endothelial Progenitor Cells through PI3K/AKT Signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9):14518-14530.
- [17] Silva Telma, Jager Willi, Neuss-Radu Maria, Sequeira Adelia. Modeling of the Early Stage of Atherosclerosis with Emphasis on the Regulation of the Endothelial Permeability [J]. *J Theor Bio*, 2020, 1: e110229.
- [18] Zheng Bin, Yin Weina, Suzuki Toru, Zhang Xinhua, Zhang Yu, Song Lili, et al. Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(6):1279-1294.
- [19] Li Linqing, Li Yongjun, Tang Chengchun. The Role of MicromRNAs in the Involvement of Vascular Smooth Muscle Cells in the Development of Atherosclerosis [J]. *Cell Bio In*, 2019, 43(10):1102-1112.
- [20] Li Yihui, Qin Ranran, Yan Hongdan, Wang Feng, Huang Shanying, Zhang Yun, et al. Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cells Premature Senescence with Rutin Attenuates and Stabilizes Diabetic Atherosclerosis [J]. *J Nnut Biochem*, 2018, 51: 91-98.
- [21] Zhang Qinghai, Hu Jie, Wu Yan, Luo Hairong, Meng Wen, Xiao Bo, et al. RHEB (Ras Homolog Enriched in Brain 1) Deficiency in Mature Macrophages Prevents Atherosclerosis by Repressing Macrophage Proliferation, Inflammation, and Lipid Uptake [J]. *Arterioscler, Thromb, Vas Biol*, 2019, 39(9):1787-1801.
- [22] Zhang Xianfeng, Yang Yang, Yang Xinyu, Tong Qian. miR-188-3p Upregulation Results in the Inhibition of Macrophage Proinflammatory Activities and Atherosclerosis in Apoe-Deficient Mice [J]. *Thromb Res*, 2018, 171(1):55-61.
- [23] Liu Kefeng, Liu Chen, Zhang Zhengyu. LncRNA GAS5 Acts as a ceRNA for miR-21 in Suppressing PDGF-bb-Induced Proliferation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9):15233-15240.
- [24] Tang Rui, Mei Xiaohan, Wang Yungchun, Cui Xiaobing, Zhang Gui, Li Wenjing, et al. LncRNA GAS5 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Cycle Arrest and Apoptosis Via P53 Pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(9):2516-2525.
- [25] Sun Yuechen, Xu Lan, Tan Ying. Long Non-Coding RNA GAS5 Promotes PDGF-bb-Induced Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Via Regulating miR-137/IGFBP-5 [J]. *Immunol J*, 2018, 34(10):856-862.
- [26] Shen Songhe, Zheng Xiaoli, Zhu Zhixiang, Zhao Sen, Zhou Qing, Song Zhiming, et al. Silencing of GAS5 Represses the Malignant Progression of Atherosclerosis through Upregulation of miR-135 [J]. *Biomed and Pharmacother*, 2019, 118(1):e109302.
- [27] Chen Lei, Yang Wenjin, Guo Yijun, Chen Wei, Zheng Ping, Zeng Jinsong, et al. Exosomal LncRNA GAS5 Regulates the Apoptosis of Macrophages and Vascular Endothelial Cells in Atherosclerosis. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0185406.
- [28] Polak Joseph, Ouyang Pamela, Vaidya Dhananjay. Total Brachial Artery Reactivity and First Time Incident Coronary Heart Disease Events in a Longitudinal Cohort Study: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0211726.
- [29] Jiang Dan, Sun Min, You Linna, Lu Kai, Gao Lei, Hu Chunxiao, et al. DNA Methylation and Hydroxymethylation Are Associated with the Degree of Coronary Atherosclerosis in Elderly Patients with Coronary Heart Disease [J]. *Life Sci*, 2019, 224(1):241-248.
- [30] Yin Qiong, Wu Anshuang, Liu Manhua. Plasma Long Non-Coding RNA (LncRNA) GAS5 Is a New Biomarker for Coronary Artery Disease [J]. *Med Sci Monitor*, 2017, 23(1): 6042-6048.
- [31] Li Xuexiang, Hou Linlin, Cheng Ziping, Zhou Shu, Qi Jinwei, Cheng Jinglin. Overexpression of GAS5 Inhibits Abnormal Activation of Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway in Myocardial Tissues of Rats with Coronary Artery Disease [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):11348-11359.
- [32] Poznyak Anastasia, Grechko Andrey, Poggio Paolo, Myasodova Veronika, Alfieri Valentina, Orekhov Alexander. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5):e1835.
- [33] Yuan Ting, Yang Ting, Chen Huan, Fu Danli, Hu Yangyang, Wang Jing, et al. New Insights into Oxidative Stress and Inflammation During Diabetes Mellitus-Accelerated Atherosclerosis [J]. *Redox Biol*, 2019, 20(1):247-260.
- [34] Carter Gay, Miladinovic Branko, Patel Achintya, Deland Lauren, Mastorides Stephen, Patel Niketa. Circulating Long Noncoding RNA GAS5 Levels Are Correlated to Prevalence of Type 2 Diabetes Mellitus [J]. *BBA Clin*, 2015, 4(1):102-107.
- [35] Shi Yan, Patel Niketa, Cai Jianfeng. Discovery of a Macrocytic Gamma-Aapeptide Binding to LncRNA GAS5 and Its Therapeutic Implication in Type 2 Diabetes [J]. *Future Med Chem*, 2019, 11(17):2233-2235.

# 基于实时荧光 RT-PCR 的新型冠状病毒的不同标本类型核酸检测

周刚<sup>1</sup> 李超<sup>1</sup> 郑国栋<sup>1</sup> 柳洪涛<sup>1</sup> 周荣荣<sup>1</sup> 王洪涛<sup>1</sup> 王刚平<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨不同标本类型在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测中的阳性检出率,为疫情的防控提供指导与建议。方法 收集2020年1月至2020年2月本院收集的2 258例疑似SARS-CoV-2感染患者口咽拭子、鼻咽拭子、痰液标本及粪便标本共3 284人份,采用实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)法进行PCR扩增,SPSS 19.0软件进行结果统计分析。结果 3 284人份样本中共检出阳性样本79人份,其中男性13例,女性7例,性别阳性检出率差异无统计学意义( $P < 0.05$ );将同时检测一种样本类型与两种样本类型阳性检出率进行统计分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示增加样本类型可以提高阳性检出率。不同样本类型核酸检测结果显示口咽拭子阳性检出率最低,鼻咽拭子、痰液标本相对口咽拭子较高,而粪便标本阳性检出率最高(本组粪便的样本量较小)。而同一疑似感染者、同一时间不同标本类型病毒核酸检测结果显示阳性检出率差异无统计学意义。结论 实时荧光 RT-PCR 法针对不同样本类型阳性检出率有差异,可为实验室检测中样本的选择及更好的防控疫情提供指导。

**[关键词]** 实时荧光 RT-PCR; 阳性检出率; 新型冠状病毒; 咽拭子

## Nucleic Acid Detection of Different Specimen Types of SARS-CoV-2 Base on Real-time Fluorescent RT-PCR

ZHOU Gang<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>, ZHENG Guodong<sup>1</sup>, LIU Hongtao<sup>1</sup>, ZHOU Rongrong<sup>1</sup>, WANG Hongtao<sup>1</sup>, WANG Gangping<sup>2\*</sup>

(1. Department of Microbiological Laboratory, Rizhao Center for Disease Control and Prevention, Rizhao, Shandong, China, 276826; 2. Central Laboratory & Clinical Molecular Diagnosis Center, Rizhao clinical molecular medicine research center, Rizhao key laboratory of precision medicine, Rizhao People's Hospital, Rizhao, Shandong, China, 276800)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the positive detection rate of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in different samples, in order to provide guidance and suggestions for the prevention and control of epidemic. Methods A total of 3 284 throat swabs, nasopharyngeal swabs, sputum specimens and fecal specimens were collected from 2 258 SARS-CoV-2 suspected patients who were admitted in our hospital from January 2020 to February 2020. The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used for PCR amplification, and SPSS19.0 software was used for statistical analysis. Results A total of 79 positive samples were detected among 3 284 samples, A statistical analysis was performed on the positive detection rates of different sample types tested at the same time, and the difference

基金项目:日照市科技研发计划项目(2019KJYF319)

作者单位:1.日照市疾病预防控制中心微生物检验科,山东,日照 276826

2.日照市人民医院中心实验室,临床分子诊断中心,日照市分子临床研究中心,日照市精准医学重点实验室,山东,日照 276800

\*通信作者:王刚平, E-mail:wgprzph93@126.com

was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There are 13 male suspects and 7 females in this study. respectively, no statistically significant difference in gender positive detection rates ( $P > 0.05$ ). The results from different sample types showed that the positive detection rate of throat swabs was the lowest, nasopharyngeal swabs and sputum samples were higher than throat swabs. Interestingly, the positive detection rate of fecal samples was the highest (although the sample number in this group was small, compared to other types). However, there was no significant difference in the positive rate of the same suspected patient with different sample types at the same time. Conclusion The RT-PCR method has different positive detection rates for different sample types, which can provide guidance for the selection of samples in laboratory testing and better prevention and control of epidemics.

[KEY WORDS] Real-Time Polymerase Chain Reaction; Positive rate; SARS-CoV-2; throat swabs

新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2, SARS-CoV-2)感染正席卷全球多个国家爆发流行,感染人数不断攀升<sup>[1]</sup>。截止到2020年3月26日,SARS-CoV-2在我国确诊人数已超过8万余人,全球其他国家感染人数已达37万余人并不断持续上升,对全球公共卫生安全构成了巨大威胁<sup>[2]</sup>。SARS-CoV-2的传染源有SARS-CoV-2感染患者及无症状感染者<sup>[3]</sup>,尤其是无症状感染者的存在可导致疑似感染者及密切接触者数量大量增加,加速疫情的蔓延。新型冠状病毒肺炎的诊断基于流行病学史、临床表现及影像学表现,而病毒的核酸检测可为其诊断提供直接证据<sup>[4-5]</sup>,促进患者的隔离、治疗和评估,同时还能为疫情防控中心及时切断传播途径、有效控制传染源提供指导,保障疫情的防控。根据新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版),可采用基因测序、实时荧光聚合酶链反应(Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)对SARS-CoV-2感染者进行病毒核酸检测进而确诊患者,而RT-PCR技术因其操作简单、耗时短、成本低而在临床上得到广泛应用<sup>[6]</sup>。本研究采用实时荧光RT-PCR法对疑似SARS-CoV-2感染患者进行了SARS-CoV-2核酸检测,及时对疑似患者进行快速有效的诊断,为疫情防控提供支持及指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

收集2020年1月至2020年2月送至本中心的2 258例疑似SARS-CoV-2感染患者标本共3 284人份,其中,男性1380例(61.12%),女性878例(33.88%);年龄范围为6个月~91岁,平均年龄为(35.49±16.13)岁。将符合《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》疑似病例描述的疑似感染

者标本均纳入本研究中,采样失败或者流行病学史不明确、临床表现不符合者均剔除。

### 1.2 试剂和仪器

病毒核酸提取试剂盒、病毒核酸提取仪 Smart 32、荧光定量 RT-PCR 试剂均为中山大学达安基因股份有限公司提供;阳性标本复核试剂由上海伯杰医疗科技有限公司提供;PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit由德国 Qiagen 公司提供,Applied Biosystems™ QuantStudio™ 1&3&5(以下简称 Q5)实时定量 PCR 仪由美国赛默飞世尔科技公司提供。

### 1.3 标本前处理与病毒 RNA 提取

提前将水浴箱预热至 56℃,在生物安全柜内用 75%乙醇对装有标本的密封袋进行喷洒消毒,用吸水纸擦拭后放入浴锅中的试管架上,标本盖搁置重物防止试管架浮动。每隔 10 min 将标本轻轻摇匀 1 次,灭活时间为 45 min<sup>[7-8]</sup>。将灭活好的标本从水浴锅中取出,在生物安全柜内对密封袋进行消毒,打开密封袋后,即时用 75%酒精消毒。

咽拭子/痰液:取出样本后混匀,参照病毒核酸提取试剂盒说明书进行操作,加入 20 μL 蛋白酶 K,吸取离心后的标本悬液上清 200 μL,加入到预混的深孔板,于生物安全柜静置 10 min 后,置于病毒核酸提取仪 Smart 32 上提取病毒核酸。程序运行结束后,吸取核酸转置于 1.5 mL 离心管,直接用于实时荧光 RT-PCR。由于 RNA 容易降解,短暂存放可置于-20℃冷冻,长时间保存需置于-70℃或以下。

粪便标本:将送检标本取黄豆粒大小(约 0.25g)置于 1.5 mL 离心管中,采用 PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit 粪便 RNA 提取试剂盒提取粪便中的核酸,严格按照说明书进行操作。

### 1.4 PCR 扩增

采用新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂

盒(荧光PCR法)针对 *ORF1ab* 基因和核壳蛋白 N 基因进行 PCR 扩增,使用仪器为 Q5 实时定量 PCR 仪,扩增程序如下:50°C 15 min;95°C 15 min;94°C 15 s;55°C 45 s,45 个循环;结果判读:如果检测标本在 FAM 和 VIC 通道无扩增曲线或 Ct 值>40,且 Cy5 通道有扩增曲线,可判样品未检测到 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)RNA;如果检测标本在 FAM 和 VIC 通道 Ct 值≤40,且有明显的扩增曲线,可判样品为 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)阳性;如果检测标本仅在 FAM 或 VIC 单一通道 Ct 值≤40,另一通道无扩增曲线,结果需复检,复检结果一致可判样品为 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)阳性,复检均为阴性可判断为未检测到 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)RNA。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行数据处理,计数资料用  $n(\%)$  表示,计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 疑似 SARS-CoV-2 感染者检测结果

共收集 2 258 例疑似 SARS-CoV-2 感染者标本 3 284 人份,其中 1 539 例为单份样本;824 例为双份标本,921 例为三份标本;因 921 人份样本中只检测出 1 份阳性,故不纳入统计;将单一样本类型与两种样本类型阳性检出率进行统计分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),增加样本类型可以提高阳性检出率 3 284 人份样本中共检出阳性样本 79 人份;其中包括男性疑似感染者 13 例,女性 7 例,性别阳性检出率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

此外,在对 20 例疑似感染者重新采样复检时发现,有 4 例疑似感染者检测结果出现三次阴阳互转的现象,还有 1 例疑似感染者多次口咽拭子、鼻咽拭子核酸检测结果均呈阴性,而痰液标本检测结果呈阳性的现象。

### 2.2 不同样本类型核酸检测结果

采用实时荧光 PCR 方法检测,结果显示,在四种样本类型中,鼻咽拭子与痰液标本检测结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而其他三种样本类型与其它样本类型检测结果的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中口咽拭子阳性检出率最低,鼻咽拭子、痰液标本相对口咽拭子较高,而粪便标本阳性检出率最高(本组粪便的样本量较小)。详见表 2。

表 1 疑似 SARS-CoV-2 感染者核酸检测结果及男女阳性检出率比较 [ $n(\%)$ ]

Table 1 Nucleic acid detection results of SARS-CoV-2 suspected patients and the positive rate in Male and Female groups [ $n(\%)$ ]

组别	检测人份数	阳性份数	阴性份数
单一样本类型	1 539	41(2.66)	1 498(97.34)
两种样本类型	824	37(4.49)	787(95.51)
三种样本类型	921	1(0.11)	920(99.89)
总计	3 284	79(2.41)	3 205(97.59)
$\chi^2$ 值*		5.607	
$P$ 值*		0.021	
男	1 380	13(0.94)	1 367(99.06)
女	878	7(0.79)	871(99.21)
总计	2 258	20(0.89)	2 238(99.11)
$\chi^2$ 值		0.128	
$P$ 值		0.820	

注:\*为单一样本类型与两种样本类型统计值。三种样本类型中阳性检出份数为 1 例,不符合统计学要求,不纳入统计

表 2 疑似 SARS-CoV-2 感染者不同类型标本核酸检测结果比较 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Comparison of nucleic acid detection results of SARS-CoV-2 suspected patients [ $n(\%)$ ]

样本类型	检测人份数	阳性份数	阴性份数	$\chi^2$ 值	$P$ 值
口咽拭子	1 545	19(1.23)	1 526(98.77)		
鼻咽拭子	1 268	33(2.60)	1 235(97.40)	7.233	0.007
痰液标本	455	18(3.96)	437(96.04)	14.388	0.000
粪便标本	16	9(56.25)	7(43.75)	272.144	0.000
鼻咽拭子	1 268	33(2.60)	1 235(97.40)		
痰液标本	455	18(3.96)	437(96.04)	2.136	0.145
粪便标本	16	9(56.25)	7(43.75)	143.725	0.000
痰液标本	455	18(3.96)	437(96.04)		
粪便标本	16	9(56.25)	7(43.75)	78.218	0.000

### 2.3 同一疑似感染者、同一时间不同标本类型病毒核酸检测结果

303 人次同一时间同时取口咽拭子、鼻咽拭子及痰液标本采用实时荧光 RT-PCR 的方法进行病毒检测,3 种样本类型中仅痰液标本检出 1 人份阳性,3 种标本相比,阳性检出率差异无统计学意义( $P > 0.05$ );4 人次同一时间同时取口咽拭子、鼻咽拭子及粪便标本进行检测,未检出阳性样本;280 人次同一时间同时取口咽拭子和鼻咽拭子标本进

行检测,两者阳性检出率差异无统计学意义( $P>0.05$ );132人次同一时间同时取鼻咽拭子和痰液

标本进行检测,两者阳性检出率差异无统计学意义( $P>0.05$ );见表3。

表3 同一疑似感染者、同一时间不同标本类型核酸检测结果 [ $n(\%)$ ]

Table 3 SARS-CoV-2 nucleic acid detection results at the same time in the same suspected patient with different sample types

[ $n(\%)$ ]						
疑似感染者例数(例)	样本类型	检测样本份数(份)	阳性	阴性	$\chi^2$ 值	$P$ 值
303	口咽拭子	303	0(0.00)	303(100.00)	1.820	1.000
	鼻咽拭子	303	0(0.00)	303(100.00)		
	痰液标本	303	1(0.33)	302(99.67)		
	总计	909	1(0.11)	908(99.89)		
4	口咽拭子	4	0(0.00)	4(100.00)	/	/
	鼻咽拭子	4	0(0.00)	4(100.00)		
	粪便标本	4	0(0.00)	4(100.00)		
	总计	12	0(0.01)	12(100.00)		
280	口咽拭子	280	7(2.50)	273(97.50)	0.079	0.788
	鼻咽拭子	280	6(2.14)	274(97.86)		
	总计	560	13(2.32)	547(97.68)		
132	鼻咽拭子	132	10(7.58)	122(92.42)	0.733	0.521
	痰液标本	132	14(10.61)	118(89.39)		
	总计	264	24(9.09)	240(90.91)		

### 3 讨论

目前,全球疫情仍处于严峻的形势。且 SARS-CoV-2 感染尚未有特效治疗方法,及早发现感染者仍为疫情防控的关键。病毒的核酸检测可快速诊断 SARS-CoV-2 感染,为临床治疗提供依据、为防控隔离提供指导,阻止疫情扩散。

本研究针对疑似 SARS-CoV-2 感染者的口咽拭子、鼻咽拭子、痰液标本及粪便标本的检出阳性检出率与其他研究者阳性检出率差异比较大<sup>[9]</sup>,主要原因为疫情发病地域不同,疫情与非疫情区;单一样本类型与两种样本类型阳性检出率的统计结果提示,对高度可疑的病人,临床有必要增加标本类型,提高阳性检出率。此外,本研究中性别阳性检出率差异无统计学意义,该统计结果也与 Rui Liu 等<sup>[9]</sup>的结果不一致,在国内其他研究中也有报道重症患者中男性多于女性<sup>[10]</sup>,这可能与本研究来自非疫情区,阳性样本数过少有关。

本研究还观察到 4 例疑似感染者检测结果出现三次阴阳互转的现象,还有 1 例疑似感染者多次口咽拭子、鼻咽拭子核酸检测结果均呈阴性,而痰液标本检测结果呈阳性的现象。疫情爆发后,有研究针对 SARS-CoV-2 核酸检测假阴性问题进行

过探讨,造成假阴性的原因有很多,标本采集、检测方法、产品稳定性等因素都可能影响检测结果<sup>[11-12]</sup>;有报道称拭子样本采用目前现有的 RT-PCR 试剂盒,阳性检出率预估值为 30%~50%<sup>[13]</sup>。因此,在确诊 SARS-CoV-2 感染的过程中应综合分析疑似患者的流行病学史、临床症状以及影像学证据,必要时多次、多样本类型综合检测以避免假阴性结果。

目前 SARS-CoV-2 核酸检测最常用的标本类型为口/鼻咽拭子,有研究显示口咽拭子阳性检出率最低,与本研究结论一致<sup>[14]</sup>。SARS-CoV-2 最早确认的传播途径是飞沫传播和接触传播,随着对 SARS-CoV-2 病毒的研究与核酸检测的科技攻关,且有研究首次在确诊病例粪便中检测到了 SARS-CoV-2 病毒<sup>[15]</sup>,使得粪便标本在临床患者筛查中成为重要的样本类型;本研究中粪便样本取样不多,大多数为初次/多次检测阳性者,故粪便样本阳性检出率高达 56.25%,与吴冰珊等<sup>[16]</sup>的研究结论一致。

临床反馈及研究都显示单一的咽拭子样本进行病毒核酸检测时会出现时阴时阳的现象,或出现咽拭子多次检测阴性而粪便核酸检测阳性的情况。因此,本研究对同一疑似感染者、同一时间不同标本类型病毒核酸检测结果进 (下转第 418 页)

## 两种灭活方法对 2019 新型冠状病毒咽拭子标本病毒核酸检测结果的影响

姜蕾<sup>1</sup> 张丽媛<sup>2</sup> 刘大宁<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸提取前,两种不同灭活方法分别处理咽拭子标本,对于荧光定量 PCR 检测结果的影响。方法 将 3 例 2019 新型冠状病毒阳性标本各采用两种不同灭活方法处理,未灭活,56℃灭活 30 min 和加入胍盐 RNA 保存液灭活 3 组样本分别用手工离心柱法提取核酸,采用两种不同核酸检测试剂同时检测病毒含量,对 qPCR 结果进行统计学分析。结果 两种不同核酸检测试剂结果显示,未灭活、56℃灭活 30 min 和加入胍盐 RNA 保存液灭活 3 组结果相关性明显,三组之间相关系数均在 0.98 以上( $P<0.001$ )。未灭活、56℃灭活 30 min 和加入胍盐 RNA 保存液灭活三组结果差异均在 1 以下,具有较好的一致性。结论 56℃灭活 30 min 和胍盐 RNA 保存液灭活标本,对 2019 新型冠状病毒核酸荧光定量 PCR 结果无影响。

**[关键词]** 2019 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;荧光定量 PCR 检测

### The effect of 2 different inactivation methods on the results of viral nucleic acid in 2019 new coronavirus throat swab specimens

JIANG Lei<sup>1</sup>, ZHANG Liyuan<sup>2</sup>, LIU Daning<sup>2\*</sup>

(1. Laboratory of Puyang Oilfield General Hospital, Puyang, Henan, China, 457001; 2. Laboratory of Puyang people's Hospital, Puyang, Henan, China, 457000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the effect of two different pharyngeal swab specimens inactivation methods on the results of 2019 new coronary virus fluorescent quantitative PCR. Method Three cases of 2019 new coronary virus positive specimens were treated by two different inactivation methods, the nucleic acids were extracted by manual centrifugation method from three groups of samples, which were inactivated at 56℃ for 30 minutes and inactivated with guanidine salt RNA preservation solution. Simultaneous detection of virus content with two different nucleic acid detection kits, the results of qPCR were analyzed statistically. Result The results of two different nucleic acid detection reagents showed that, the results of the three groups, which were not inactivated, inactivated at 56℃ for 30 minutes and inactivated with guanidine salt RNA preservation solution, were significantly correlated and had good consistency. The correlation coefficients among the three groups were all above 0.98 ( $P<0.001$ ). Conclusion 2019 new coronary virus nucleic acid qPCR results were not affected by the two inactivation methods.

**[KEY WORDS]** 2019 new coronary virus; Novel coronary virus pneumonia; qPCR

2019 新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)是一种单链 RNA 冠状病毒,基因组序列由 29 903 bp 构成,该基因组拥有 10 个基因,可

以有效地编码 10 个蛋白。2019-nCoV 可引起呼吸道感染,目前 WHO 已确定其感染所致肺炎统一命名为“新型冠状病毒肺炎(Novel coronavirus pneu-

作者单位:1. 濮阳市油田总医院检验科,河南,濮阳 457001

2. 濮阳市人民医院检验科,河南,濮阳 457000

\*通信作者:刘大宁, E-mail:mengqfoo@163.com

monia, NCP)”。目前,新型冠状病毒肺炎并没有特定的治疗方法,早期诊断与早期隔离是防止疫情扩散的关键,因此,及时筛查出确诊病人是疫情控制的首要任务<sup>[1-2]</sup>。在最新版本(新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案)的诊疗方案中,新型冠状病毒核酸的检出是确诊依据,荧光定量 PCR 技术为新型冠状病毒核酸检测的主要方法<sup>[3]</sup>。新型冠状病毒具有较强的传染性,在进行核酸检测过程中,实验室的检测人员具有较大的感染风险。本研究比较两种不同咽拭子标本灭活方法对荧光定量 PCR 实验结果的影响,为防止实验室内感染和传播,保护实验室检测人员的安全提供有效的安全方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2020 年 2 月 1 日以来濮阳地区确诊病例 3 例,依据《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第四版)》和《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》,符合相关流行病学、临床表现,以及咽拭子检测 2019-nCoV 核酸阳性。

### 1.2 试剂和仪器

病毒 RNA 提取试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供,荧光定量 RT-PCR 试剂由中山大学达安基因股份有限公司(试剂 A)和上海之江生物科技股份有限公司提供(试剂 B)。RNA 样本保存液由广州邦德盛生物科技有限公司提供。荧光定量 PCR 仪为 ABI7500 (Life Technologies, NY, USA)。

### 1.3 标本采集与处理

被采集人员先用生理盐水漱口,采样人员将拭子放入无菌生理盐水中湿润,被采集人员头部微仰,嘴张大,露出两侧咽扁桃体,将拭子越过舌根,在被采集者两侧咽扁桃体稍微用力来回擦拭至少 3 次,然后再在咽后壁上下擦拭至少 3 次,将拭子头浸入含 2~3 mL 病毒保存液的管中,尾部弃去,旋紧管盖。

每份标本分为三组,每组提取 140  $\mu$ L,分别采用三种处理方法,未灭活加入 280  $\mu$ L 生理盐水,56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 后加入 280  $\mu$ L 生理盐水和加入 280  $\mu$ L 胍盐 RNA 保存液灭活。

### 1.4 核酸提取

中山大学达安基因股份有限公司的核糖核酸

(RNA)抽提试剂盒,在生物安全柜内对咽拭子样本进行核酸提取,严格按照说明书上的操作步骤提取病毒提取液。

### 1.5 上机检测

使用两种不同的核酸检测试剂对样本进行实时荧光定量 PCR 检测。

### 1.6 统计学分析

Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析。Spearman 相关系数对不同处理的标本 CT 值进行相关性分析,采用 Bland-Altman 图对 CT 值一致性进行分析。

## 2 结果

### 2.1 3 组 qPCR 结果相关性分析

用试剂 A 检测,未灭活组与 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组 CT 值相关性分析, Spearman 相关系数为  $r=0.9959$  ( $P<0.001$ );未灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值相关性分析,相关系数为  $r=0.9958$  ( $P<0.001$ );56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值相关性分析,相关系数为  $r=0.9966$  ( $P<0.001$ ),见图 1。用试剂 B 检测,未灭活组与 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组 CT 值相关性分析, Spearman 相关系数为  $r=0.9886$  ( $P<0.001$ );未灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值相关性分析,相关系数为  $r=0.9967$  ( $P<0.001$ );56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值相关性分析,相关系数为  $r=0.9915$  ( $P<0.001$ ),见图 2。用试剂 A 与试剂 B 两种不同的试剂同时检测,未灭活组、56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组和加入胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果相关性明显。

### 2.2 3 组 qPCR 结果一致性分析

用试剂 A 检测,未灭活组与 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组 CT 值差异性分析,偏差=0.3055(图 3a);未灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值差异性分析,偏差=0.2335(图 3b);56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组与胍盐保存液灭活组 CT 组差异性分析,偏差=0.2640(图 3c)。用试剂 B 检测,未灭活组与 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组 CT 值差异性分析,偏差=0.1643(图 4a);未灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 CT 值差异性分析,偏差=0.06325(图 4b);56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 组与胍盐保存液灭活组 CT 组差异性分析,偏差=0.1472(图 4c)。Bland-Altman 分析结果显示,用试剂 A 与试剂 B 两种不同的试剂盒同时检测,未灭活组、

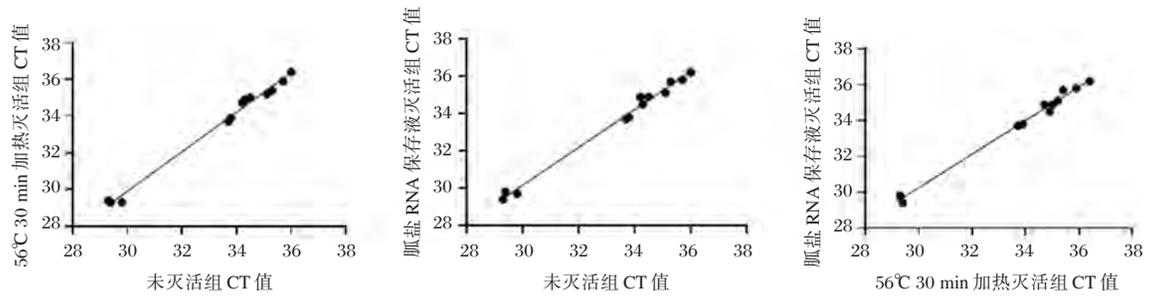


图1 未灭活组,56°C 30 min 加热灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果相关性分析(试剂 A)

Figure 1 Correlation analysis of qPCR results among the un-inactivated group , the inactivated group heated at 56°C for 30 minutes and the guanidine inactivation group (detection kit A)

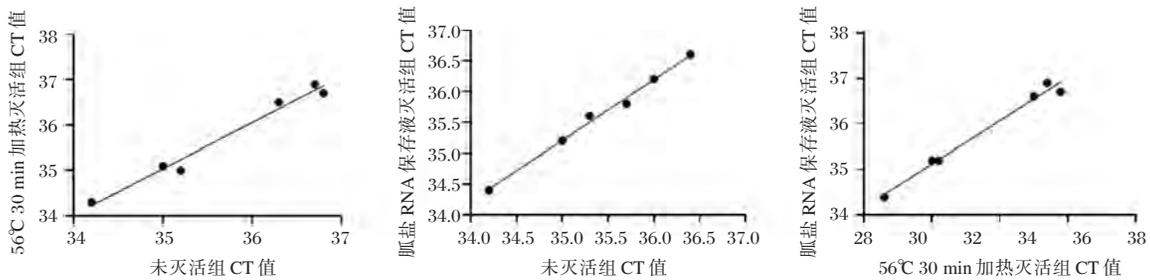


图2 未灭活组,56°C 30 min 加热灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果相关性分析(试剂 B)

Figure 1 Correlation analysis of qPCR results among the un-inactivated group , the inactivated group heated at 56°C for 30 minutes and the guanidine inactivation group (detection kit B)

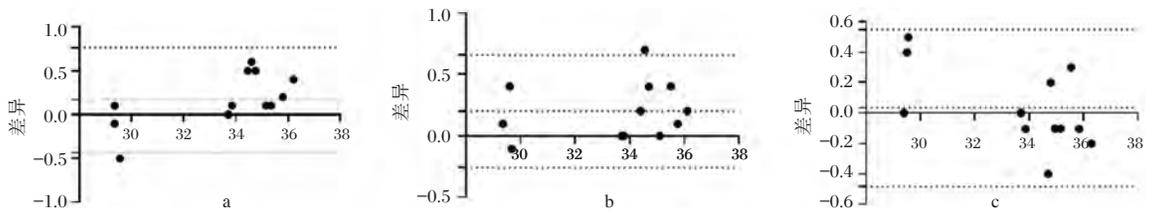


图3 未灭活组,56°C 30 min 加热灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果一致性分析(试剂 A)

Figure 3 Consistency analysis of qPCR results among the un-inactivated group , the inactivated group heated at 56°C for 30 minutes and the guanidine inactivated group (detection kit A)

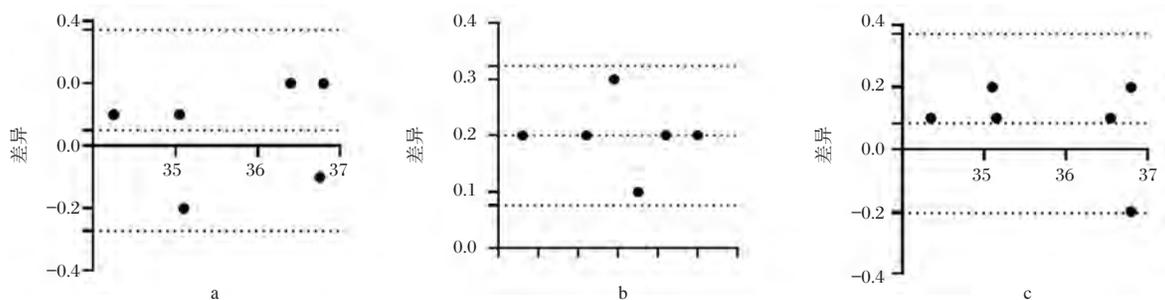


图4 未灭活组,56°C 30 min 加热灭活组与胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果一致性分析(试剂 B)

Figure 4 Consistency analysis of qPCR results among the un-inactivated group , the inactivated group heated at 56°C for 30 minutes and the guanidine inactivated group (detection kit B)

56℃灭活 30 min 组和加入胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果具有较好的一致性。

### 2.3 不同检测试剂对同一种标本处理方法下检测结果一致性分析

试剂 A 与试剂 B 检测结果 CT 值差异性分析, 偏差=1.031(图 5)。Bland-Altman 分析结果显示, 两种试剂盒检测同一标本, qPCR 结果具有良好的—致性。

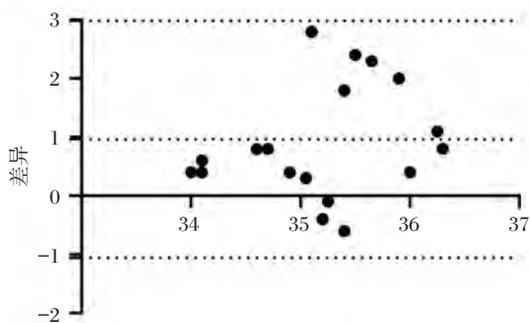


图 5 两种检测试剂对同一标本处理方法下检测 qPCR 结果一致性分析

Figure 5 Consistency analysis of qPCR results between the two test reagents treated the same specimen

## 3 讨论

新型冠状病毒属于  $\beta$  属的冠状病毒, 有包膜, 颗粒呈圆形或者椭圆形, 常为多形性, 直径 60~140 nm。其基因特征与 SARA-CoV 和 MERS-CoV 有明显区别。目前研究显示与蝙蝠 SARS 样冠状病毒 (bat-SL-CoVZC45) 同源性达 85% 以上。对冠状病毒理化特征的认识多来自对 SARA-CoV 和 MERS-CoV 的研究。病毒对紫外线和热敏感, 56℃ 30 min、乙醚、75% 乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒, 氯已定不能有效灭活病毒。经呼吸道飞沫和密切接触传播是主要的传播途径<sup>[4]</sup>。在相对封闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播的可能。检验人员在做好生物安全防护外, 在不影响结果的前提下, 若能在检测前将标本进行灭活处理, 将大大降低感染的几率<sup>[5]</sup>。本研究通过 2019 新型冠状病毒样本核酸提取前, 用两种不同灭活方法分别处理咽拭子标本, 对荧光定量 PCR 检测

结果进行统计学分析。

本研究选用两种灭活方法处理咽拭子标本, 56℃ 30 min 加热灭活和胍盐病毒保存液灭活。胍盐可使蛋白质变性, 溶解蛋白质并使蛋白质二级结构消失, 导致细胞结构降解, 核蛋白迅速与核酸分离。胍盐可对新型冠状病毒 2019-nCoV 临床样本进行蛋白质变性而起到灭活作用, 大大降低了检验过程中的生物传染风险。胍盐不仅具有沉淀蛋白质的作用, 还具有抑制核酸酶的作用, 从而保证释放出来的核酸不被降解。

本研究用两种新型冠状病毒核酸检测试剂同时检测, Spearman 相关系数对不同处理的标本 CT 值进行相关性分析后得出, 未灭活组、56℃ 灭活 30 min 组和加入胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果相关性明显。Bland-Altman 分析结果显示, 未灭活组、56℃ 灭活 30 min 组和加入胍盐 RNA 保存液灭活组 qPCR 结果具有良好的一致性。

综上所述, 56℃ 灭活 30 min 组和加入胍盐 RNA 保存液灭活对于检测 2019-nCoV 核酸结果无影响, 可在检测前灭活以降低检验人员感染风险。在后续的研究中, 需加大标本量, 将有助于进一步明确不同灭活处理对于检测结果的影响。

## 参考文献

- [1] Wang D, Hu B, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. JAMA. 2020 Feb 7; 10.1001/jama.2020.1585.
- [2] Hui David S, I Azhar Esam, Madani Tariq A, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China [J]. Int J Infect Dis: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases, 2020, 91: 246-246.
- [3] 许金和, 王水良, 张胜行, 等. 新型冠状病毒核酸检测方法. 国际检验医学杂志. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20200303.1428.002.html>.
- [4] 国家卫生健康委. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第七版) [EB/OL]. 2020. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.
- [5] 薛雄燕, 朱嫦琳, 黄少珍, 等. 灭活血液样本对不同方法检测 2019 新型冠状病毒抗体检测结果的影响 [J/OL]. 南方医科大学学报. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20200228.1733.002.html>.

## 15例新型冠状病毒肺炎患者(COVID-19)的临床表现和CT影像学特征分析

陈少金<sup>1</sup> 王晓霞<sup>1</sup> 王立程<sup>1</sup> 陈海<sup>1</sup> 张猛<sup>2\*</sup>

**[摘要]** **目的** 分析新型冠状病毒肺炎患者(COVID-19)的临床表现和CT影像学特征,进一步提高对该疾病的认识。**方法** 对2020年1月以来本院确诊的15例新型冠状病毒肺炎患者的临床表现和CT影像学特征进行回顾性分析。**结果** 本组病例以男性为主66.7%(10/15),年龄25~71岁之间,年龄中位数为54岁(四分位间距为37~65),大多为50岁以上患者(53.3%,8/15),15例均有疫区接触史(100%)。临床表现为发烧、咳嗽、干咳或有白色粘液痰,部分伴有胸闷、气促和乏力。患者胸部CT影像表现均处于病变早期和进展期,主要为双肺多个肺叶的斑片状磨玻璃样密度影,以胸膜下肺外周带分布为主,边缘模糊。可伴有血管增粗,胸膜增厚,支气管充气征和纵膈内淋巴结增多。15例患者针对新型冠状病毒ORF1ab和N基因的核酸检测均为阳性,且73.3%(11/15)患者的超敏C-反应蛋白升高。**结论** 新型冠状病毒肺炎患者(COVID-19)发病早期以发热、咳嗽为主,均存在胸部CT检查异常。流行病学调查、临床表现、胸部CT影像学特征分析以及核酸检测等实验室检查结果相结合,有助于新型冠状病毒肺炎患者早期筛查与防控。

**[关键词]** 新型冠状病毒肺炎;临床表现;CT影像学特征

### Analysis of the clinical manifestations and computed tomography characteristics of patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19)

CHEN Shaojin<sup>1</sup>, WANG Xiaoxia<sup>1</sup>, WANG Licheng<sup>1</sup>, CHEN Hai<sup>1</sup>, ZHANG Meng<sup>2\*</sup>

(1. Clinical Laboratory of Sanya People's Hospital, Sanya, Hainan, China, 572000; 2. Radiology department of Sanya People's Hospital, Sanya, Hainan, China, 572000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the clinical presentations and computed tomography characteristics of coronavirus disease-2019 (COVID-19) and to further improve the understanding of the disease. **Methods** A retrospective analysis and summary of the clinical manifestations and CT imaging features were performed based on 15 patients with COVID-19 diagnosed in our hospital since January 2020. **Results** Most patients diagnosed in this study were men, 67% (10/15), aged 25 to 71 years, with a median age of 54 years (interquartile range of 37 to 65). Most of them were over 50 years old (53.3%, 8/15). All 15 cases had a history of contact with the affected area (100%). The clinical manifestations are fever, cough, dry cough or sputum with white mucus, some accompanied by chest tightness, shortness of breath and fatigue. Most patients were in early or advanced disease stages, according to the chest imaging manifestations. They have a ground-glass patchy shadow in bilateral pulmonary multi-lobular lesions predominantly in the subpleural regions, blurred lesion margins. They were also accompanied by thickening of blood vessels, thickening of the pleura, bronchial inflation and increased lymph nodes in the mediastinum in some cases. 15 patients have positive nucleic acid tests for the

基金项目:海南省重点研发计划项目(ZDYF2019149,ZDYF2017163)

作者单位:1. 三亚市人民医院检验科,海南,三亚 572000

2. 三亚市人民医院放射科,海南,三亚 572000

\*通信作者:张猛, E-mail: zanmon@163.com

novel coronavirus *ORF1ab* and N genes. In addition, 93% (14/15) of patients have high level of hypersensitivity C-reactive protein. **Conclusion** COVID-19 patients have fever and cough at the early stage and there are abnormal chest CT examinations. The combination of epidemiological investigations, clinical manifestations, chest CT imaging characteristics analysis, and nucleic acid detection and other laboratory test results will help early screening, prevention and control of COVID-19.

**[KEY WORDS]** Coronavirus disease - 2019; Clinical manifestations; Computed tomography characteristics

2019年12月,湖北省武汉市出现多例不明原因性肺炎患者。通过对患者肺泡灌洗液等样本进行全基因组测序,PCR和细胞培养等病原学研究,最终确定此次不明原因性肺炎的病原体为一种新的 $\beta$ 冠状病毒,分类学地位属于*Sarbecovirus*亚病毒属*orthocoronavirinae*亚科<sup>[1]</sup>。目前暂被命名为2019新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)或严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome 2, SARS-CoV-2)。WHO将该病毒引起的肺炎命名为新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)。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,按甲类传染病管理。随着疫情的蔓延,2019-nCoV在中国迅速传播,截止4月19日,全国累计确诊病例84 237例,其中累计治愈77 895例,累计死亡4 642例。同时,包括韩国、泰国、日本、美国、越南和德国在内的多个国家/地区也相继出现COVID-19确诊病例<sup>[2]</sup>。WHO自2020年2月1日起宣布COVID-19为国际关注的突发公共卫生事件<sup>[3]</sup>。目前,准确、可靠的流行病学,临床表现和实验室数据对于指导公共卫生决策非常重要,有助于疫情的防控。为进一步了解新型冠状病毒肺炎确诊患者的临床特点和规律,本研究对本院的15例确诊病例的临床及CT影像学特征进行了分析总结。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

依据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》中诊断标准确诊,收集2020年1月25日以来,在三亚市人民医院确诊的15例COVID-19病例。针对疑似病例经实时荧光RT-PCR检测新型冠状病毒核酸阳性确诊。15例确诊患者回顾性资料收集的主要内容包括患者一般情况、流行病学史、主要临床表现以及暴露史和胸部CT影像学检

查结果等,资料真实可靠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试剂与仪器

一次性使用病毒采样管(广州迪澳生物科技有限公司,T310-04/T320-04);一次性使用真空采样管(海南天辰医疗设备科技有限公司,5 mL);核酸提取或纯化试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司,DA0633);新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司,DA0930);全自动核酸提取仪(广州市达安医疗器械有限公司,DA3200);实时荧光扩增仪(美国ABI,7500);全自动五分类血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,BC-5390);全自动五分类血液细胞分析仪专用试剂:M-53D稀释液、LC溶血剂、M-5LE0(I)、M-5LE0(II)、M-53LH溶血剂、M-53P探头清洗液、C-反应蛋白(CRP)测定试剂盒(乳胶免疫比浊法);全自动生化仪(日立,7600-020);CT扫描仪(美国GE公司,LightSpeed 16)。

#### 1.2.2 样本采集

口咽拭子样本采集:①疑似患者,用拭子擦拭扁桃体和咽喉壁,将拭子头浸入含核酸保存液管中,旋紧管盖;②血液样本采集:疑似患者,用含有乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝剂的一次性使用真空采样管采集静脉血液样本约3 mL;样本采集后放入标本运送箱,立即送检。

#### 1.2.3 核酸检测

用于核酸检测的咽拭子样本经56℃ 30 min灭活病毒后,取1 mL咽拭子样本核酸保存液,按照核酸提取或纯化试剂盒说明书要求,利用全自动核酸提取仪进行核酸提取;按照新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒说明书进行操作,检测结果按说明书进行判断。

#### 1.2.4 影像学检查

采用GE LightSpeed 16层CT扫描仪对患者进

行胸部CT影像学检查,管电压为120 kV,管电流为200 mA,螺距为1.375:1,扫描层厚为5 mm,层距为5 mm,矩阵采用512×512;扫描范围由肺尖至肺底,肺窗窗位、窗宽:L为-500HU,W为1 500 HU;纵隔窗窗位、窗宽:L为50 HU,W为300 HU。

### 1.2.5 其它实验室检查

通过血液分析仪进行疑似患者血液样本血常规项目检测,通过乳胶免疫比浊法,使用全自动生化仪对疑似患者进行C-反应蛋白检测。

### 1.3 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行统计学分析,正态计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,非正态计量资料用中位数(M)和四分位间距(IQR)表示,计数资料采用 $n(\%)$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

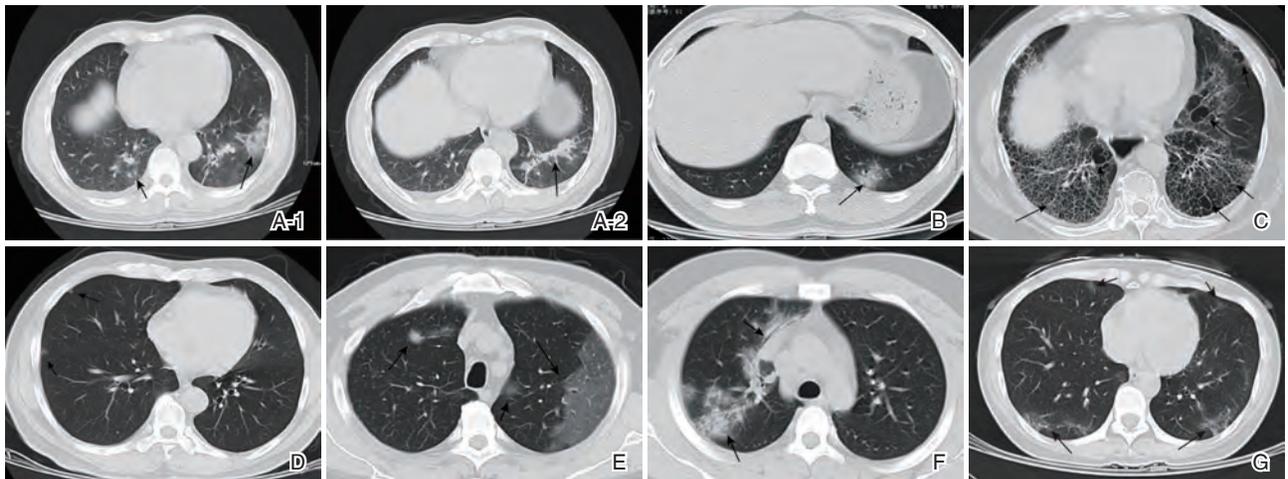
男性占66.7%(10/15),女性占33.3%(5/15);年龄在25~71岁之间,年龄中位数为54岁(四分位间距为37~65),其中50岁以上为53.3%(8/15),30~40岁之间33.3%(5/15),20~30岁之间13.4%(2/15);15例患者就诊前均有武汉接触史(100%)。

### 2.2 临床表现

7例首诊症状资料未获得,余8例中,62.5%(5/8)因发热,咳嗽就诊,25%(2/8)因胸闷,咳嗽就诊,12.5%(1/8)无明显不适,因与确诊患者有接触而就诊。66.7%(10/15)患者临床表现表现为发烧、咳嗽、干咳或有白色粘液痰,部分伴有胸闷、气促和乏力等。13.3%(2/15)为轻型,86.7%(13/15)为普通型。就诊至今,患者均已治愈出院。

### 2.3 CT影像学表现

1例患者因转院未在本院行影像学检查,余14例患者中,按病变分布:双肺多肺叶病变9例(64.3%),单肺多叶(右肺上叶、中叶)病变2例(14.3%),单侧单叶病变3例(21.4%),即左肺下叶,右肺上叶,右肺中叶病变各1例。病变密度:磨玻璃样改变6例(42.9%),较磨玻璃样稍高密度改变3例(21.4%),实变1例(7.1%),磨玻璃样伴实变4例(28.6%)。病变形态:病灶呈斑片状8例(57.1%),其余病灶呈纤维条索状,细网格状伴蜂窝状,斑片状伴纤维条索状,斑片状伴细网格状,不规则团块状,结节状各1例。此外,2例伴有胸膜增厚,出现血管增粗,血管增粗伴胸膜增厚,支气管充气征,纵膈内淋巴结增多各1例。部分患者影像结果见图1。



图A,男,65岁,A-1,双肺多个肺叶见多发散在的小斑片状磨玻璃样密度影,部分实变,沿血管支气管束及胸膜下肺外周带分布,边缘模糊。A-2,左肺下叶可见明显纤维条索影。图B,男,37岁,左肺下叶基底段见不规则形团块状实变影,周围可见“晕征”病灶内可隐约见增粗的血管影穿行。图C,女,68岁,双肺透光度增高,右肺上叶、中叶及双肺下叶见广泛分布的细网格状、蜂窝状影,排列密集,大小不均。图D,男,59岁,右肺上叶、中叶胸膜下见多个亚实性小结节,最大径约3~5 mm,边界清,形态欠规则。右侧斜裂叶间胸膜稍增厚,图E,男,58岁,双肺炎症,靠近胸膜磨玻璃影,部分实变,伴小叶间隔增厚及“铺路石征”,其内血管影增粗。图F,男,25岁,右肺感染,右肺上叶斑片状实变影,其内可见支气管充气征,伴有外周小磨玻璃影。图G,女,54岁,双肺多个肺叶见多发散在的小斑片状磨玻璃样密度影,沿胸膜下肺外周带分布,背侧多见,边缘模糊。双肺下叶基底段见多发纤维条索影,沿胸膜下呈条片状分布,长轴与胸膜平行。

图1 部分COVID-19患者胸部CT影像结果

Figure 1 The chest CT imaging of partial COVID-19 patients

## 2.4 实验室检查

针对新型冠状病毒 *ORF1ab* 和 *N* 基因的核酸检测均为阳性; 33.3% (5/15) 白细胞计数降低, 13.3% (2/15) 白细胞计数升高; 13.3% (2/15) 淋巴细胞计数下降; 73.3% (11/15) 超敏 C-反应蛋白升高。60.0% (9/15) 嗜酸性粒细胞下降。

## 3 讨论

2019-nCoV 与 MERS-CoV 和 SARS-CoV 不同, 是感染人类的冠状病毒家族的第七个成员。2019-nCoV 与 SARS-CoV 基因组序列相似性为 75%~80%<sup>[1,4]</sup>, 并且与蝙蝠 SARS 样-CoV 基因组序列相似性高达 86.9%<sup>[1]</sup>, 认为中华菊头蝠可能为该病毒的原始宿主, 有研究从穿山甲中分离得到的冠状病毒与 2019-nCoV 基因组序列相似性高达 99%, 考虑穿山甲可能为 2019-nCoV 的潜在中间动物宿主<sup>[5]</sup>, 但中间宿主的确认仍有待进一步研究<sup>[6]</sup>。致病机理中, 2019-nCoV 与 SARS-CoV 具有相同的细胞受体(血管紧张素转换酶 2 受体, ACE2), 可能通过其表面的刺突蛋白与 ACE2 结合从而提高毒力, 进一步适应人类宿主<sup>[7-8]</sup>。并且有学者通过对来自不同国家的 86 个 2019-nCoV 基因组分析, 发现其存在较多缺失和突变<sup>[9]</sup>。

目前, COVID-19 的主要传染源为新型冠状病毒确诊感染患者和无症状感染者。主要经呼吸道飞沫传播和接触传播, 此外在确诊患者的粪便样本中也检测出该病毒, 考虑该病毒存在粪口传播风险的可能, 而气溶胶和母婴传播仍需相关研究证据证实<sup>[10-11]</sup>。针对分布在全国 31 个省的 44 672 例 COVID-19 确诊病例分析, 发现患者年龄在 30~79 岁为主, 男性较多, 且男性粗病死率高于女性, 大多有武汉暴露史, 且湖北省的粗病死率高于其它省份 7.3 倍<sup>[12]</sup>。本研究患者年龄以 30~71 岁为主 (86.7%), 男女比例为 2:1, 均有武汉疫区接触史, 与上述研究结果一致, 患者就诊及时, 目前均已治愈出院。相比之下, SARS 确诊病例中, 女性略高于男性, SARS 病毒的总体病死率为高于 COVID-19<sup>[13]</sup>。MERS 的病死率较高 (35%), 患者的平均年龄为 50 岁, 病例主要为男性 (66.6%), 来自沙特阿拉伯。年龄较大和潜在合并症被确定为严重 MERS 进展的主要危险因素<sup>[14]</sup>。

本研究 66.7% (10/15) 患者临床表现为发烧、咳嗽、干咳或有白色粘液痰, 部分伴有胸闷、气促

和乏力等。此外有研究表明少数患者会出现呕吐、腹泻和头痛, 轻型占 4.5%, 普通型占 69.9%, 重型患者占 25.5%, 25.2% 患者合并高血压、糖尿病以及慢性阻塞性肺疾病等基础疾病<sup>[15]</sup>。实验室检查提示, 73.3% 患者超敏 C-反应蛋白均存在不同程度升高, 可作为临床诊断中辅助诊断的灵敏指标。依据病理可将 COVID-19 分为早期、进展期和重症期, 本研究患者处于早期和进展期, 影像学主要表现为双肺多个肺叶的斑片状磨玻璃样密度影, 病灶以胸膜下肺外周带分布为主, 边缘模糊。可伴有血管增粗, 胸膜增厚, 支气管充气征和纵膈内淋巴结增多, 与其它研究结果相似<sup>[16]</sup>。目前 CT 影像学对于 COVID-19 诊断的特异性尚不明确, 需注意与其他细菌性、病毒性、支原体和衣原体性肺炎相鉴别, 同时作为辅助诊断必须结合临床、影像学、流行病学资料进行综合分析, 才能确诊 COVID-19 患者。目前临床上出现了一些胸部 CT 检测高度疑似, 而 2019-nCoV 核酸检测阴性病例, 需要开发更高灵敏和特异的检测技术, 助力临床上的防控需求。针对该病毒的不同核酸测试剂盒的效能评价缺少第三方数据, 随着假阴性核酸检测结果的报告, 需开展测试剂盒的灵敏度、特异度研究。此外新型冠状病毒肺炎疫情防控上, 仍需加强疫情监测信息报告, 针对疑似患者要做到早发现、早报告、早诊断、早隔离、早治疗, 同时要加强对密切接触者的排查, 以及返程返岗人员的核酸筛查, 院内感染和社区的防控。

## 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 Eng J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [2] Gardner L. 2019n - CoV Global Cases. <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6> (2 February 2020, date last accessed).
- [3] Chaolin H, Yeming W, Xingwang L, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223).
- [4] Hui DS, I Azhar E, Madani TA, et al. The continuing COVID-19 epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China [J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 91: 264-266.
- [5] Lam TT-Y, Shum MH-H, Zhu H-C, et al. Identification of 2019-nCoV related coronaviruses in Malayan pangolins in southern China [J]. *bioRxiv*. 2020:2020.2002.2013.945485.

- [6] Liu P, Jiang J-Z, Wan X-F, et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)? [J]. bioRxiv. 2020;2020.2002.2018.954628.
- [7] Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J]. Sci China Life Sci, 1-4 [2020-02-27]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5841.q.20200204.1852.046.html>.
- [8] Yushun W, Jian S, Rachel G, et al. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS [J]. J virol, 2020.
- [9] Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2 [J]. Infection, Genet Evol, 2020, 81: 104260.
- [10] World Health Organization. Question and answer on coronaviruses. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses>. 11 February 2020.
- [11] Zhu H, Wang L, Fang C, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mother with 2019-nCoV pneumonia. Translational Pediatrics 2020 DOI: 10.21037/tp.2020.02.06 [published Online First: 2020/02/10].
- [12] 中国疾病预防控制中心新型冠状病毒肺炎应急响应机制流行病学组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41 (2020-02-17). <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1181998.htm>. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003. [网络预发表].
- [13] Leung GM, Hedley AJ, Ho LM et al. The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients [J]. Ann Intern Med, 2004, 141:662-73.
- [14] Rivers CM, Majumder MS, Lofgren ET. Risks of death and severe disease in patients with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, 2012-2015 [J]. Am J Epidemiol, 2016, 184:460-64.
- [15] Guan W NZ, Hu Y, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. medRxiv preprint 2020 DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.02.06.20020874>.
- [16] 史河水, 韩小雨, 樊艳青, 梁波, 杨帆, 韩萍, 郑传胜. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎临床特征及影像学表现 [J]. 临床放射学杂志. <https://doi.org/10.13437/j.cnki.jcr.20200206.002>.

(上接第409页)

行统计分析,结果显示与王云等的结论一致<sup>[17]</sup>,多样本类型的一致性可为临床提供更清晰明确的指导。

目前,SARS-CoV-2仍属于未知病毒,人类对其在体内的活动过程尚未完全清晰掌握,仍需要更多的研究来支持与指导临床工作。本研究提示多种标本类型的联合检测可能提高检出率,为防控切断传播途径,尤其是无症状感染者的传播提供更准确的判断。

## 参考文献

- [1] Wang C, Horby P W, Hayden F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. Lancet, 2020, 395 (10223):470-473.
- [2] 新型冠状病毒肺炎疫情分布 [Z]. 2020;2020.
- [3] 陈蕾, 谢俊刚. 《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》解读 [J]. 医药导报: 1-6.
- [4] Chu D, Pan Y, Cheng S, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia [J]. Clin Chem, 2020.
- [5] Corman V M, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. Euro Surveill, 2020, 25(3).
- [6] 许金和, 王水良, 张胜行, 等. 新型冠状病毒核酸检测方法 [J]. 国际检验医学杂志: 1-19.
- [7] Farcet M R, Kreil T R. Zika virus is not thermostable: very effective virus inactivation during heat treatment (pasteurization) of human serum albumin [J]. Transfusion, 2017, 57 (3pt2):797-801.
- [8] Leclercq I, Batejat C, Burguiere A M, et al. Heat inactivation of the Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. Influenza Other Respir Viruses, 2014, 8(5):585-586.
- [9] Liu R, Han H, Liu F, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020 [J]. Clin Chim Acta, 2020, 505:172-175.
- [10] 韩皎, 董咸峰, 胡芬, 等. 核酸阳性新型冠状病毒感染 120 例临床特征分析 [J]. 广东医学: 1-4.
- [11] 王开利, 张昕, 申立军, 等. 初筛阴性的新型冠状病毒肺炎患者 1 例 [J]. 传染病信息, 2020, 33(1): 70-74.
- [12] 高维寅, 张洪, 罗阳. 新型冠状病毒肺炎核酸检测中的假阴性分析及对策~(\*) [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(6): 641-647.
- [13] 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(5): 523-526.
- [14] 李宝林, 李芹, 吴刚, 等. 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本新型冠状病毒核酸检测结果比较 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(3):239-244.
- [15] 吴冰珊, 俞婷婷, 黄枝妙, 等. 新型冠状病毒肺炎确诊病例粪便标本的病毒核酸检测 [J]. 中国人兽共患病学报: 1-4.
- [16] 王云, 周柳如, 何子毅, 等. 东莞市新型冠状病毒肺炎患者不同部位标本病毒核酸检测阳性率比较 [J]. 广东医学: 1-3.

## 高灵敏度HCV RNA检测在术前筛查中的应用

何宇婷<sup>1</sup> 陈雪芳<sup>2</sup> 陈培松<sup>1</sup> 黄浩<sup>1</sup> 余学高<sup>1</sup> 黄彬<sup>1\*</sup>

**【摘要】**目的 探讨高灵敏度HCV RNA检测在术前筛查中的应用。方法 收集2019年1月至10月间本院术前筛查患者血清标本1 005例,同时采用化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)和高灵敏度实时荧光定量PCR法分别检测血清中的HCV抗体和HCV RNA载量。对HCV抗体S/CO值与高灵敏度HCV RNA定量检测结果进行比较与相关性分析,并对HCV抗体S/CO值预测丙型肝炎病毒血症的效能进行评价。**结果** 1 005例血清标本中,HCV抗体阳性标本228例,阳性检出率为22.7%,未检出HCV抗体阴性而HCV RNA阳性标本;在HCV抗体阳性的样本中,高灵敏度实时荧光定量PCR法检测出HCV RNA阳性样本83例,检出率为36.4%;HCV抗体S/CO值的高低与HCV RNA定量值之间无相关性。以HCV抗体S/CO值 $\geq 10.7$ 作为预测丙型肝炎病毒血症的临界值,其灵敏度与特异度分别为92.59%和77.93%,可较好地预测HCV病毒血症。**结论** 高灵敏度HCV RNA定量检测用于术前筛查丙型肝炎患者,可以准确反映患者体内病毒的复制情况和传染性,与传统的术前筛查方法相比,可区分现症感染和既往感染,并具有快速、灵敏和特异的优点,有良好的临床应用价值。

**【关键词】** 丙型肝炎;高灵敏度HCV RNA检测;术前筛查;化学发光微粒子免疫分析法

### Application of high-sensitivity HCV RNA detection in preoperative screening

HE Yuting<sup>1</sup>, CHEN Xuefang<sup>2</sup>, CHEN Peisong<sup>1</sup>, HUANG Hao<sup>1</sup>, YU Xuegao<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510080; 2. Nanfang College of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China, 510970)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the application of high-sensitivity HCV RNA detection in preoperative screening. **Methods** A total of 1 005 serum samples were collected from the preoperative screening patients in the Hospital, Sun Yat-sen University from January to October 2019. HCV antibodies and HCV RNA were detected using chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). The comparison and correlation analysis between the S/CO value of HCV antibody and the high-sensitivity HCV RNA test results were performed. The predictive efficacy of HCV antibody S/CO value for hepatitis C viremia was evaluated. **Results** Among the 1 005 serum samples, 228 were positive for HCV antibody, and the positive rate was 22.7%. HCV RNA were not detected from HCV antibody-negative specimens. High-sensitivity FQ-PCR method detected 83 HCV RNA positive cases and the positive rate was 36.4%. There was no correlation between the HCV antibody S/CO value and the HCV RNA quantitative value. Using the critical S/CO value  $\geq 10.7$  with a sensitivity and specificity of 92.59% and 77.93% respectively can reduce the false positive rate for predicting hepatitis C viremia. **Conclusion** High-sensitivity HCV RNA quantitative detection is applied for the preoperative screening of patients with hepatitis C, which can accurately reflect the virus replication and infectivity in patients. Compared with the

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313143)

作者单位:1. 中山大学附属第一医院检验医学部,广东,广州 510080

2. 中山大学南方学院,广东,广州 510970

\*通信作者:黄彬, E-mail:hb906@163.com

traditional preoperative screening method, FQ-PCR can distinguish the current infection from the previous infection, and has the advantages of rapid, sensitive and specific, and good clinical application value.

[KEY WORDS] Hepatitis C virus; High-sensitivity HCV RNA detection; Preoperative screening; Chemiluminescence microparticle immunoassay

丙型肝炎病毒(viral hepatitis type C, HC), 简称丙型肝炎,由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起,是世界性重大卫生问题之一。据报道,丙型肝炎病毒在2015年全球的流行率达到1%,相当于全球有7110万丙肝患者<sup>[1]</sup>。HCV感染后,基因组RNA只在宿主细胞中复制翻译,并不会把病毒基因组整合到宿主染色体上,经过有效治疗,丙型肝炎可以被彻底治愈<sup>[2]</sup>。HCV多呈隐匿性感染,少数表现为急性肝炎,易向慢性肝炎转变,75%~85%的急性丙肝可发展为慢性肝炎,甚至进一步发展为肝硬化和肝癌<sup>[3]</sup>。HCV主要通过血液传播,同时医源性传播的风险也较高,特别是对于器官移植的病人及血透与腹膜透析的病人。为有效防止医源性HCV感染,术前必须对HCV感染进行筛查。目前临床上在术前筛查中主要通过免疫学方法对HCV抗体进行检测,从而达到对丙型肝炎的初步筛查。该方法可反映患者HCV感染的免疫状态,但易漏检隐匿性感染或感染初期机体未产生特异性抗体的窗口期感染者。HCV RNA检测能直接反映体内HCV的复制情况,对丙型肝炎患者做出正确诊断。本研究对术前筛查患者分别采用高灵敏度实时荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)法检测HCV RNA和化学发光微粒子免疫分析法(chemiluminescence microparticle immunoassay, CMIA)检测HCV抗体,对检测结果进行比较,分析两种方法的优势和劣势,探讨高灵敏度HCV RNA检测在术前筛查中的应用价值,为临床医生准确诊断丙型肝炎和区分现症和既往感染提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集2019年1月至10月间中山大学附属第一医院术前筛查患者血清标本1005例。血清标本分成两份,一份用于HCV抗体检测,另一份保存于-80℃备用,用于HCV RNA检测,避免反复冻融。

### 1.2 主要试剂与仪器

Architect anti-HCV试剂盒购自美国Abbott公

司;高灵敏度HCV RNA检测试剂盒与核酸提取纯化试剂购自中山大学达安基因股份有限公司,高灵敏度HCV RNA检测试剂盒灵敏度为20 IU/mL,线性范围50~10<sup>8</sup> IU/mL;Architect-i2000SR免疫分析仪购自美国Abbott公司,ABI 7500型荧光定量PCR仪购自美国Life Technologies公司,Smart 32型半自动核酸提取仪购自中山大学达安基因股份有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 血清中HCV抗体的检测

根据试剂盒说明书,采用CMIA法,用Architect-i2000SR对HCV抗体进行检测,当HCV抗体的S/CO值大于或等于1时,判断为HCV抗体阳性。

#### 1.3.2 高灵敏度HCV RNA检测

按照核酸提取纯化试剂说明书,应用Smart 32半自动核酸提取仪对收集到的血清进行核酸提取。HCV RNA的扩增程序为:50℃ 15 min 1个循环;95℃ 15 min, 1个循环;94℃ 15 s, 55℃ 45 s, 45个循环。高灵敏度HCV RNA试剂盒的最低检测限为20 IU/mL,羧基荧光素(carboxy-fluorescein, FAM)荧光检测通道无明显对数增长,或定量结果低于高灵敏度HCV RNA试剂盒检测下限,判断为HCV RNA阴性;若FAM检测通道和VIC检测通道均有对数增长期,且定量结果大于20 IU/mL,判断为HCV RNA阳性。

#### 1.3.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行分析;应用Spearman进行相关性分析,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)对指标的诊断效能进行评价。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高灵敏度HCV RNA检测与CMIA法抗体检测结果的比较

在收集的1005例术前筛查样本中,HCV抗体阳性22.7%(228/1005)。228例HCV抗体阳性的样本中HCV RNA检测阳性为36.4%(83/228),HCV RNA检测阴性为63.6%(145/228)。HCV抗体阴性777例,未在抗体阴性的样本中检测到

HCV RNA 阳性的样本。见表 1。以高灵敏度 HCV RNA 检测作为 HCV 病毒血症金标准, CMIA 法检测 HCV 抗体反映 HCV 病毒血症的灵敏度与特异度分别为 100% 与 78.3%, 阳性预测值和阴性预测值分别是 36.4% 和 100%, 符合率为 85.6%。

### 2.2 HCV 抗体 S/CO 值与高灵敏度 HCV RNA 检测结果的比较及相关性分析

将 HCV 抗体阳性样本按照 S/CO 值进行分组, 见表 1。随着 S/CO 值的升高, 阳性率有所升高。同时做 S/CO 值与 HCV RNA 定量值的散点图, 进行相关性分析, 见图 1。线性拟合方程为  $Y=0.06617X+4.259$ 。Spearman 相关系数  $r^2=0.002$ ,  $P=0.69$ , 提示 HCV 抗体 S/CO 值的高低与 HCV RNA 定量值之间并无相关性。

表 1 HCV 抗体 S/CO 值与高灵敏度 HCV RNA 检测结果分布 [n(%)]

Table 1 Distribution of HCV antibody S/CO value and high-sensitivity HCV RNA detection results [n(%)]

S/CO 值	n	高灵敏度 HCV RNA 定量结果	
		阳性	阴性
4>S/CO≥1	87	1(1.1)	86(98.8)
8>S/CO>4	21	2(9.5)	19(90.5)
12>S/CO>8	29	15(51.7)	14(48.3)
16>S/CO>12	79	56(70.9)	23(29.1)
S/CO>16	12	9(75.0)	3(25.0)
合计	228	83(36.4)	145(63.6)

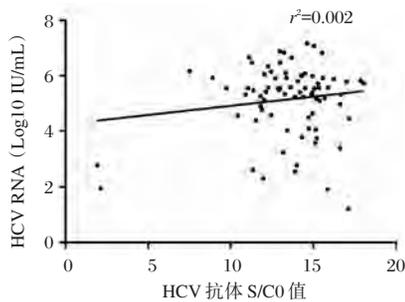


图 1 HCV 抗体 S/CO 值与高灵敏度 HCV RNA 定量检测结果的散点图

Figure 1 Scatter plot of HCV antibody S/CO value against high-sensitivity HCV RNA quantitative detection results

### 2.3 HCV 抗体 S/CO 值对预测丙型肝炎病毒血症的效能评价

HCV 抗体 S/CO 值对丙型肝炎诊断的 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.872 4, 由 ROC 曲线可算出, 以 S/CO 值≥10.7 作为预测 HCV

病毒血症的截断值, 即 cut-off 值时, 最大的约登指数 Youden's index 0.705 2, 此时的灵敏度与特异度分别为 92.59% 和 77.93%。以 S/CO 值≥1 作为初筛 HCV 病毒血症的临界值, 228 例 HCV 抗体阳性样本中, HCV RNA 阳性率只有 36.4%(83/228)。见图 2。

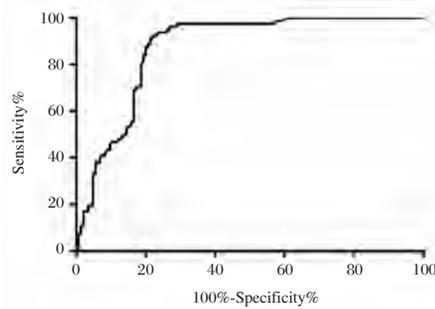


图 2 HCV 抗体 S/CO 值对预测丙型肝炎病毒血症的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of HCV antibody S/CO value for predicting hepatitis C viremia

## 3 讨论

临床上, 对于丙型肝炎感染者进行早期、及时、准确的诊断是临床治疗的关键。目前, 临床上检测 HCV 感染的方法主要有血清学检测技术和分子诊断检测技术。血清学检测即利用病毒抗原或针对病毒抗原的特异性抗体检测患者体内 HCV 血清标志物, 包括 HCV 抗体和 HCV 抗原<sup>[4]</sup>。通常情况下, 丙型肝炎抗体在患者感染 HCV 2 个月后才能被检测出来。因此, 丙型肝炎抗体的检测不能早期诊断 HCV 感染<sup>[5]</sup>。HCV 抗体检测易漏检感染窗口期、病毒隐匿性感染或者血清中病毒拷贝数极低的患者, 其检测具有一定的局限性。近年来, 高灵敏度荧光定量 PCR 通过设计针对病毒保守序列的特异性引物对病毒及其变异株进行检测, 直接检测病毒核酸, 是病毒感染的确证方法, 且 PCR 自动化程度随着科技发展越来越高, 操作趋于简单化, 在临床上应用广泛。

Baleriola C 等<sup>[6]</sup>通过定量检测储存在 -20℃ 和 -70℃ 的 HCV RNA 血浆样本发现, -20℃ 储存 1.2 年以及 -70℃ 储存 9 年才会引起 HCV RNA 具有统计学差异的变化。本研究将血清标本置于 -80℃ 储存, 1 年之内检测 HCV RNA 并不会影响 HCV RNA 定量结果的准确性。在 228 例 HCV 抗体阳性标本中, 阳性率为 36.4%。这可能是由于某些 HCV 慢性感染者, HCV 抗体可持续阳性而血清

中 HCV RNA 因抗病毒治疗而处于极低复制水平或病毒已被清除,高灵敏度 HCV RNA 定量检测不到。之后对不同的 S/CO 值范围对应的 HCV RNA 检测结果进行分析,随着 S/CO 值的升高,阳性率似乎有所升高,通过 Spearman 相关性分析发现,HCV 抗体 S/CO 值与 HCV RNA 定量值之间无相关性,S/CO 值的高低不能反映 HCV 病毒体内的复制状况。随后 ROC 曲线分析表明,当 S/CO 的 cut-off 值为 10.7 时可获得良好的预测价值,临床上以 S/CO 值 $\geq 1$  作为初筛丙型肝炎病毒血症的 cut-off 值,在判断为 HCV 抗体阳性的样本中 HCV RNA 阳性检出率低,不能对 HCV 病毒血症进行较好的预测。Pan J, Kao HH 与 Ranjbar Kermani, F 等<sup>[7-9]</sup> 多数研究者通过检测 HCV 抗体阳性的样本均发现,以 S/CO 值 $\geq 1$  作为丙型肝炎病毒血症的 cut-off 值,存在一定比例的 HCV 抗体阳性而 HCV RNA 阴性的样本。基于上述优势,HCV 抗体检测可用于 HCV 感染者的筛查,而 HCV RNA 定量检测适用于 HCV 现症感染的确认、HCV 病毒载量分析以及对治疗结束后的疗效评估<sup>[10]</sup>。高灵敏度 HCV RNA 定量检测(最低检测限小于 15 IU/mL)已被美国疾病控制与预防中心、欧洲肝病学会、我国肝脏病学会和传染病学会推荐对 HCV 感染者进行检测<sup>[11]</sup>。

Ha J 等<sup>[12]</sup> 运用 HCV RNA 检测对 32 127 例 Architect anti-HCV 试剂盒检测为 HCV 抗体阴性的样本进行检测,发现 8 例(0.02%, 8/32 127) HCV RNA 阳性。陈冬等<sup>[13]</sup> 在 148 590 份 ELISA 法检测为 HCV 抗体阴性的标本中检测出 HCV RNA 阳性 298 例,阳性率为 0.2%。叶贤林等<sup>[14]</sup> 在 307 440 例 ELISA 法检测为 HCV 抗体阴性的标本中检测出 1 例 HCV RNA 样本,检测率为 0.000 325%。这可能是由于患者处于感染窗口期或者患者处于免疫抑制状态,无法产生或产生极低水平的特异性抗体。此外,也可能是 HCV 基因变异或亚型感染及隐匿性肝炎<sup>[15]</sup>。本研究未发现 HCV 抗体阴性而 HCV RNA 阳性标本,这可能与地区流行率有关,后续需扩大样本量以获得更准确的结果。

综上所述,高灵敏度 HCV RNA 的定量检测用于术前筛查丙肝感染者,窗口期短,能准确、及时地反映患者 HCV 感染状态,HCV 在患者体内的复制情况,与传统术前筛查方法相比,能区分现症感染与既往感染,可有效防止医源性传播。

## 参考文献

- [1] Blach S, Zeuzem S, Manns M, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2 (3): 161-176.
- [2] Jacobson IM, Lim JK, Fried MW. American Gastroenterological Association Institute Clinical Practice Update-Expert Review: Care of Patients Who Have Achieved a Sustained Virologic Response After Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Infection [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152 (6): 1578-1587.
- [3] 李红霞,魏泉德,周毅. 丙型肝炎病毒感染病毒清除机制研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2017, 17(9): 1275-1278.
- [4] 唐立红,杨桂洪,陈洁晶,等. 丙型肝炎流行病学及临床检验技术研究进展[J]. *实验与检验医学*, 2019, 37(4): 553-556.
- [5] 黄成军,程书权. 高灵敏度 HCV RNA 检测在慢性丙型肝炎患者中的诊断及治疗检测应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(5): 379-382.
- [6] Baleriola C, Johal H, Jacka B, et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20 degrees C and -70 degrees C [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9): 3163-3167.
- [7] Kao HH, Chen KS, Lin CL, et al. Utilization of Signal-to-Cutoff Ratio of Hepatitis C Virus Antibody Assay in Predicting HCV Viremia among Hemodialysis Patients [J]. *Nephron*, 2015, 130(2): 127-133.
- [8] Pan J, Li X, He G, et al. Reflex threshold of signal-to-cut-off ratios of the Elecsys anti-HCV II assay for hepatitis C virus infection [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10 (9): 1031-1034.
- [9] Ranjbar Kermani F, Sharifi Z, Ferdowsian F, et al. The Usefulness of Anti-HCV Signal to Cut-off Ratio in Predicting Viremia in Anti-HCV in Patients With Hepatitis C Virus Infection [J]. *Jundishapur J Microb*, 2015, 8(4): e17841.
- [10] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. *中华临床感染病志*, 2019, 13(1): 1-18.
- [11] European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016 [J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1): 153-194.
- [12] Ha J, Park Y, Kim HS. Signal-to-cutoff ratios of current anti-HCV assays and a suggestion of new algorithm of supplementary testing [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 498(11): 11-15.
- [13] 陈冬. 丙肝患者血清抗-HCV 和 HCV RNA 检测效果分析 [J]. *临床输血与检验*, 2016, 18(4): 374-376.
- [14] 叶贤林,郑欣,熊文,等. 血液核酸检测技术在常规筛查中的应用研究 [J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(Suppl.1): 91.
- [15] 朱胜,王莹,童元华,等. 适宜无偿献血人群中隐匿性丙型肝炎病毒感染状况的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(20): 2970-2971.

· 论 著 ·

## 乙醛脱氢酶2基因 Glu504Lys 多态性在汉族2型糖尿病患者人群中的分布特点

安宏亮<sup>1\*</sup> 江海燕<sup>2</sup> 张劲丰<sup>1</sup> 李炜焯<sup>2</sup> 苏荣<sup>1</sup> 何娴<sup>1</sup> 吕微风<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 分析2型糖尿病(T2DM)人群中乙醛脱氢酶2(ALDH2)基因Glu504Lys多态性的分布特点,探讨ALDH2基因504位点基因突变与空腹血糖、HbA<sub>1c</sub>水平及胰岛素抵抗的关系。方法 分析2016年4月至2017年12月于本院就诊的629例汉族受试者相关资料,分为体检对照组(402例)和2型糖尿病组(227例)。分析两组人群ALDH2各基因型的分布规律,比较两组人群ALDH2各基因型的HbA<sub>1c</sub>、空腹血糖及胰岛素抵抗的分布水平。结果 2型糖尿病组GL、LL突变基因型的比例分别是37.9%和7.0%,显著高于体检对照组的30.8%和3.2%( $P<0.05$ )。629例汉族受试者,GG型390例,GL型210例,LL型29例。随着ALDH2基因突变数量的增加,患2型糖尿病的风险增加,具体数据为:无突变GG型32.1%(125/390),杂合突变GL型41.0%(86/210),纯合突变LL型55.2%(16/29)。ALDH2基因突变是发生2型糖尿病的危险因素,OR值=1.578,95%置信区间为1.131~2.202。ALDH2基因突变对HbA<sub>1c</sub>水平的分布无影响( $P>0.05$ )。两组人群男女性别间ALDH2各基因型的分布均无差异( $P>0.05$ )。2型糖尿病组ALDH2各基因型的胰岛素抵抗指数(HOMA1-IR)、定量胰岛素敏感性检测指数(QUICKI)、空腹胰岛素敏感指数(ISI)分布水平均无显著差异( $P>0.05$ )。结论 汉族2型糖尿病患者人群ALDH2基因504位点发生突变的比例显著高于正常人群,Glu504Lys的突变是2型糖尿病发生的危险因素,但与空腹血糖、HbA<sub>1c</sub>以及胰岛素抵抗的水平无明显相关。

**[关键词]** 乙醛脱氢酶2; 2型糖尿病; 基因型; 多态现象; 遗传

### Distribution characteristics of Glu504Lys polymorphism of acetaldehyde dehydrogenase 2 gene in Type 2 Diabetes Mellitus in Han Nationality

AN Hongliang<sup>1\*</sup>, JIANG Haiyan<sup>2</sup>, ZHANG Jinfeng<sup>1</sup>, LI Weixuan<sup>2</sup>, SU Rong<sup>1</sup>, HE Xian<sup>1</sup>, LV Weifeng<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan, Guangdong, China, 528000; 2. Department of Clinical Laboratory, The first people's hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China 528000)

**[ABSTRACT]** Objective To analyze the distribution characteristics of the Glu504Lys polymorphism of the aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene in people with type 2 diabetes (T2DM) and to explore the relationship between ALDH2 gene mutation at position 504 and fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub> level and insulin resistance. Methods A retrospective study was conducted in 629 cases of physical examination and hospitalization in Foshan Traditional Chinese Medicine Hospital from April to December in 2016. There were 402 healthy controls and 227 patients with type 2 diabetes mellitus. The distribution of ALDH2 genotypes in the two groups was analyzed, and the distribution levels of HbA<sub>1c</sub>, fasting blood glucose and insulin resistance in ALDH2 genotypes of the two groups were compared. Results The proportions of GL and LL mutation genotypes in type 2 diabetes group were 37.9% and 7.0%, respectively, which were significantly higher than those in the physical examination control group (30.8% and 3.2% ( $P<0.05$ )). Among 629 Han subjects, 390

作者单位:1. 佛山市中医院检验医学中心, 广东, 佛山 528000

2. 佛山市第一人民医院检验科, 广东, 佛山 528000

\*通信作者:安宏亮, E-mail:438320079@qq.com

cases are GG, 210 GL and 29 LL. With the increase in the number of *ALDH2* gene mutations, the risk of type 2 diabetes increases. The specific data are: 32.1% (125/390) without mutation GG type, 41.0% (86/210) with heterozygous mutation GL type and homozygous mutation LL Type 55.2% (16/29). *ALDH2* gene mutation is a risk factor for type 2 diabetes, OR value = 1.578, 95% confidence interval is 1.131~2.202. *ALDH2* gene mutation has no effect on the distribution of HbA1C level ( $P>0.05$ ). There was no difference in the distribution of *ALDH2* genotypes between men and women in the 2 groups ( $P>0.05$ ). There was no significant difference in the distribution of insulin resistance index (HOMA1 - IR), quantitative insulin sensitivity test index (QUICKI) and fasting insulin sensitivity index (ISI) of each type of *ALDH2* genotype in type 2 diabetes group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The proportion of *ALDH2* gene mutation at position 504 in Han type 2 diabetes population is significantly higher than that in normal population. Glu504Lys mutation is a risk factor for type 2 diabetes, but it was not significantly related to fasting blood glucose, HbA1C and insulin resistance.

[KEY WORDS] Aldehyde dehydrogenase 2; Type 2 diabetes mellitus; Genotype; Polymorphism, genetic

乙醛脱氢酶 2 (acetaldehyde dehydrogenase 2, *ALDH2*) 是人体酒精代谢的关键酶之一, 为乙醛脱氢酶 19 种同工酶中活性最强的一种, 具有脱氢酶活性和酯酶活性, 参与人体大多数醛类物质代谢。*ALDH2* 基因位于染色体 12q24, 存在 G→A 单核苷酸突变(rs671), 导致编码氨基酸序列第 504 位的谷氨酸 (glutamic acid, G) 突变为赖氨酸 (lysine, L), 产生两种等位基因 (G、L) 和三种基因型 (GG 型、GL 型、LL 型), 各基因型 *ALDH2* 酶活性差异巨大。有研究显示 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点突变是糖尿病发生的危险因素<sup>[1-2]</sup>, 与 2 型糖尿病患者的血糖水平相关。在轻度饮酒的糖尿病患者中 *ALDH2* 突变基因携带者的 HbA<sub>1c</sub> 水平明显高于野生纯合型患者<sup>[3]</sup>。非饮酒 2 型糖尿病合并冠心病患者 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点突变发生率 47.80%, 远高于单纯冠心病患者的 22.0% 和健康者的 19.38%<sup>[4]</sup>。但 2 型糖尿病是多病因的复杂病, 遗传因素具有高度的异质性, 目前的报道还多为针对国外族群的基因组学方面的基础研究, 针对 *ALDH2* 基因型与糖尿病各血清生物化学指标水平的相关研究还较少见。本文旨在健康人群和 2 型糖尿病患者中 *ALDH2* Glu504Lys 多态性的分布特点, 分析 *ALDH2* 基因突变与血糖、HbA<sub>1c</sub> 和胰岛素抵抗水平之间的关系, 为临床的防治和诊疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

#### 1.1.1 基本情况

选择 2016 年 4 月至 2017 年 12 月于本院的诊断为 2 型糖尿病患者 227 例 (2 型糖尿病组), 受试

者资料完整, 男性 154 例, 女性 73 例, 年龄 18~90, (57.78±15.30) 岁。选取同期佛山市中医院体检中心的健康人群 402 例 (对照组), 男性 330 例, 女性 72 例, 年龄 17~87, (38.63±9.47) 岁。经统计分析显示, 男女性别间 *ALDH2* 各基因型分布无差异; 对照组老、中、青年龄段间 *ALDH2* 各基因型分布差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。具有可比性。

#### 1.1.2 纳入标准与排除标准

2 型糖尿病的诊断标准<sup>[5]</sup>, 按照 1999 年 WHO 糖尿病诊断新标准<sup>[5]</sup>: 有典型糖尿病症状加上随机血糖  $\geq 11.1$  mmol/L; 空腹血糖  $\geq 7.0$  mmol/L; 75 克葡萄糖耐量试验 2 小时血糖  $\geq 11.1$  mmol/L。纳入标准: 汉族人群, 年龄 20~80 岁, 2 型糖尿病组是确诊为 2 型糖尿病患者, 对照组是空腹血糖正常的一般健康人群。排除标准: 非汉族人群, 其他类型的糖尿病, 严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、严重血液病、遗传性疾病、其他严重疾病等。

#### 1.2 仪器与试剂

ABI 7500 型核酸扩增仪购自美国生命科技公司, BR 526-24 型全自动核酸杂交仪和 *ALDH2* 基因微阵列芯片法检测试剂盒购自上海百傲科技有限公司, G7 型全自动糖化血红蛋白分析仪及糖化血红蛋白检测试剂购自日本 TOSOH 株式会社, AU5400 全自动生化分析仪购自日本奥林巴斯株式会社, 血糖生化检测试剂购自德国德赛诊断系统有限公司, Centaur XP 型全自动化学发光免疫分析仪及胰岛素化学发光检测试剂购自德国西门子医疗系统有限公司。

#### 1.3 实验方法

空腹 (8 小时), 清晨采集外周静脉血 3~4

mL。糖化血红蛋白和 *ALDH2* 基因检测用乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝管,血糖和胰岛素的检测用分凝胶抗凝管;所有标本如不能立即检测,置 2~8℃保存,3 天内检测完毕。依据空腹血糖水平、空腹胰岛素水平,采用 HOMA1-IR 法计算胰岛素抵抗指数(HOMA1-IR, HOMA1-IR=空腹血糖水平×空腹胰岛素水平/22.5);空腹胰岛素敏感指数[ISI, ISI=1/(空腹血糖水平×空腹胰岛素水平)];采用 QUICK 法计算胰岛素敏感性检测指数(QUICKI)<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 *ALDH2* 基因分型检测

应用 DNA 阵列芯片法检测。①DNA 的提取:采集患者空腹外周静脉血 2 mL,应用浙江艾康生物技术有限公司生产的半自动核酸提取仪及配套的磁珠法全血基因组 DNA 提取试剂盒提取。②DNA 的扩增:采用上海百傲科技有限公司 *ALDH2* 基因芯片法检测试剂盒的扩增试剂,使用美国生命科技公司 ABI 7500 型核酸扩增仪扩增。

③芯片杂交:采用上海百傲科技有限公司 *ALDH2* 基因芯片法检测试剂盒的杂交试剂及 BR 526-24 型全自动核酸杂交仪进行基因杂交分型。

#### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。应用 1-Sample K-S(Kolmogorov-Smirnov)检验验证计量资料的正态分布性。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组内分类变量计量资料比较采用单因素方差分析,组间分类变量计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体检对照组和 T2DM 组 *ALDH2* 基因型分布结果

两组间 *ALDH2* 基因型、突变频率的分布差异均有统计学意义(均为  $P < 0.01$ );2 型糖尿病组的基因突变比例高于体检对照组。见表 1。

表 1 对照组和 T2DM 组 *ALDH2* 基因型分布结果 [ $n(\%)$ ]

Table 1 Distribution of *ALDH2* genotypes in control group and T2DM group [ $n(\%)$ ]

	例数	基因型			突变频率	
		GG 型	GL 型	LL 型	野生型	突变型
对照组	402	265(65.9)	124(30.8)	13(3.2)	265(65.9)	137(34.1)
T2DM 组	227	125(55.1)	86(37.9)	16(7.0)	125(55.1)	102(44.9)
合计	629	390(62.0)	210(33.4)	29(4.6)	390(62.0)	239(38.0)
$\chi^2$ 值			9.489		7.255	
<i>P</i> 值			0.009		0.007	

### 2.2 比较各 *ALDH2* 基因型受试者中患 2 型糖尿病的比例

线性卡方分析显示随 *ALDH2* 基因突变数量的增加(无突变、杂合突变、纯合突变),发生 2 型糖尿病的比例显著增加( $P < 0.01$ )。以是否发生 L 突变对 2 型糖尿病患者进行风险归因分析,显示 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点的 L 突变是发生 2 型糖尿病的危险因素( $P < 0.01$ ),风险

评估值为 1.578, 95% 置信区间为 1.131~2.202。见表 2。

### 2.3 性别与 *ALDH2* 基因型的关系

对照组男女性别间 *ALDH2* 基因型、突变率的分布差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。2 型糖尿病组男女性别间 *ALDH2* 基因型、突变率的分布差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 2 629 例受试者各 *ALDH2* 基因型患 2 型糖尿病的分布比例 [ $n(\%)$ ]

Table 2 Proportion of type 2 diabetes mellitus in 629 subjects with *ALDH2* genotype [ $n(\%)$ ]

	例数	GG 型	GL 型	LL 型	突变型	野生型
T2DM 患者	227	125(32.1)	86(41.0)	16(55.2)	102	125
非 DM 受试者	402	265(67.9)	124(59.0)	13(44.8)	137	265
合计	629	390	210	29	239	390
$\chi^2$ 值			9.256		7.255	
<i>P</i> 值			0.002		0.007	

表3 两组男女性别间 ALDH2 基因型的分布 [n(%)]  
Table 3 Distribution of ALDH2 genotypes between male and female [n(%)]

组	性别	例数	基因型			突变频率	
			GG型	GL型	LL型	野生型	突变型
对照组	男	330	221(67.0)	100(30.3)	9(2.7)	221(67.0)	109(33.0)
	女	72	44(61.1)	24(33.3)	4(5.6)	44(61.1)	28(38.9)
	$\chi^2$ 值			1.946			0.903
	P值			0.378			0.342
T2DM组	男	154	85(55.2)	58(37.7)	11(7.1)	85(55.2)	69(44.8)
	女	73	40(54.8)	28(38.4)	5(6.8)	40(54.8)	33(45.2)
	$\chi^2$ 值			0.014			0.003
	P值			0.993			0.955

2.4 2型糖尿病组各基因型间的生化指标分布结果

2.4.1 HbA<sub>1c</sub>水平的比较

HbA<sub>1c</sub>水平经 Kolmogorov-Smirnov 检验呈偏态分布( $Z$ 值=1.393,  $\chi^2=0.041, P<0.05$ ), 将 HbA<sub>1c</sub>水平转换为自然对数值后呈正态分布( $Z$ 值=0.763,

$\chi^2=0.606, P>0.05$ ), 进行单因素方差分析。结果显示 GG、GL、LL 基因型间 HbA<sub>1c</sub>水平的分布均无差异( $F$ 值=0.291,  $P=0.748, P>0.05$ )。野生型(GG)与突变型(GL+LL)间 HbA<sub>1c</sub>水平的分布均无差异( $F$ 值=0.546,  $P=0.461, P>0.05$ )。见表4。

表4 T2DM组各生化血清学指标在各基因型的分布水平( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 4 The distribution level of each biochemical serological index in each genotype ( $\bar{x}\pm s$ )

指标	基因型			突变型	
	GG型	GL型	LL型	野生型	突变型
HbA <sub>1c</sub>	8.818±2.559	9.023±2.296	8.955±2.788	8.818±2.559	9.014±2.350
空腹血糖(mmol/L)	8.897±3.546	9.851±4.431	6.946±2.424	8.897±3.546	9.453±4.321
	$F$ 值=3.690, $P=0.027$			$F$ 值=1.035, $P=0.310$	
空腹胰岛素(mU/L)	19.46±16.59	20.57±17.65	17.82±11.31	19.46±16.59	20.15±16.83
	$F$ 值=0.205, $P=0.815$				
胰岛素抵抗指数	7.553±6.979	9.399±9.463	5.392±3.713	7.553±6.979	8.846±8.986
	$F$ 值=1.949, $P=0.145$				
定量胰岛素敏感性检测指数	0.302±0.032	0.299±0.035	0.311±0.034	0.302±0.032	0.301±0.035
	$F$ 值=0.865, $P=0.423$				
胰岛素敏感指数	6.798±6.281	8.459±8.517	4.853±3.341	6.798±6.281	7.9613±8.088
	$F$ 值=1.949, $P=0.145$				

2.4.2 空腹血糖水平的比较

单因素方差分析, 各基因型间空腹血糖水平总体差异有统计学意义( $F$ 值=3.690,  $\chi^2=0.027, P<0.05$ ), GL型最高(9.851), 其次是GG型(8.897), LL型最低(6.946); 经两两比较显示GG型与GL型、LL型空腹血糖水平差异无统计学意义, LL型与GL型空腹血糖水平有差异有统计学意义。野生型(GG)与突变型(GL+LL)间空腹血糖水平的分布均无差异。见表5。

表5 T2DM组各基因型间空腹血糖水平的比较结果  
Table 5 The statistical results of FBG levels among genotypes in the T2DM group

基因型别	F值	均值差(1-J)	标准误	P值
总体比较	3.690	/	/	0.027
野生型(GG)VS突变型(GL+LL)	1.035	/	/	0.310
GG型 VS GL型	/	-0.954	5.626	0.092
GG型 VS LL型	/	1.951	1.113	0.087
GL型 VS LL型	/	2.904	1.156	0.013

### 3 讨论

*ALDH2* 突变基因在欧美人群中携带率极低, 在亚洲人群中的突变频率为 30%~50%, 中国汉族人群的突变率为 15%~30% 不等<sup>[7]</sup>。本次研究的体检对照组 *ALDH2* 基因突变频率为 34.1%, 与相关报道较一致<sup>[8]</sup>, 而 2 型糖尿病组的突变频率显著升高为 44.9%。本次研究显示汉族人群随着 *ALDH2* 基因突变数量的增加, 患 2 型糖尿病的比例升高发生 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 突变的人群, 更易患 2 型糖尿病。携带突变基因人群的 *ALDH2* 对长期高血糖状态下蛋白质糖基化产生的丙酮醛、乙二醛等活性羰基类物质的代谢障碍, 影响细胞中的蛋白质、DNA、脂质等生物大分子的功能, 从而增加了胰岛素抵抗的易感性等病理损害, 最终影响到糖尿病及其并发症的发生发展<sup>[1,8]</sup>。同时本次的研究显示, *ALDH2* 基因 Glu504Lys 野生型与突变型的 2 型糖尿病患者, 其胰岛素抗体水平并无差异。可能与单个易感基因位点对 2 型糖尿病患者的表型仅具有微效作用有关, 只有多个位点或基因的协同作用, 才能显著影响血糖代谢的表型<sup>[9]</sup>。其具体作用机制尚未完全明确, 仍需进一步研究。

空腹血糖水平及空腹胰岛素水平直接反应患者糖尿病的病程发展, 对于糖尿病治疗的调整和疗效的监控有重要作用。HbA<sub>1c</sub> 反应机体近 8~12 周的血糖水平, 有研究报道在轻度饮酒的糖尿病患者 *ALDH2* 突变型患者的 HbA<sub>1c</sub> 水平明显高于野生纯合型患者<sup>[1-3]</sup>。本次研究显示 *ALDH2* 基因型对健康人群、2 型糖尿病人群 HbA<sub>1c</sub> 的水平均无影响。可能与研究的目标人群的种族、地域、饮食习惯不同相关, 以及与本次研究没有纳入饮酒因素有关。*ALDH2* 基因突变者乙醛代谢效率低下, 饮酒后血液中乙醛水平的升高是引起高血糖及高胰岛素血症的重要因素<sup>[10]</sup>。肝脏是血糖调节的重要脏器, *ALDH2* 基因突变对乙醛代谢的催化活性显著减弱, 致高毒性代谢产物乙醛在体内蓄积, 影响多种肝病的发生和发展。*ALDH2* 基因可通过调节肝细胞的氧化应激、胰岛细胞的损伤及线粒体功能, 对内、外源性醛类物质的解毒作用等多种途径影响 2 型糖尿病及其多种并发症的发生发展<sup>[1,9]</sup>。而不同 *ALDH2* 基因人群对糖尿病药物治疗的反应性不同, 也是一个重要的因素<sup>[4]</sup>。这对下一步 2 型糖尿病患者精准治疗的研究具有指引作用。

2 型糖尿病的发病机制的重要环节是胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞功能缺陷<sup>[11]</sup>, 其本质是单位胰岛素的生物效应降低, 即胰岛素刺激组织对葡萄糖的利用能力降低, 胰岛  $\beta$  细胞功能相对障碍。HOMA 稳态模型是一种评价糖尿病病人胰岛素敏感性、胰岛素抵抗水平和胰岛  $\beta$  细胞功能的常用指标, 有研究发现 *ALDH2* 基因突变型胰岛素水平和胰岛素抵抗程度明显比野生型高<sup>[12]</sup>。本次的分析显示各 *ALDH2* 基因 Glu504Lys 位点突变对胰岛素抵抗和胰岛素敏感性等功能并无影响, 与有关报道不一致<sup>[12-13]</sup>。推测可能是其它易感基因对胰岛的功能产生影响<sup>[14-15]</sup>, 且单个基因位点的突变对 2 型糖尿病患者的表型仅具有微效作用, 表现为核苷酸虽有突变, 但在有些功能的表达上其表观基因型是相同的。目前的研究, 多采用候选基因策略, 对易感基因在特定人群中的分布进行验证, 但是遗传因素具有高度的异质性, 各地区各种族糖尿病易感基因谱差异大。因此, 今后需从基因与基因、表观遗传学与致病分子机制等方面入手, 揭示 *ALDH2* 等易感基因突变导致 2 型糖尿病发生发展的机制。

综上所述, *ALDH2* 基因 Glu504Lys 多态性是 2 型糖尿病发生的危险因素, 与 HbA<sub>1c</sub>、胰岛素抵抗的水平无明显相关。如能进一步研究基因与基因、基因与环境的相互作用和致病机制, *ALDH2* 基因有望成为 2 型糖尿病精准防治的新靶点。

### 参考文献

- [1] 张瑞, 王甲莉, 陈玉国. *ALDH2* 在糖尿病及其并发症中作用的研究进展[J]. 生理科学进展, 2015, 46(3):229-232.
- [2] Pan G, Deshpande M, Pang H, et al. Precision medicine approach: Empagliflozin for diabetic cardiomyopathy in mice with aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) 2 \* 2 mutation, a specific genetic mutation in millions of East Asians [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 839:76-81.
- [3] Chang B, Hao S, Zhang L, et al. Association between aldehyde dehydrogenase 2 Glu504Lys polymorphism and alcoholic liver disease[J]. Am J Med Sci, 2018, 356(1):10-14.
- [4] 托兰古丽. 买买提库尔班, 帕丽达. 阿布拉提, 祖力卡提阿衣. 阿布都拉, 等. 2 型糖尿病合并冠心病及高血压患者血栓前状态和 CY92C19、*ALDH2* 基因多态性的相关性研究[J]. 职业与健康, 2016, 32(10):1379-1383, 1387.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(7):447-498.
- [6] 谭丽艳, 徐海波, 谭丽萍, 等. 新诊断 2 型糖尿病患者血清 nesfatin-1 及 apelin 与胰岛素抵抗的关系研究[J]. 中国全科医学, 2013, 5(43):493-495.

# 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生生化淋巴细胞系的建立

贾峥<sup>1</sup> 张艳艳<sup>2</sup> 孙楠<sup>1</sup> 张文新<sup>1</sup> 高飞<sup>1</sup> 孙晶<sup>1</sup> 黄杰<sup>1\*</sup> 曲守方<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 收集27例葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的临床外周血样本,建立永生生化淋巴细胞系。**方法** 采用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)筛查临床样本的突变类型,然后采集外周血,进行永生生化淋巴细胞系的转化。提取建系成功的淋巴细胞系的基因组DNA,并用建立的二代测序法进行验证。**结果** 成功建立了27例葡萄糖-6-磷酸脱氢酶永生生化淋巴细胞系样本,包括14种不同纯合和杂合突变类型,验证结果表明永生生化淋巴细胞系的基因突变类型与临床样本原来标示的突变类型一致。**结论** 本研究建立的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变永生生化淋巴细胞系具有稳定的遗传信息,可以作为国家参考品的资源,用于评价葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变试剂盒的性能。

**[关键词]** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 基因突变; 永生生化细胞系

## Establishment of immortalized lymphocyte cell lines with mutation of the glucose -6- phosphate dehydrogenase gene

JIA Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Yanyan<sup>2</sup>, SUN Nan<sup>1</sup>, ZHANG Wenxin<sup>1</sup>, GAO Fei<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1\*</sup>, QU Shoufang<sup>1\*</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. MGI Tech Co., Ltd, Shenzhen, China, 518083)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish immortalized lymphocyte cell lines by collecting 27 clinical peripheral blood samples harboring *glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)* gene mutations. **Methods** The glucose-6-phosphate dehydrogenase gene mutation detection kit (fluorescence PCR melting curve method) was used to screen the mutation type of clinical samples, and then peripheral blood was collected for transformation of immortalized lymphocyte lines. The genomic DNA of the successfully established lymphocyte line was extracted and verified by the next-generation sequencing method. **Results** We established 27 immortalized lymphocyte cell lines, including 14 different homozygous or heterozygous *G6PD* mutation types. The genetic mutation types of immortalized lymphocyte lines were the same as those originally indicated in clinical samples. **Conclusion** The established immortalized lymphocyte cell lines with *G6PD* mutations in this study have stable genetic information and can be used as a national reference resource to evaluate the performance of the *G6PD* gene mutation kit.

**[KEY WORDS]** Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Gene mutation; Immortalized cell line

基金项目:生殖健康及重大出生缺陷防控研究(2016YFC1000300)

作者单位:1. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所,北京 100050

2. 深圳华大智造科技有限公司,深圳 518083

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

注:贾峥和张艳艳共为第一作者

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症是由位于X染色体长臂2区8带(Xq28)的G6PD基因突变导致G6PD酶合成缺陷引起,是一种以溶血性贫血为主要临床特征的遗传病,常见临床表现有新生儿黄疸、新生儿高胆红素血症、蚕豆病、药物性溶血、某些感染性溶血等<sup>[1-2]</sup>。本病在我国主要分布在长江流域以南地区,尤以广东、海南、广西、云南、贵州、四川等地为高发区。G6PD缺乏症患者多数平时无临床症状,早期诊断和干预非常重要。在G6PD缺乏症的高发地区,应开展G6PD缺乏症筛查。作为一种X-连锁不完全显性遗传病,男性携带突变(男性半合子)表现为明显的酶活性缺乏,女性携带纯合突变或杂合突变时(称为女性杂合子),发病情况因人而异。部分女性杂合子的酶活性可能接近正常不表现缺乏,因此不易通过酶活性检测发现,可以通过细胞化学染色体法和基因检测等方法明确突变状态<sup>[3]</sup>。G6PD缺乏症的分子检测方法,包括荧光探针PCR熔解曲线法、基因芯片、反向点杂交、测序和飞行时间质谱等,提高了女性杂合子的检出率<sup>[4-7]</sup>。

目前尚无葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的国家参考品,亟需建立相应的国家参考品,用于评价葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变试剂盒的质量。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症作为一种单基因病,该类参考品的制瓶颈是难以保证持续获得临床样本,解决的思路是建立永生化淋巴细胞系或者构建基因编辑细胞系。本院通过建立葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的永生化淋巴细胞系,可以提供长期稳定的遗传资源,并采用二代测序法进行验证。

## 1 材料方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本来源及处理

经伦理委员会批准,联系珠海市妇幼保健院,招募自愿参与项目的样品捐献者33人,签署知情同意书。每人抽取10 mL外周血,血液样本采集到枸橼酸盐或柠檬酸盐抗凝的真空采集管。采集外周血后进行永生化淋巴细胞系建系。

#### 1.1.2 试剂和仪器

RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)和青霉素链霉素双抗购自美国GIBCO公司;人外周血淋巴细胞分离液、环孢霉素A和二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖-6-磷酸脱

氢酶基因突变检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法)由厦门致善生物科技有限公司提供;基因组DNA提取试剂盒(磁珠法)由深圳华大智造科技有限公司提供;新生儿基因检测试剂盒由华大基因股份有限公司提供。

上海宏石SLAN-96S全自动医用PCR分析系统,厦门致善生物科技有限公司提供;MGISEQ-2000基因测序仪,深圳华大智造科技有限公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样本的筛查

使用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法),按照说明书的操作方法,对样本进行检测。

#### 1.2.2 永生化淋巴细胞系的建立

1.2.2.1 EBV病毒液的制备 复苏B95-8细胞株,采用RPMI 1640培养基加胎牛血清(FBS)进行培养,每隔2~3天补液一次,逐渐增加培养基的用量。饥饿培养10天后,收集细胞在液氮及37℃条件下反复冻融3次,2 000 rpm离心10 min。收集上清液,使用0.2 μm滤膜的细胞滤器进行过滤后,备用。

1.2.2.2 单核B淋巴细胞的分离和转化 取采集的外周血5 mL,加入等体积的含有青霉素链霉素双抗的RPMI 1640培养基稀释血液。将稀释后的血液缓缓加入已分装在离心管内的淋巴细胞分层液中,2 000 rpm离心20 min。小心吸取白膜层,转移至新的离心管中,加入含有双抗的RPMI 1640培养基8 mL洗涤2次,1 500 rpm离心10 min后,去上清。然后加入分装好的EBV病毒液1.5 mL、环孢霉素A 0.4 mL以及完全培养基重悬细胞沉淀,然后将细胞悬液接种至T25培养瓶中,将细胞培养瓶置于37℃的5% CO<sub>2</sub>培养箱进行培养。

1.2.2.3 永生化淋巴细胞系冻存 接种培养24~48 h后,使用倒置显微镜观察细胞转化情况并拍照。观察细胞状态及聚团大小,适当加入少量完全培养基继续培养。一周后观察细胞聚团数量及细胞状态,进行半换液。待培养液颜色变浅黄,细胞聚团多且密集时,1 300 rpm离心5分钟,传代。待细胞培养至足够数量时(3~6×10<sup>6</sup>个/mL),1 300 rpm离心5分钟,收集细胞。根据细胞的数量加入含10% DMSO冻存液,调整细胞冻存浓度,按所要求将细胞分装至冻存管。然后按照标准

冻存操作程序进行梯度降温存储,最终转移至液氮进行长期存储。

### 1.2.3 永生化淋巴细胞系的验证

将永生化淋巴细胞系取出复苏后进行基因组DNA提取,使用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的完整性。采用新生儿基因检测试剂盒进行验证。采用酶切的方法将基因组DNA打断为100~200 bp左右的DNA片段,通过末端修复,加A和接头连接后,进行第一轮PCR扩增。扩增的PCR产物采用DNA探针进行目标区域富集后,使用MGISEQ-2000基因测序仪进行高通量测序。

## 2 结果

### 2.1 样本筛查

采用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒(荧光PCR熔解曲线法),根据与探针杂交产物熔点的差异来检测G6PD基因突变。通过比较检测样本在反应液A和反应液B体系中FAM、HEX、ROX和CY5共8个检测通道的熔解峰与野生型对照对应通道的熔解峰之间熔点( $T_m$ 值)的差异判断样本是否发生突变。当样本熔解峰与野生型对照对应熔解峰差异( $\Delta T_m$ 值)在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内的即为野生型峰,差异超过 $\pm 2^\circ\text{C}$ 的即为突变型峰,最后筛查出不同突变类型的样本。33例样本的筛查结果可见表1。CNGB030108样本在反应液A体系CY5检测通道出现野生峰和突变峰的融合峰,而其它7个通道的熔解峰均为野生峰,且突变峰与野生型对照的熔解峰差异在 $(-4.8^\circ\text{C})\sim(-3^\circ\text{C})$ 范围内,表明是1376(G>T)杂合型突变;在反应液B体系ROX检测通道出现野生峰和突变峰的融合峰,而其它7个通道的熔解峰均为野生峰,且突变峰与野生型对照的熔解峰差异在 $5.19^\circ\text{C}\sim 6.41^\circ\text{C}$ 范围内,表明是519(C>T)杂合型,见图1。

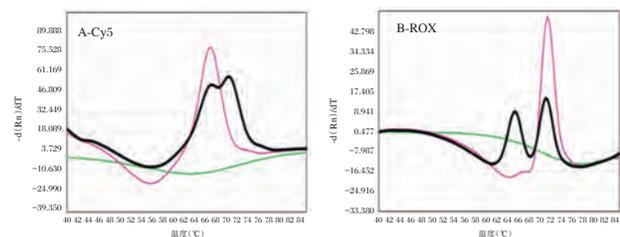
### 2.2 永生化淋巴细胞系的建立

采用EBV转化加环孢霉素A法,共完成33例样本建系,其中27例样本建系成功,6例因细菌污染导致失败,建系成功率为81%,复苏成功率为100%,可以传代用于实验研究。在倒置显微镜下可观察到细胞转化后96 h内,细胞体积明显增大,聚团生长的细胞团增多;转化2周后,肉眼可见细胞聚团物,显微镜下观察大量细胞聚团;转化培养3~4周后,显微镜下观察细胞外壁呈不规则毛刺状突起,增殖旺盛,表明建系成功,见图2A~图2C。

表1 样本的筛查结果

序号	样本编号	突变信息
1	CNGB030074	1376(G-T)/N
2	CNGB030075	392(G-T)/半合子
3	CNGB030076	517(T-C)/N
4	CNGB030077	871(G-A)/N
5	CNGB030078	871(G-A)/N
6	CNGB030079	871(G-A)/半合子
7	CNGB030080	871(G-A)/半合子
8	CNGB030081	95(A-G)/N
9	CNGB030082	95(A-G)/N
10	CNGB030083	95(A-G)/半合子
11	CNGB030084	95(A-G)/半合子
12	CNGB030085	1024(C-T)/1388(G-A)
13	CNGB030086	1388(G-A)/1388(G-A)
14	CNGB030101	1388(G→A)/N
15	CNGB030102	1376(G→T)/N
16	CNGB030103	871(G→A)/N
17	CNGB030104	1388(G→A)/N
18	CNGB030105	1388(G→A)/N
19	CNGB030106	392/半合子
20	CNGB030107	1376(G→T)/半合子
21	CNGB030108	1376(G→T)/519
22	CNGB030109	95(A→G)/N
23	CNGB030110	1360(C→T)/N
24	CNGB030111	1388(G→A)/N
25	CNGB030112	1388(G→A)/519
26	CNGB030113	1024(C→T)/半合子
27	CNGB030114	95(A→G)/N
28	CNGB030115	1376(G→T)/N
29	CNGB030116	95(A→G)/N
30	CNGB030117	1388(G→A)/1388(G→A)
31	CNGB030118	1024(C→T)/N
32	CNGB030119	392(G→T)/N
33	CNGB030120	1388(G→A)/392(G→T)

注:N表示正常(normal)



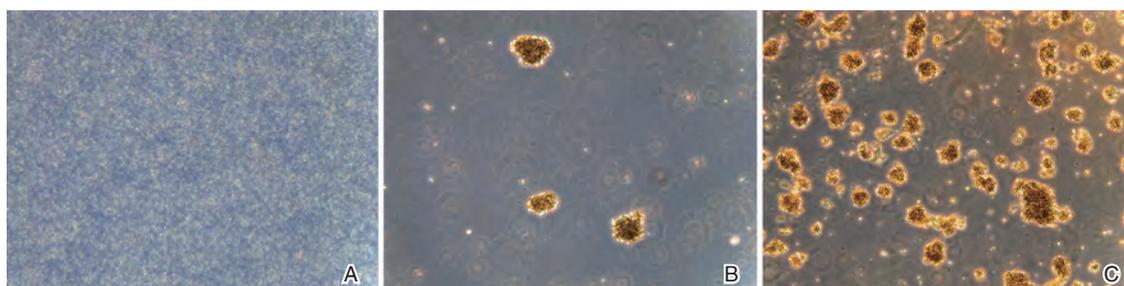
注:粉色表示野生型对照,绿色表示阴性对照,黑色表示待检样本

图1 CNGB030108样本筛查结果

Figure 1 The screening result of CNGB030108

### 2.3 永生化淋巴细胞系的验证

用基因组DNA提取试剂盒提取的永生化淋巴细胞系样本基因组DNA,使用0.8%琼脂糖凝胶电泳,结果显示DNA条带完整,没有拖带或弥散带,表明基因组DNA具有很好的完整性。



注:A为第0天;B为第15天;C为第30天

图2 永生化淋巴细胞系转化第0、15天和30天结果(×50)

Figure 2 The result of immortalized lymphocyte cell line transformation on day 0, day15 and day 30 (×50)

采用高通量测序法进行验证,样本的结果均与采用荧光PCR熔解曲线法筛查的结果一致,见图3和表2。CNGB030108样本的测序结果显示在X染色体153 762 678 bp(人类基因组hg19)位置处检测到94条reads支持C碱基(正向是G碱基)和108条reads支持T碱基(正向是A碱基),表明是c.519 C>T杂合突变;在X染色体153 760 484 bp位置处检测到60条reads支持G碱基(正向是C碱基)和68条reads支持T碱基(正向是A碱基),表明是c.1 376 G>T杂合突变。



注:A为ChX 153 762 678 bp (hg19)位点测序结果,B为ChX 153 760 484 (hg19)位点测序结果

图3 CNGB030108 样本测序结果

Figure 3 The sequencing results of CNGB030108

### 3 讨论

永生化指体外培养的细胞经过自发的或受外界因素的影响从增殖衰老危机中逃离,从而具有无限增殖能力的过程。目前应用最多的方式是使用EB病毒(EBV)转化人外周血淋巴细胞从而获得的一种能够连续分裂、永久生存的B淋巴细胞株,每株细胞含有正常的二倍体组型并且含有供者完整的遗传信息。在B淋巴细胞转化过程中加入环孢霉素A,可以抑制T淋巴细胞的免疫杀伤活性,有效阻止T淋巴细胞对已转化的B淋巴细胞

表2 永生化淋巴细胞系样本验证结果

Table 2 The verification results of immortalized lymphocyte cell lines

序号	样本编号	突变信息
1	CNGB030075	c.392G>T 纯合突变
2	CNGB030078	c.871G>A 杂合突变
3	CNGB030079	c.871G>A 纯合突变
4	CNGB030081	c.95A>G 杂合突变
5	CNGB030082	c.95A>G 杂合突变
6	CNGB030084	c.95A>G 纯合突变
7	CNGB030085	c.1024C>T 杂合突变; c.1388G>A 杂合突变
8	CNGB030086	c.1388G>A 纯合突变
9	CNGB030101	c.1388G>A 杂合突变
10	CNGB030102	c.1376G>T 杂合突变
11	CNGB030103	c.871G>A 杂合突变
12	CNGB030104	c.1388G>A 杂合突变;
13	CNGB030105	c.1388G>A 杂合突变
14	CNGB030106	c.392G>T 纯合突变
15	CNGB030107	c.1376G>T 纯合突变
16	CNGB030108	c.1376G>T 杂合突变; c.519C>T 杂合突变
17	CNGB030109	c.95A>G 杂合突变
18	CNGB030110	c.1360C>T 杂合突变
19	CNGB030111	c.1388G>A 杂合突变
20	CNGB030112	c.1388G>A 杂合突变; c.519C>T 杂合突变
21	CNGB030113	c.1024C>T 纯合突变
22	CNGB030114	c.95A>G 杂合突变
23	CNGB030115	c.1376G>T 杂合突变
24	CNGB030116	c.95A>G 杂合突变
25	CNGB030117	c.1388G>A 纯合突变
26	CNGB030119	c.392G>T 杂合突变
27	CNGB030120	c.1388G>A 杂合突变; c.392G>T 杂合突变

的攻击,从而提高转化效率。获得的永生化细胞系在连续培养传代过程中染色体稳定,可获取足量的细胞遗传资源用于研究。世界上基因细胞遗传资源存储机构包括英国生物样本库(UK Bio-bank)、美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)、美国国家人类基因细胞库(The NIGMS Human Genetic Cell Repository),均将其作为最主要的技术方法保存细胞遗传资源<sup>[8-9]</sup>。

我国常见的致病性 *G6PD* 基因变异类型包括 c.95A>G、c.392G>T、c.487G>A、c.493A>G、c.592C>T、c.1024C>T、c.1360C>T、c.1376G>T、c.1388G>A, 这9种变异占总变异的90%以上<sup>[10]</sup>。本研究采用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶突变类型的外周全血样本,经过EB病毒诱导分化,最终成功建立了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的永生化淋巴细胞系,包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 c.392G>T 纯合和杂合突变、c.871G>A 纯合和杂合突变、c.95A>G 纯合和杂合突变、c.1388G>A 纯合和杂合突变、c.1376G>T 纯合和杂合突变、c.1360C>T 杂合突变、c.1024C>T 纯合和杂合突变、c.519 C>T 杂合突变,涵盖了我国常见的突变类型。同时对建系成功的永生化淋巴细胞株进行高通量测序方法的验证,结果表明葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变的永生化淋巴细胞系基因组 DNA 的结果与临床样本的标示结果一致。该永生化淋巴细胞系的遗传信息稳定,可作为国家参考品的遗传资源,用于评价葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变检测试剂盒的质量。

## 参考文献

- [1] 沈姗姗,胡睿,周斌,等.武汉市新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺失症筛查分析[J].实用医学杂志,2019,35(10):1655-1658.
  - [2] 彭瑛,詹小亭,邓正华,等.中国西南三区216例儿童葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症基因型分布和临床特征分析[J].广东医学,2019,40(13):1856-1860.
  - [3] 王朝,刘思涵,薄丽津,等.葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的临床特征与实验室特征分析[J].中国实验血液学杂志,2018,(5):1437-1441.
  - [4] 严提珍,钟青燕,唐宁,等.多色探针荧光PCR熔解曲线法在*G6PD*基因突变检测中的临床应用评价[J].中华医学遗传学杂志,2014,31(2):156-162.
  - [5] 赵颖,巫静帆,李见群,等.东莞地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的基因突变筛查[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(6):840-843.
  - [6] 黄盛文,吴娴,许吟,等.贵阳地区新生儿*G6PD*缺乏症分子筛查结果分析[J].重庆医学,2016,45(11):1505-1507.
  - [7] 张娟,余朝文,苗静琨,等.基于测序分析的新生儿葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症分子诊断与基因新突变鉴定[J].中华检验医学杂志,2016,(11):843-847.
  - [8] 王冬杰,李宇东,韩瑞芳.遗传眼病永生化细胞系建立方法[J].眼科新进展,2014,34(12):1114-1117.
  - [9] 高飞,胡泽斌,孙楠,等.脆性X综合征外周血淋巴细胞永生化细胞系的建立与验证[J].中国医药生物技术,2019,14(5):470-473.
  - [10] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿筛查学组,中国医师协会医学遗传医师分会临床生化遗传专业委员会,中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组.葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症新生儿筛查、诊断和治疗专家共识[J].中华儿科杂志,2017,55(6):411-414.
- 
- (上接第427页)
- [7] Zhang R, Wang J, Xue M, et al. ALDH2-the genetic polymorphism and enzymatic activity regulation: their epidemiologic and clinical implications [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18 (15):1810-1816.
  - [8] Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, et al. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(1):1-34.
  - [9] 张丽杰,裴智勇,马跃,等.2型糖尿病易感基因代谢通路生物信息学研究[J].国际检验医学杂志,2016,37(21):2996-2998,3001.
  - [10] 邵爽,刘春燕,孙燕,等.乙醛脱氢酶2基因多态性与肝脏疾病[J].世界华人消化杂志,2017,25(33):2981-2986.
  - [11] 汪晓峰,赵环宇,万颖.联合检测血清胰岛素抵抗与脂质代谢相关指标对2型糖尿病合并高血压人群的探讨[J].中国卫生检验杂志,2016,26(24):3569-3571.
  - [12] Li GY, Li ZB, Li F, et al. Meta-analysis on the association of ALDH2 polymorphisms and type 2 diabetic mellitus, diabetic retinopathy [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14 (2):165.
  - [13] Guo YL, Yu WJ, Sun DD, et al. A novel protective mechanism for mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in type i diabetes-induced cardiac dysfunction: Role of AMPK-regulated autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852 (2):319-331.
  - [14] 高帆,韩睿,宋滇平.东亚人群2型糖尿病易感基因的研究进展[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2015,9(6):1002-1006.
  - [15] 余方琳,叶莺,严延生.2型糖尿病易感基因单核苷酸多态性的研究进展[J].中华疾病控制杂志,2016,20(11):1095-1099.

## 脓毒症患者循环 miR-21、miR-155 变化与炎症细胞因子和心功能障碍的相关性

贾启明<sup>1\*</sup> 张涛<sup>2</sup> 贺娜娜<sup>1</sup> 魏蕾<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 研究脓毒症患者循环 miR-21、miR-155 变化与心功能障碍、炎症细胞因子的相关性。方法 选择 2015 年 3 月至 2018 年 12 月期间在本院诊断为脓毒症的 58 例患者,根据入院后 24 小时内的左心室射血分数(LVEF)分为 LVEF<50%组及 LVEF≥50%组;另取同期在本院体检的健康志愿者 40 例作为对照组;比较 3 组间临床资料、循环 miR-21 及 miR-155 表达、血清炎症因子含量的差异。结果 血清 CRP、PCT、cTnI、BNP、TNF-α、IL-2、ICAM-1 含量及循环 miR-21, miR-155 表达量呈现 LVEF<50%组> LVEF≥50%组>对照组的趋势( $P<0.05$ );LVEF<50%组中死亡患者的循环 miR-21, miR-155 表达量及血清 TNF-α、IL-2、ICAM-1 含量均明显高于存活患者( $P<0.05$ );LVEF<50%组患者的循环 miR-21, miR-155 表达量与血清 CRP、PCT、cTnI、BNP、TNF-α、IL-2、ICAM-1 含量均呈正相关;miR-21, miR-155 表达量与血清 PCT、TNF-α、IL-2、ICAM-1 含量增多是 LVEF<50%的脓毒症患者死亡的危险因素。结果 脓毒症患者循环 miR-21, miR-155 明显增多与心功能障碍及炎症因子增多有关,同时也是影响脓毒症合并心功能障碍患者预后的危险因素。

**[关键词]** 脓毒症; 心功能; miR-21; miR-155; 预后

### Correlation between changes of miR-21、miR-155 and inflammatory cytokines and cardiac dysfunction in patients with sepsis

JIA Qiming<sup>1\*</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, HE Nana<sup>1</sup>, WEI Lei<sup>1</sup>

(1. Henan Cancer Hospital ICU, Zhengzhou, Henan, China, 450000; 2. Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

**[ABSTRACT]** Objective To study the relationship between the changes of miR-21, miR-155 and cardiac dysfunction, inflammatory cytokines in sepsis patients. Methods 58 patients diagnosed with sepsis in our hospital from March 2015 to December 2018 were recruited. According to left ventricular ejection fraction (LVEF) within 24 hours after admission, patients were divided into LVEF < 50% and ≥50% group. In addition, 40 healthy volunteers who were examined in our hospital during the same period were selected as the control group. The difference of clinical data, circulating miR-21 and miR-155 expression, serum inflammatory factors contents were compared among the three groups. Results The trend of serum CRP, PCT, cTnI, BNP, TNF-α, IL-2, ICAM-1 and circulating miR-21, miR-155 expression is LVEF <50% group > LVEF ≥ 50% group > control group. The circulating miR-21, miR-155 expression levels and serum TNF-α, IL-2, ICAM-1 levels of dead patients in LVEF <50% group were significantly higher than those of surviving patients ( $P<0.05$ ). The circulating miR-21, miR155 expression in patients with LVEF <50% was positively correlated with serum CRP, PCT, cTnI, BNP, TNF-α, IL-2, and ICAM-1 levels. Increased miR-21, miR-155 expression and PCT, TNF-α, IL-2, ICAM-1 levels are risk factors for death in sepsis patients with LVEF <50%. Conclusion The significantly increased circulating miR-21, miR-155 in sepsis patients is related to cardiac dysfunction and

基金项目:国家自然科学基金项目(81370615)

作者单位:1. 河南省肿瘤医院 ICU, 河南, 郑州 450000

2. 郑州市中心医院心内科, 河南, 郑州 450000

\*通信作者:贾启明, E-mail:yuezhislanlu6@163.com

increased inflammatory factors. It is also a risk factor for the prognosis of patients with sepsis and cardiac dysfunction.

[KEY WORDS] Sepsis; cardiac function; miR-21; miR-155; Prognosis

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,可进一步发展为脓毒症休克并引起多器官功能障碍的发生,病死率高、救治难度大。心脏是脓毒症病程中常见的受累靶器官,脓症患者体内炎症反应的级联放大激活、炎症细胞因子的大量释放会引起心肌细胞损害、造成心脏舒缩功能减退,在此基础上可出现循环障碍并加速休克及多器官功能障碍的发生<sup>[1-2]</sup>。近年来,多种微小RNA(microRNA, miR)被证实参与脓毒症、心肌损伤、炎症反应的过程,其中miR-21及miR-155两种miRs在脓毒症患者的循环中呈显著高表达<sup>[3-4]</sup>。miR-21和miR-155可能靶向调节多种炎症细胞因子的表达及分泌,但脓毒症合并心功能障碍患者循环miR-21及miR-155的变化、与炎症因子分泌的关系及临床意义尚未见报道。因此,本研究将观察脓症患者循环miR-21,miR-155变化与心功能障碍、炎症细胞因子的相关性,分析miR-21,miR-155变化与脓毒症合并心功能障碍患者循病情及预后的相关性,以期为临床评价脓毒症合并心功能障碍患者的病情及预后提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2015年3月至2018年12月期间在本院诊断为脓毒症的58例患者作为研究对象。入组标准:①符合脓毒症的诊断标准<sup>[5]</sup>;②临床资料与预后资料完整;③入院后24小时内接受心脏多普勒超声检查;④入院后24小时内留取静脉血及血清标本。⑤所有患者及家属均已签署知情同意书;排除标准:①合并或既往有病毒性心肌炎、心肌梗死;②合并恶性肿瘤、结缔组织病;③脓毒症前已经出现心功能障碍。根据入院后24小时内心脏多普勒超声结果分为LVEF<50%组及LVEF≥50%组。另取同期在本院体检的健康志愿者40例作为对照组。本实验已通过本院伦理委员同意批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 心功能的测定

脓症患者入院后24小时内接受床旁心脏多普勒超声检查,对照组志愿者体检时进行心脏多

普勒超声检查,探头频率1-5MHz,获取胸骨旁左心室长轴图像后测量左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

#### 1.2.2 循环miR-21,miR-155表达的检测

脓症患者入院后24h内采集肘静脉血3mL,对照组志愿者体检时采集肘静脉血3mL,采用血液RNA提取试剂盒(北京百奥莱博公司、批号:BTN3071-IQS)提取RNA,采用miRNA cDNA第一链合成试剂盒(北京天根公司、批号KR211)反转录合成cDNA,采用miRNA荧光定量PCR检测试剂盒(北京天根公司、批号FP401)对miR-21、miR-155、U6进行扩增,miR-21的上游引物为5'-GATCCTAG-CATCGTAGCTA-3'、下游引物为试剂盒通用引物,miR-155的上游引物为5'-TAGCTAGCTAGC-TAGCTA-3'、下游引物为试剂盒通用引物;U6的下游引物为5'-TAGATCGTATAGCTAT-3'、下游引物为5'-TAAGCTAGCTAGCTAGCTA-5'。扩增程序为:95℃ 3 min后95℃ 15 s、60℃ 30 s,重复40个循环,得到循环曲线及循环阈值(Ct),以U6为内参,按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-21、miR-155的相对表达水平。

#### 1.2.3 血清生化指标及细胞因子的检测

脓症患者入院后24h内采集肘静脉血3mL,对照组志愿者体检时采集肘静脉血3mL,离心分离血清后采用全自动生化分析仪(贝克曼库尔特公司,型号AU5800)测定C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(Procalcitonin, PCT)、肌钙蛋白I(Cardiac troponin I, cTnI)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)的含量,采用上海酶联公司生产的酶联免疫吸附法试剂盒检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor -  $\alpha$ , TNF -  $\alpha$ )(批号:ml077385)、白介素-2(interleukin-2, IL-2)(批号:ml028590)、细胞间黏附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)(批号:ml060413)的含量。

#### 1.2.4 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用方差分析。相关性分析采用Pearson检验,多因素分析采用logistics回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组一般资料的比较

3组间性别、年龄、BMI的比较,差异无统计学

意义( $P>0.05$ );血清CRP、PCT、cTnI、BNP含量比较结果:LVEF<50%组<LVEF≥50%组<对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 3组一般资料的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 ccomparison of general data among 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

资料	对照组(n=40)	LVEF≥50%组(n=38)	LVEF<50%组(n=20)	Z/F值	P值
性别(男/女)	23/17	22/16	12/8	0.036	0.982
年龄(岁)	42.39±9.59	45.12±10.92	40.39±11.87	1.432	0.244
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.93±5.82	23.14±6.14	22.46±5.67	0.087	0.917
CRP(mg/L)	3.28±0.62	30.38±7.82	61.39±9.94	530.616	0.000
PCT(ng/mL)	0.58±0.08	3.29±0.68	14.69±3.94	417.803	0.000
cTnI(ng/mL)	0.45±0.08	0.68±0.12	1.52±0.20	481.609	0.000
BNP(ng/L)	32.93±7.95	63.29±10.29	132.29±21.29	417.546	0.000

### 2.2 3组循环miR-21, miR-155及血清炎症因子的比较

3组循环miR-21, miR-155表达量及血清TNF-α、

IL-2、ICAM-1含量比较结果显示:LVEF<50%组最高,其次是LVEF≥50%组,对照组最低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

表2 3组循环miR-21, miR-155及血清TNF-α、IL-2、ICAM-1的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 comparison of circulation miR-21, miR-155 and serum TNF-α, IL-2, ICAM-1 among 3 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	miR-21	miR-155	TNF-α(ng/L)	IL-2(ng/L)	ICAM-1(ng/mL)
对照组	40	1.02±0.19	0.97±0.16	9.38±1.32	14.28±2.37	126.49±17.96
LVEF≥50%组	38	1.42±0.23	1.38±0.19	20.19±4.82	32.93±6.48	349.58±62.39
LVEF<50%组	20	2.19±0.42	1.83±0.32	57.92±9.94	82.93±13.28	649.39±85.93
F值		129.091	113.378	543.380	586.608	592.120
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.3 LVEF<50%组miR-21, miR-155与血清指标的相关性

LVEF<50%组患者的循环miR-21, miR-155表达量与血清CRP、PCT、cTnI、BNP、TNF-α、IL-2、ICAM-1含量均呈正相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ )见表3。

表3 LVEF<50%组miR-21, miR-155与血清指标的相关性

Table 3 correlation between miR-21, miR-155 and serum index in LVEF<50% group

因素	miR-21		miR-155	
	r值	P值	r值	P值
CRP	0.273	<0.05	0.410	<0.05
PCT	0.306	<0.05	0.377	<0.05
cTnI	0.227	<0.05	0.342	<0.05
BNP	0.285	<0.05	0.266	<0.05
TNF-α	0.329	<0.05	0.325	<0.05
IL-2	0.268	<0.05	0.367	<0.05
ICAM-1	0.402	<0.05	0.291	<0.05

### 2.4 LVEF<50%组中存活及死亡患者循环miR-21, miR-155及血清炎症因子的比较

LVEF<50%组中死亡患者的循环miR-21, miR-155表达量及血清TNF-α、IL-2、ICAM-1含量均明显高于存活患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )见表4。

### 2.5 LVEF<50%组患者治疗结局的相关因素

以LVEF<50%组患者是否死亡作为治疗结局的应变量,以循环miR-21, miR-155及血清CRP、PCT、cTnI、BNP、TNF-α、IL-2、ICAM-1作为自变量进行logistics回归分析,miR-21, miR-155表达量与血清PCT、TNF-α、IL-2、ICAM-1含量增多是LVEF<50%的脓毒症患者死亡的危险因素,血清CRP、BNP与LVEF<50%的脓毒症患者死亡无明显关系见表5。

## 3 讨论

脓毒症累及心脏时可引起心功能障碍并增加

表4 LVEF <50%组中存活及死亡患者循环 miR-21, miR-155 及血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2、ICAM-1 的比较 [n, ( $\bar{x} \pm s$ )]Table 4 comparison of circulation miR-21, miR-155 and serum TNF- $\alpha$ , IL-2, ICAM-1 between survival and death patients in LVEF <50% group [n, ( $\bar{x} \pm s$ )]

LVEF<50%组	n	miR-21	miR-155	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-2(ng/L)	ICAM-1(ng/mL)
存活患者	12	1.57 $\pm$ 0.27	1.48 $\pm$ 0.23	41.23 $\pm$ 7.42	62.58 $\pm$ 10.38	501.23 $\pm$ 68.69
死亡患者	8	2.75 $\pm$ 0.54	2.18 $\pm$ 0.41	74.61 $\pm$ 13.28	106.61 $\pm$ 18.59	795.51 $\pm$ 101.29
t值		6.505	4.906	7.233	6.817	7.777
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表5 LVEF &lt;50%组患者治疗结局的相关因素分析

Table 5 related factors analysis of treatment outcome of patients in LVEF &lt;50% group

因素	$\beta$ 值	OR值	95%CI	Wald值	P值
CRP	0.182	1.284	0.883~2.294	1.194	>0.05
PCT	0.329	1.859	1.323~2.938	6.696	<0.05
cTnI	0.291	1.676	1.149~3.029	4.848	<0.05
BNP	0.209	1.139	0.773~1.589	0.918	>0.05
PCT	0.737	2.029	1.448~2.938	8.595	<0.05
TNF- $\alpha$	0.428	1.575	1.277~2.575	5.585	<0.05
IL-2	0.272	1.441	1.103~2.669	5.019	<0.05
ICAM-1	0.347	1.395	1.084~2.774	4.273	<0.05
miR-155	0.312	1.838	1.258~2.912	6.012	<0.05
miR-21	0.298	2.312	1.575~3.382	8.391	<0.05

患者死亡率。脓毒症患者发生心功能障碍的主要病理生理机制是体内炎症反应的级联放大激活<sup>[6-7]</sup>。相关研究表明,miR-21和miR-155分别靶向JAK2/STAT3通路、TLR4通路来发挥抑制炎症反应的作用<sup>[8-10]</sup>;在脓毒症患者的循环血中,miR-21及miR-155的表达均明显增多<sup>[3-4]</sup>。在此基础上,本研究分析了miR-21及miR-155在脓毒症合并心功能障碍中的应用价值并发现miR-21及miR-155表达增多与脓毒症患者心功能障碍的发生有关,与与已有的脓毒症相关研究一致,出现这一变化的原因可能与机体的代偿机制有关,在脓毒症患者炎症反应过度激活的过程中,miR-21及miR-155表达代偿性增多以起到保护作用。

炎症反应激活是造成脓症患者发生心功能障碍的重要因素,CRP及PCT是用于评价脓毒症病情的指标<sup>[11-12]</sup>,cTnI及BNP是用于评价心肌损害及心功能减退的指标<sup>[13-14]</sup>。本研究的分析证实,在脓症患者心功能恶化的过程中,CRP、PCT、cTnI、BNP含量均明显高于且LVEF<50%组患者miR-21,miR-155表达量与血清CRP、PCT、cTnI、BNP呈正相关,说明循环miR-21,miR-155表达量的增多与脓毒症合并心功能障碍病情发展变化相关,结合

miR-21及miR-155所介导的抑炎作用推测,脓毒症合并心功能障碍病情发展变化过程中miR-21及miR-155的增多不足以代偿机体炎症反应的级联放大激活,心肌损伤仍然发生了损伤。

miR-21,miR-155的主要生物学作用是抑制炎症反应,脓毒症合并心功能障碍患者循环miR-21,miR-155表达量的增多可能是机体自我保护的代偿机制。TNF- $\alpha$ 、IL-2、ICAM-1是在脓毒症过程中介导炎症反应的重要细胞因子<sup>[15-17]</sup>。本研究对炎症因子的分析证实,在脓症患者心功能恶化的过程中,血清TNF- $\alpha$ 、IL-2、ICAM-1含量均明显升高且LVEF<50%组miR-21,miR-155表达量与血清TNF- $\alpha$ 、IL-2、ICAM-1呈正相关,这一相关性由miR-21及miR-155介导的抑炎作用不一致,其可能的原因是脓症患者体内miR-21,miR-155的增多不足以代偿炎症反应的放大激活,导致炎症的感染因素仍持续存在,因此出现了多种炎症细胞因子的大量释放。

最后,本研究还对脓毒症患者的预后进行了随访,通过比较死亡患者与存活患者miR-21,miR-155的差异可知,循环miR-21,miR-155表达量的增多与治疗结局有关,死亡患者的循环miR-21,miR-155表达量均明显高于存活患者。进一步通过logistics回归分析验证miR-21,miR-155表达量与脓毒症合并心功能障碍患者治疗结局的关系可知:miR-21,miR-155表达量增多是脓毒症合并心功能障碍患者死亡的独立危险因素,说明miR-21,miR-155表达量对脓毒症合并心功能障碍患者的预后具有评估价值。

综上所述,脓症患者循环miR-21,miR-155明显增多与心功能障碍有关、同时也是影响脓毒症合并心功能障碍患者预后的危险因素,未来miR-21,miR-155不仅能够作为评价脓毒症合并心功能障碍患者病情及预后的标志物。

## 快速检测洋葱伯克霍尔德菌巢式荧光定量PCR法建立

林丽英\* 邓穗燕 郭旭光

**[摘要]** **目的** 建立能直接快速应用于临床检测洋葱伯克霍尔德菌的巢式荧光定量PCR法。**方法** 根据洋葱伯克霍尔德菌 *recA* 基因序列设计用于普通PCR扩增的外引物,同时设计用于荧光定量PCR的内引物。分别以洋葱伯克霍尔德菌等细菌的标准株为模板,以外引物进行第一轮PCR扩增;所得PCR产物为模板,以内引物进行染料法荧光定量PCR检测 *recA* 基因表达水平,评估巢式荧光定量PCR法的特异性。同时将洋葱伯克霍尔德菌的菌液和基因组DNA进行浓度梯度稀释,继续进行巢式荧光定量PCR,确定此方法的灵敏度。最后用巢式荧光定量PCR法和Vitek 2 Compact仪器分别鉴定35例临床标本,比较两者的检出能力。**结果** 巢式荧光定量PCR法只针对洋葱伯克霍尔德菌有扩增曲线,而对其他菌株无检测信号。同时,巢式荧光定量PCR法的检测下限是 $1 \times 10^1$  CFU/mL的菌液和 $1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L的基因组DNA,具有较高的灵敏度。巢式荧光定量PCR法能有效检测出14例临床标本存在洋葱伯克霍尔德菌感染(检出率为40.0%),而Vitek 2 Compact仪器仅检测出10例(检出率为28.6%),其中4例无法识别。**结论** 巢式荧光定量PCR法具有有效、快速和直接应用于临床检测的优点,并且特异、灵敏和准确等特点,值得在临床推广。

**[关键词]** 洋葱伯克霍尔德菌; *recA* 基因; 巢式荧光定量PCR; 临床检测

### Establishment of nested fluorescent quantitative PCR for rapid detection of *Burkholderia cepacia*

LIN Liying\*, DENG Suiyan, GUO Xuguang

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong, China, 510150)

**[ABSTRACT]** **Objective** To establish a nested fluorescent quantitative PCR method for the detection of *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*). **Methods** According to the sequence of *recA* gene, the external primers for PCR amplification and the internal primers for fluorescent quantitative PCR were designed. Using the reference strains of *B. cepacia* and other bacteria as templates, the first round of PCR amplification was carried out with external primers; the PCR products were used as templates, and the expression level of *recA* gene was detected by SYBR Green dyebased fluorescent quantitative PCR with internal primers to evaluate the specificity of nested fluorescent quantitative PCR. At the same time, the bacterial solution and genomic DNA of *B. cepacia* were diluted by concentration gradient, and the nested fluorescent quantitative PCR was carried out to determine its sensitivity. Finally, 20 clinical specimens were identified by nested fluorescent quantitative PCR and VITEK 2 compact respectively, and their detection ability was compared. **Results** Nested fluorescent quantitative PCR only had amplification curve for *B. cepacia*, but no detection signal for other strains. At the same time, the detection limit of nested fluorescent quantitative PCR was  $1 \times 10^1$  CFU/mL bacterial solution and  $1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L genomic DNA, which had high sensitivity. The nested fluorescent quantitative PCR effectively detected *B. cepacia* infection in 14 clinical samples (detection rate=40.0%), but only 10 cases were detected by VITEK 2 compact instrument (detection rate=28.6%), among which 4 cases could not be identified, indi-

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20161A010082)

作者单位:广州医科大学附属第三医院检验科,广东,广州 510150

\*通信作者:林丽英, E-mail: 1293027089@qq.com

cating that the nested fluorescent quantitative PCR had more accurate detection performance. Conclusion Nested fluorescent quantitative PCR is an effective, rapid and direct method for clinical detection of *Burkholderia cepacia*.

[KEY WORDS] *Burkholderia cepacia*; *RecA* gene; Nested fluorescent quantitative PCR; Clinical detection

洋葱伯克霍尔德菌复合体(*Burkholderia cepacia* complex, Bcc)由一组广泛分布于自然界和人工环境中的相关细菌组成,是革兰氏阴性、运动性和需氧菌,具有非发酵特性<sup>[1-2]</sup>。它们生活在自然界,特别是土壤、水和植物产品中,是多种抗药性的有机体,能抵抗许多消毒剂、清洁剂和防腐剂的影响<sup>[1]</sup>。Bcc还具有形成生物膜和污染塑料、金属、水系统以及制药设施的巨大能力<sup>[1]</sup>。近年来在临床检测中逐渐发现,洋葱伯克霍尔德菌是一种机会性病原体,主要在免疫低下人群中引起疾病。由其引起的最严重的疾病包括肺炎或细菌感染,这些疾病发生在免疫系统受损或慢性肺病患者身上,特别是囊性纤维化<sup>[3-5]</sup>。因此,如何方便检测出洋葱伯克霍尔德菌感染,将有利于临床用药治疗。尽管,对洋葱伯克霍尔德菌的分类研究已经改进了其鉴定,但将洋葱伯克霍尔德菌与其他相关分类群,如罗氏菌、铜毒菌、无色杆菌和短枝单胞菌等的区分仍然很困难<sup>[6]</sup>。在用于鉴定洋葱伯克霍尔德菌的分子方法中,基于 *recA* 基因的分析目前具有较高的分辨能力,能够比较有效区分 Bcc 群内菌种<sup>[7]</sup>。因此,本研究根据已有检测方法进行改良,期望建立一种能直接快速进行临床检测洋葱伯克霍尔德菌感染的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与标本

洋葱伯克霍尔德菌标准株(ATCC 25416)、铜绿假单胞菌(ATCC 9027)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌(ATCC 6633)、大肠杆菌(ATCC 8739)、沃氏葡萄球菌、藤黄微球菌、荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、皮氏罗尔斯顿菌和阿邦尼沙门氏菌购自中国菌种保藏中心。35例痰标本来源于广州医科大学附属第三医院的囊性纤维化患者,所有患者均签署知情同意书,且本研究经本院伦理委员会批准进行。检测标本例数的确定根据诊断试验样本量计算公式进行计算,其中  $Z_{1-\alpha/2}=1.96$ ,  $P=0.9$  为敏感度,  $\delta=0.1$  为把握度,则达到统计差异所需样本量约为 35。

$$\text{诊断试验样本量计算公式: } n = \left( \frac{Z_{1-\alpha/2} \times \sqrt{P \times (1-P)}}{\delta} \right)^2$$

### 1.2 基因组 DNA 提取

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行,先离心收集菌体,加入重悬液彻底悬浮。加入蛋白酶 K 和裂解液,漩涡振荡混匀形成均一的悬浮液,65℃温浴 10 min。加入无水乙醇上下颠倒混匀,然后转移到纯化柱中,12 000 rpm 离心 1 min,弃滤液。加入去蛋白液和漂洗液洗涤,空甩以彻底去除纯化柱中残留的液体。向纯化柱中央处悬空加入 50 μL 洗脱液,室温放置 2 min 后于 13 000 rpm 离心 2 min,管底即为高纯度基因组 DNA。继续用分光光度计测得 DNA 浓度,剩余样品可放置 -20℃ 保存。

### 1.3 巢式荧光定量 PCR

以提取基因组 DNA 为模板,用外引物 BCR1-F(5'-ATGACCGCCGAGAAGAGCAA-3')和 BCR1-R(5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3')进行第一轮 PCR 扩增,反应条件如下:96℃ 5 min,(96℃ 30 sec、58℃ 30 sec、72℃ 1 min)25 个循环,72℃ 10 min。以第一轮 PCR 产物 1 μL 作为模板,以内引物 *recA*-MF(5'-ATGACCGCCGAGAAGAG-3')和 *recA*-MR(5'-TGGAGACGACCTGGATAT-3')进行染料法荧光定量 PCR,反应条件如下:95℃ 5 min,(95℃ 15 sec、60℃ 32 sec)40 个循环。

### 1.4 菌种的生化鉴定

采用 Vitek-2 Compact 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司生产)和配套的革兰氏阴性菌(Gram-negative, GN)鉴定卡进行临床标本的菌种生化鉴定,按仪器的操作手册进行。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,应用  $\chi^2$  检验比较分析两种检测方法的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 巢式定量 PCR 的特异性

为了提高检测的特异性,本研究首先针对

*recA* 基因设计外引物进行首轮扩增,然后以此产物为模板,利用内引物进行荧光定量 PCR。结果表明,只有洋葱伯克霍尔德菌的标准株(*B.cepacia* ATCC 25416)有扩增曲线,而其他参考菌株均没有明显的扩增曲线(图1)。这说明,本方法可以特异检测洋葱伯克霍尔德菌,而对其他菌株呈阴性反应。

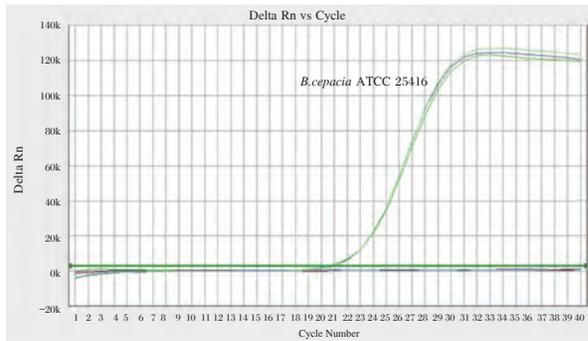


图1 不同菌株进行巢式定量 PCR 的扩增曲线

Figure 1 Amplification curves of nested quantitative PCR for different bacterial strains

### 2.2 巢式定量 PCR 的灵敏度

对洋葱伯克霍尔德菌进行计数,计算出菌液浓度后进行梯度稀释:  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^0$  CFU/mL。对上述梯度菌液进行巢式定量 PCR 检测发现,除了浓度  $1 \times 10^0$  CFU/mL 外,上述其他浓度的菌液均有良好的扩增曲线,低至  $1 \times 10^1$  CFU/mL 的菌液仍能被检测出(图2)。进一步提取洋葱伯克霍尔德菌的基因组 DNA 进行定量,按所得浓度进行梯度稀释:  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L。各取 1  $\mu$ L 进行检测发现,除了  $1 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L 的菌液外,低至  $1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L 的菌液仍然有良好的扩增曲线(图3)。

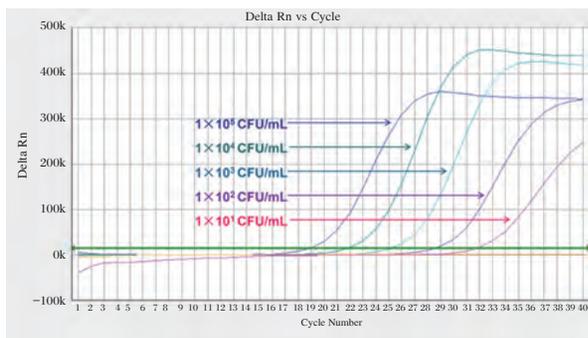


图2 不同浓度洋葱伯克霍尔德菌进行巢式定量 PCR 的扩增曲线

Figure 2 Amplification curves of Burkholderia cepacia with different concentrations by nested quantitative PCR

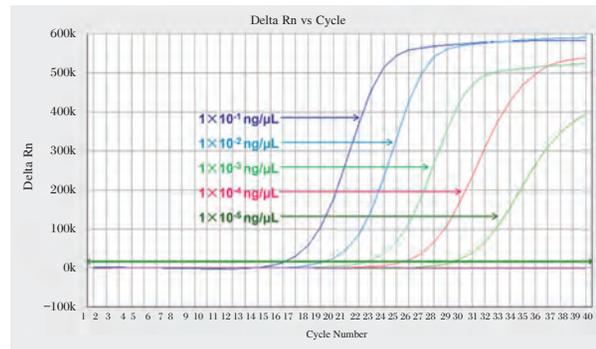


图3 洋葱伯克霍尔德菌不同浓度基因组 DNA 进行巢式定量 PCR 的扩增曲线

Figure 3 Amplification curves of Burkholderia cepacia genomic DNA in different concentrations by nested quantitative PCR

### 2.3 巢式定量 PCR 对临床标本的检测结果

收集 35 例囊性纤维化患者痰标本分别用巢式定量 PCR 和 Vitek 2 Compact 仪器进行鉴定。检测结果发现, Vitek 2 Compact 仪器鉴定出 10 例标本有洋葱伯克霍尔德菌感染,有 4 例标本未检出,其余为其他细菌感染。而用巢式定量 PCR 检测表明,与 Vitek 2 Compact 仪器鉴定结果相比,其他细菌感染的标本无信号,但检测出洋葱伯克霍尔德菌感染的标本共 14 例,含 Vitek 2 Compact 仪器无法检测的 4 例标本。巢式定量 PCR 比 Vitek 2 Compact 仪器对洋葱伯克霍尔德菌感染的检出率更高,但差异无统计学意义( $\chi^2=0.560$ ,  $P=0.454$ )。

## 3 讨论

近年来的临床检测发现,洋葱伯克霍尔德菌已成为人类感染的主要致病菌,已在多种疾病中被检测到,能加重疾病的进展<sup>[1]</sup>。因而,建立一种快速有效的临床检测方法能有利于疾病的及时治疗,减轻疾病向重症发展。

对于细菌的鉴定,目前已有成熟的方法,就是针对 16S rRNA 进行特异扩增或序列测定,是细菌鉴定的金标准<sup>[8]</sup>。但 16S rRNA 的序列在 Bcc 菌种间的同源性高达 98%~100%,从而无法将 Bcc 鉴别到种<sup>[8]</sup>。近年来对洋葱伯克霍尔德菌的序列分析表明,其 *recA* 基因序列能有效区分 Bcc 群内菌种<sup>[8-10]</sup>。因此,目前针对 *recA* 基因而展开的检测方法已有一定的进展。例如,周江林等<sup>[8]</sup>根据 *recA* 基因全长序列而进行的菌株全基因组平均核酸一致性值比较能有效纠正 Bcc 复合群细菌的种鉴定

信息。比较 *recA* 标准序列比对法和多位点序列分型技术对 Bcc 种别鉴定的效果发现,两种方法的一致性为 98.9%,但 *recA* 标准序列比对法具有更高的灵敏度(98.9%),且特异度达到 100%,因而认为 *recA* 标准序列比对法更适合于医院感染流行病学调查和临床筛检<sup>[11]</sup>。余萌等<sup>[12]</sup>也认为,*recA* 序列同源性分析可将药品中污染的 Bcc 菌有效鉴别到种水平。本研究根据 *recA* 基因序列设计引物进行检测发现,本方法具有良好的特异性,只针对洋葱伯克霍尔德菌有扩增信号,而对其他菌属无扩增信号。因此,根据 *recA* 基因进行洋葱伯克霍尔德菌鉴定检测具有理论可行性和实际应用意义。

目前对于洋葱伯克霍尔德菌的鉴定检测已发展出多种方法,且不断在改进中。例如,根据伯克霍尔德菌属的 *gyrB* 基因设计引物,扩增测序后进行聚类比对分析发现,此方法可满足“种”水平的鉴定<sup>[13]</sup>。针对另一个特异基因 *hisA* 的研究也指出,所扩增的 442 bp 的 *hisA*-DNA 片段进行测序后,构建系统发育树表明 *hisA* 区可以区分所有 Bcc 物种,说明该基因片段可用于 Bcc 菌株的鉴定<sup>[14]</sup>。孙谦等<sup>[15]</sup>利用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的方法可将洋葱伯克霍尔德菌群快速准确的鉴定至基因型。但 Furlan 等<sup>[16]</sup>比较了不同的鉴定方法发现,表型鉴定不适用于 Bcc 病原体的鉴定,VITEK 2 和 MALDI-TOF MS 只能鉴定到不同的细菌属,16S rRNA 测序和 *recA* 基因 PCR 扩增能鉴定到 Bcc 菌群,且 *recA* 基因 PCR 扩增具有更高的特异性。Lambiase 等<sup>[17]</sup>也认为,MALDI-TOF MS 对于 Bcc 的鉴定具有一定的局限性。Zakharova 等<sup>[18]</sup>建立了一种基于检测单个  $\beta$ -内酰胺酶基因集的多重 PCR 方法,能用于类鼻疽伯克霍尔德菌、鼻疽伯克霍尔德氏菌、泰国伯克霍尔德菌和 Bcc 的一步鉴定和分类;两对针对一类独特的金属  $\beta$ -内酰胺酶基因的特异性引物和一对针对苯唑西林水解 D 类  $\beta$ -内酰胺酶基因特异性引物可成功区分 Bcc 内的物种。上述有些方法准确度较高,但仍存在一定的缺点,不够快速、直接和灵敏。

鉴于荧光定量 PCR 的特异、灵敏和快速方便等特点,其已越来越多的应用于临床检测中。例如,傅琼瑶等<sup>[19]</sup>根据类鼻疽伯克霍尔德菌 III 型分泌系统保守基因的序列设计特异引物和探针,采用实时荧光定量 PCR 技术检测发现,此方法灵敏度可达到 10 copies/ $\mu$ L,可检测出土壤标本中低浓

度的类鼻疽伯克霍尔德菌。Jimenez 等<sup>[20]</sup>利用实时荧光定量 PCR 检测 16S rRNA 的表达可有效检测出药品中污染的低浓度洋葱伯克霍尔德菌,其最低检测浓度为 10 fg/ $\mu$ L,相关系数为 0.98。Wright 等<sup>[21]</sup>针对 *recA* 基因进行的实时定量 PCR 也能有效检测出患者中的洋葱伯克霍尔德菌感染。本研究在上述的基础上,采用巢式荧光定量 PCR 的方法,进一步提高了洋葱伯克霍尔德菌感染的检出率,具有更好的检测应用价值。

本研究表明,巢式荧光定量 PCR 是一种可靠的方法,可直接用于临床洋葱伯克霍尔德菌感染的快速检测,从而为疾病的及时和准确治疗提供极大的便利性。

## 参考文献

- [1] 王玉萍,李小宁,张莺莺. 洋葱伯克霍尔德复合体研究新进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(1): 101-104.
- [2] Jin Y, Zhou J, Zhou J, et al. Genome-based classification of Burkholderia cepacia complex provides new insight into its taxonomic status[J]. Biol Direct, 2020, 15(1): 6.
- [3] Sfeir MM. Burkholderia cepacia complex infections: More complex than the bacterium name suggest [J]. J Infect, 2018, 77(3): 166-170.
- [4] 郝丽薇,李轶,袁有华,等. 洋葱伯克霍尔德菌院内感染的临床分布及耐药性分析[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2019, 37(1): 67-69.
- [5] 孙国先,单清,林涛,等. 洋葱伯克霍尔德菌耐药及用药合理性分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(3): 278-281.
- [6] Attia MA, Ali AE, Essam TM, et al. Direct Detection of Burkholderia cepacia in Susceptible Pharmaceutical Products Using Semi-Nested PCR [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2016, 70(2): 99-108.
- [7] Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2019, 18(1): 7.
- [8] 周江林,孔娜,张琪,等. 洋葱伯克霍尔德菌复合群部分菌株基于基因组的物种水平重鉴定[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(6): 733-739.
- [9] 黄庭轩,赵梦馨,周幅萍,等. 利用 *recA* 基因序列分析鉴定云南醇米面中伯克霍尔德菌属分离株[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(5): 526-532.
- [10] Kong Q, Xiaof M, Kong F, et al. Assignment of *recA* reference sequence types for enhanced identification of the Burkholderia cepacia complex [J]. Pathology, 2012, 44(4): 373-375.

## 56℃加热灭活对流感病毒核酸检测结果影响的初步研究

周百灵 杨光能 陈俊伶 冯星星 许彬 奎莉越 杜廷义\*

**[摘要]** 目的 探讨采用56℃、30 min的加热灭活病毒方法对甲型流感病毒以及乙型流感病毒的核酸检测结果的影响。方法 收集2020年1月至2月期间本院检测的47例流感病毒实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)核酸检测阳性(其中21例为甲型流感病毒,26例为乙型流感病毒)以及14例流感病毒核酸检测阴性、口咽拭子标本,分别采用56℃、30 min的加热灭活方法和未灭活处理的常规方法进行qPCR检测,比较两种方法之间的核酸检测结果。结果 在流感病毒阳性标本中加热后阳性结果符合率为100%,在流感病毒阴性标本中加热后阴性结果符合率为100%;甲型流感病毒未灭活的循环阈值(Ct)值为(26.98±5.07),加热后Ct值为(27.95±4.76),乙型流感病毒未灭活的Ct值为(24.83±3.77),加热后Ct值为(24.80±3.32),两种流感病毒加热后及未灭活Ct结果之间差异无统计学意义( $P>0.05$ );两种流感病毒加热后与未灭活的Ct结果具有良好的一致性。结论 采用56℃、30 min加热灭活病毒的方法,对口咽拭子标本的甲型流感病毒及乙型流感病毒的qPCR检测结果均无明显影响。

**[关键词]** 病毒灭活;实时荧光定量聚合酶链式反应;流感病毒;口咽拭子

### Preliminary study on the effect of 56℃ heat inactivation on the detection of influenza virus nucleic acids

ZHOU Bailing, YANG Guangneng, CHEN Junling, FENG Xingxing, XU Bin, KUI Liyue, DU Tingyi\*

(Department of Laboratory Medicine, Kuming Children's Hospital, Kuming, Yunnan, China, 650100)

**[ABSTRACT]** Objective To explore the effect of heat inactivation at 56℃ for 30 min on the detection of nucleic acids from influenza A and B virus. Methods From January to February 2020, 47 cases of influenza viruses which were positive in oropharyngeal swab specimens detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), including 21 cases of influenza A virus and 26 cases of influenza B virus, and 14 cases of influenza A and B virus both negative in oropharyngeal swab specimens detected by qPCR were selected as the study objects. They were divided into two groups. One group was detected by qPCR without heating, and the other was detected by qPCR after heating at 56℃ for 30 min. The results of the nucleic acid detection were compared between two groups. T test was used to compare the two groups. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between the two groups. Results The coincidence rate is 100% of both influenza virus positive and negative samples after heat inactivation compared to non-heat inactivation. The cycling threshold (Ct) value of influenza A virus before heat inactivation was 26.98±5.07, and 27.95±4.76 after heat inactivation. The Ct value of influenza B virus before inactivation was 24.83±3.77, and 24.80±3.32 after heat inactivation. There was no significant difference between the Ct results between two groups ( $P>0.05$ ). Conclusion The method of heat inactivation at 56℃ for 30min had no significant effect on the qPCR test

基金项目:昆明市科技局新型冠状病毒感染肺炎科技防治专项基金项目(2020-1-N-057)

作者单位:昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650100

\*通信作者:杜廷义, E-mail:timkally@163.com

results of influenza A and B virus in oropharyngeal swab samples.

[KEY WORDS] Virus inactivation; Quantitative real-time polymerase chain reaction; Influenza viruses; Oropharyngeal swab

流行性感(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,是人类面临的主要公共健康问题之一<sup>[1]</sup>。流感病毒属于正粘病毒科,为单股、负链、分节段的RNA病毒,根据核蛋白和基质蛋白分为甲、乙、丙三型,其中甲型流感病毒的抗原变异性最大,在本世纪的四次流感大流行均是由甲型流感病毒引起的<sup>[1-2]</sup>。核酸检测是流感病毒确诊的主要方法之一<sup>[3]</sup>,在季节性流感及流感大流行中都发挥重要作用,但核酸提取过程中可能存在的暴露风险,限制了基层实验室开展该技术,因此简单有效的病毒灭活前处理方法,有利于流感监测网络的扩大以及降低检验人员检测时的感染风险。目前新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)已成为全球大流行<sup>[4]</sup>,而流感作为新型冠状病毒的主要鉴别疾病之一<sup>[5]</sup>,也让流感的核酸检测面临着更高的感染风险。在《流行性感与治疗指南(2011版)》中指出流感病毒一般可在56℃、30 min被灭活,而此温度也为许多指南中<sup>[6-7]</sup>建议新型冠状病毒的灭活温度。本研究通过对口咽拭子样本加热56℃、30 min病毒灭活的条件,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)进行流感病毒的检测,分析灭活前和灭活后甲型流感病毒及乙型流感病毒核酸结果,对本实验室疫情监测需要做准备,做了初步探讨,进行初步的数据积累,报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集本院2020年1月31日至2020年2月15日收取的47例流感病毒qPCR核酸检测阳性的口咽拭子标本(21例为甲型流感病毒,26例为乙型流感病毒),其中阳性标本包括强阳性( $n=27$ ,  $Ct \leq 26$ ),中等阳性( $n=16$ ,  $26 < Ct \leq 33$ )和弱阳性( $n=4$ ,  $33 < Ct \leq 39$ );以及14例甲型流感病毒和乙型流感病毒qPCR核酸检测均为阴性的口咽拭子标本。

### 1.2 试剂与仪器

ABI7500荧光定量PCR仪(美国ThermoFisher公司);甲型流感病毒核酸检测试剂盒(中山大学

达安基因股份有限公司);乙型流感病毒核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)。

### 1.3 标本处理

将-20℃冻存的口咽拭子标本(含有1 mL病毒运输液),复融后,分别吸取200  $\mu$ L于两个无菌离心管中,一份用于常规甲型流感病毒及乙型流感病毒的核酸检测,另一份先在56℃水浴箱中水浴30 min后再进行常规甲型流感病毒和乙型流感病毒核酸检测的常规操作。

### 1.4 核酸提取和PCR扩增

采用中山大学达安基因股份有限公司的甲型流感病毒核酸检测试剂盒和乙型流感病毒核酸检测试剂盒提取病毒RNA,按试剂盒操作说明进行。在ABI7500型荧光定量PCR仪上进行核酸检测,反应条件如下:50℃、15 min  $\rightarrow$  95℃、15 min  $\rightarrow$  94℃、15 s  $\rightarrow$  58℃、45 s(45个循环)。采用循环阈值(cycling threshold, CT)进行计算。试剂盒采用一步法实时荧光PCR技术。每批次实验均同时检测阴性质控品,临界阳性质控品和强阳性质控品。

### 1.5 检测结果判断

①甲型流感病毒阳性结果的判读标准为FAM检测通道有扩增曲线且 $Ct$ 值 $\leq 39.7$ ,乙型流感病毒阳性结果判读标准为FAM检测通道有扩增曲线且 $Ct$ 值 $\leq 38.0$ ;②甲型流感病毒阴性结果的判读标准为FAM检测通道无扩增曲线或FAM检测通道有扩增曲线且 $Ct$ 值 $> 39.7$ ,乙型流感病毒阴性结果判读标准为FAM检测通道无扩增曲线或FAM检测通道有扩增曲线且 $Ct$ 值 $> 38.0$ 。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS 26.0统计软件及GraphPad Prism软件(Version 8.0)进行处理,计量资料( $\bar{x} \pm s$ )表示,符合正态分布数据,两组数据间比较采用 $t$ 检验,一致性分析采用Bland-Altman分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 流感病毒阳性标本未加热和加热灭活后的qPCR结果比较

对21例甲型流感病毒核酸检测阳性及26例

乙型流感病毒核酸检测阳性的咽拭子标本进行未加热和加热后的qPCR结果比较。两种流感病毒在加热后结果均为阳性,阳性结果符合率为100%。未加热和加热56℃、30 min后其Ct结果之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表1及表2。

表1 未加热和加热灭活后的qPCR结果  
Table 1 The qPCR results of unheated and heat inactivation

甲型流感病毒 Ct 值			乙型流感病毒 Ct 值		
未加热	加热后	差异	未加热	加热后	差异
32.52	32.83	0.31	30.36	28.72	-1.64
30.93	30.38	-0.55	25.60	26.73	1.13
30.26	36.64	6.38	28.31	25.58	-2.74
35.73	26.12	-9.61	23.02	23.81	0.79
26.55	20.79	-5.76	23.03	23.39	0.36
20.52	26.46	5.94	22.48	22.22	-0.26
27.74	31.06	3.33	20.80	21.67	0.87
24.05	23.32	-0.73	23.23	23.45	0.23
26.37	24.20	-2.18	20.88	21.46	0.58
28.18	27.05	-1.13	20.50	20.94	0.44
25.58	25.81	0.22	24.13	24.51	0.38
28.53	28.62	0.09	24.78	25.11	0.32
22.78	23.44	0.66	26.25	26.65	0.40
23.04	28.60	5.57	20.98	21.99	1.01
23.03	28.32	5.29	25.42	26.24	0.82
23.27	26.24	2.97	19.33	17.54	-1.79
19.56	19.10	-0.46	27.60	28.15	0.55
22.92	28.73	5.80	20.24	22.38	2.15
22.76	27.34	4.59	32.00	31.27	-0.73
37.46	38.17	0.71	26.59	25.15	-1.44
34.84	33.72	-1.13	26.11	26.66	0.55
			32.38	28.77	-3.60
			27.67	26.91	-0.76
			27.34	28.38	1.05
			27.64	28.26	0.62
			18.88	18.88	0

注:差异=加热后 Ct 值-未加热 Ct 值。

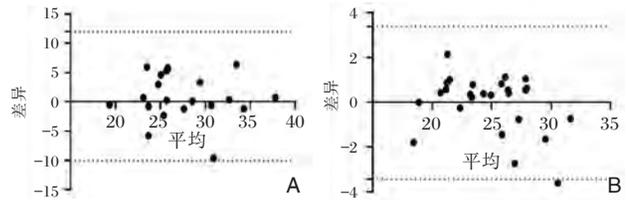
表2 未加热及加热灭活后的qPCR结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of the qPCR results between unheated and heat inactivation ( $\bar{x} \pm s$ )

检测项目	n	未加热	加热后	t 值	P 值
甲流感病毒 Ct 值	21	26.98±5.07	27.95±4.76	-1.100	0.284
乙流感病毒 Ct 值	26	24.83±3.77	24.80±3.32	0.108	0.915

## 2.2 流感病毒阳性标本未加热和加热灭活后的qPCR结果的一致性分析

流感病毒阳性标本加热后和未加热的标本结果具有良好的一致性。甲型流感病毒的qPCR检测分析显示,所有点均在95%的一致性界限的置

信区间以内,且在置信区间以内的差值在临床上可以接受见图1A;图B为乙型流感病的qPCR检测分析显示,其中3.8%(1/26)的点在95%的一致性界限的置信区间以外,小于5%,且在置信区间以内的差值在临床上可以接受。见图1B。



注:图A为甲型流感病毒的结果分析,图B为乙型流感病毒的结果分析

图1 未加热与加热灭活病毒后结果的一致性分析  
Figure 1 Analysis of consistent results between unheated and heat inactivation

## 2.3 流感病毒阴性标本未加热和加热灭活后的qPCR结果比较

对14例甲型流感病毒及乙型流感病毒核酸检测阴性的咽拭子标本进行未加热和加热后的qPCR结果比较,加热后结果全部为阴性结果。阴性结果符合率为100%。

## 3 讨论

加热灭活病毒的方法不引入任何的化学试剂,仅需控制温度和时间,能使病毒的高级结构受到破坏,其蛋白不再有生理活性,而失去感染、致病和繁殖能力<sup>[8-9]</sup>。这种方法在牛奶消毒和血液制品病毒灭活中得到广泛运用,在血液制品中可用于血浆、凝血因子、抗凝血剂、蛋白酶抑制剂和免疫球蛋白等产品的制备<sup>[10]</sup>。而在临床检验方面,为减少实验室人员感染传染性及致病性较强的病毒(如埃博拉病毒、马尔堡病毒及沙拉病毒等)风险,更多研究关注于将血浆或血清标本加热灭活后的对生化结果的影响<sup>[11-12]</sup>,但对加热灭活后对核酸检测的影响研究较少。鄢心革<sup>[13]</sup>等人利用不同温度对SARS冠状病毒抗原性灭活效果的研究中发现,56℃、60 min比56℃、30 min对SARS冠状病毒灭活的效果好,同时此温度灭活30 min及60 min核酸的含量变化不大;陈培松<sup>[14]</sup>等的研究发现56℃、30 min和75%乙醇处理和未灭活处理的标本结果具有明显的相关性且一致性良好;张沁欣<sup>[15]</sup>等的研究发现在没有核糖核酸酶抑制剂的保护

下,56℃灭活导致猪流行性腹泻病毒冠状病毒RNA的明显降解,而添加RNA酶抑制剂后则RNA降解得到一定程度的改善。

本研究采用56℃、30 min进行病毒灭活,此温度下在灭活新型冠状病毒的同时,流感病毒也被灭活,这对实验室核酸检测人员是极大地保护。但从一致性分析及差异结果中可以发现甲型流感病毒阳性标本中有三例标本在加热后其Ct值反而远低于未加热的Ct值,而在乙型流感病毒阳性标本中也发现在加热后其Ct值反而低于未加热的Ct值此现象,考虑原因主要为以下三点:①可能为此温度加热灭活下可以促进RNA和蛋白复合物的分离,因而使得加热灭活后核酸提取效率更高;②本试剂盒检测的甲型流感病毒的亚型不仅仅只有一种,而实际收集的样本中可能含有甲型流感病毒的不同亚型,而不同亚型之间可能对热灭活的效果不一样;③可能手工提取核酸及核酸扩增带来的误差。在甲型流感病毒的实验中,其未加热的qPCR结果与加热后的差异大于乙型流感病毒的差异,是否与加热灭活病毒后对甲型流感病毒的检测效率影响更大尚不明确。

加热灭活病毒的方法操作简单、经济同时不引入其他化学试剂,对样本进行加热灭活病毒的前处理可以降低病毒核酸检测实验室人员的感染风险。对于热灭活病毒后是否影响核酸检测效率存在不同意见<sup>[16]</sup>,而这方面的研究资料也较少,因此加热灭活或其它灭活手段对病毒核酸检测结果的影响评估尤为迫切和重要,因为该项评估的完成有利于加强实验室对高风险样本的处置管理,同时有利于更好地满足特殊情况下临床诊断和鉴别诊断的客观需要。实验室有必要收集整理相关资料,并全面完成灭活手段对临床相关检测项目的影响评估。

本实验室对加热灭活病毒的初步研究中发现,对咽拭子标本采用加热56℃、30 min灭活病毒后再进行甲型流感病毒以及乙型流感病毒的qPCR检测,其结果没有明显影响;但在本研究中也存在许多不足之处:①由于实验室条件限制,不能进行灭活后病毒培养,从而无法评估此条件下病毒灭活的效率,因此其降低实验室检测的生物安全压力的程度尚不能完全评估;②对于流感病毒的阳性标本上,弱阳性标本占比较少(仅有4例甲型流感病毒弱阳性标本),尚不能有效评估加

热灭活对流感病毒核酸检测临界阳性样本的影响。③本次初步研究完全模拟日常检测流程,检测过程中的随机误差因素未得到更为有效的控制。上述不足将在随后展开的评估中得到进一步改进和完善。

## 参考文献

- [1] 卫生部流行性感冒诊断与治疗指南编撰专家组. 流行性感冒诊断与治疗指南(2011年版)[S]. 2020.
- [2] 李玉青,汪宁. 流感的分子流行冰雪研究进展[J]. 疾病控制杂志, 2001, 5(1): 60-62.
- [3] Zhang N, Wang LL, Deng XQ, et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans [J]. J Med Virol, 2020, 92(4):408-417.
- [4] Xifeng Wu, Yuanqing Ye. A public health perspective on preventing and controlling the spread of coronavirus disease, 2019[J]. China CDC Weekly, 2020.
- [5] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(施行第六版)[S]. 2020.
- [6] 中华医学会检验分会. 2019新型冠状病毒肺炎临床实验室检测的生物安全防护指南(试行第一版)[S]. 2020.
- [7] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第四版)[S]. 2020.
- [8] 张文福. 病毒灭活检验技术[J]. 中华消毒学杂志, 2004, 21(3): 260-261.
- [9] 白玉龙,高玉凤,袁鸿宾,等. 同种异体及异种组织修复材料:如何选用适宜的病毒灭活工艺[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(14): 2261-2268.
- [10] 陈柯君,李健. 血液制品病毒灭活的研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(2): 166-171.
- [11] C I Bhagat, M Lewer, A Prins, J P Beilby. Effects of heating plasma at 56℃ for 30 min and at 60℃ for 60 min on routine biochemistry analytes[J]. Ann Clin Biochem, 2000, 37: 802-804.
- [12] Chong YK, Ng WY, Chen PL, Chloe M Mak. Effects of a plasma heating procedure for inactivation Ebola virus on common chemical pathology tests[J]. Hong Kong Med J, 2015, 21(3):201-207.
- [13] 鄢心革,郑焕英,李杰,等. 不同温度对SARS冠状病毒抗原性灭活效果的影响[J]. 华南预防医学, 2003, 29(3): 61-62.
- [14] 陈培松,何宇婷,黄裕立,等. 不同方式灭活口咽拭子标本对2019新型冠状病毒实时荧光定量PCR检测结果的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43. 网络预发表:DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.20200004.
- [15] 张沁欣,赵庆顺. 病毒核酸提取前的高温灭活过程显著降低可检出病毒核酸模板量[J]. [ChinaXiv:202002.00034], 2020.
- [16] 王成彬. 关于新型冠状病毒核酸检测阳性率低的一点看法 [EB/OL]. (2020-02-10) <https://mp.weixin.qq.com/s/e8JoY2n7pGaQ1vxN6PGp9g>.

## 2型糖尿病患者颈动脉中层内膜厚度与hs-CRP、UAER的相关性

谢军<sup>1</sup> 孙媛媛<sup>2\*</sup> 余其贵<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探析2型糖尿病(T2DM)患者颈动脉中层内膜厚度(CIMT)与超敏C反应蛋白(hs-CRP)、尿白蛋白排泄率(UAER)的相关性。方法 收集本院2018年1月至2019年12月收治的T2DM患者63例,采用彩色多普勒超声诊断仪检测CIMT,基于CIMT分组,正常组(CIMT $\leq$ 0.9 mm)18例,增厚组(CIMT0.9~1.2 mm)23例,斑块组(CIMT $>$ 1.2 mm)22例。对比3组年龄、性别、T2DM病程、BMI、WHR、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖(FPG)、血肌酐(SCr)、空腹胰岛素(FINS)、糖化血红蛋白(HbA1c)、餐后2h血糖(2hPG)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、尿白蛋白排泄率(UAER)等资料,分析CIMT与hs-CRP、UAER的相关性。结果 3组年龄、性别、BMI、WHR、SBP、DBP、FINS、SCr比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );3组病程、HbA1c、TC、HDL-C、LDL-C、hs-CRP、UAER比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );斑块组、增厚组FPG、2hPG、TG均明显高于正常组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。T2DM患者CIMT与病程、FPG、2hPG、HbA1c、TG、TC、LDL-C、hs-CRP、UAER呈正相关性( $P<0.05$ ),与HDL-C呈负相关性( $P=0.027$ )。结论 T2DM患者CIMT与hs-CRP与UAER密切相关,hs-CRP与UAER联合检测可预测评估T2DM患者早期大血管病变或AS。

**[关键词]** 2型糖尿病;颈动脉中层内膜厚度;超敏C反应蛋白;尿白蛋白排泄率;相关性

### Correlation between carotid intima thickness and hs-CRP、UAER in patients with type 2 diabetes mellitus

XIE Jun<sup>1</sup>, SUN Yuanyuan<sup>2\*</sup>, YU Qigui<sup>1</sup>

(1. Department of General Medicine, The No.2 People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui, China, 230011;

2. Department of Clinical Nutrition, The No.2 Hospital of Hefei, Hefei, Anhui China, 230011)

**[ABSTRACT]** Objective To analyze the correlation between carotid medial intimal thickness (CIMT) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and urine protein excretion rate (UAER) in patients with type 2 diabetes (T2DM). Methods 63 T2DM patients admitted to our hospital from January 2018 to December 2019 were collected, and the color Doppler ultrasound diagnostic instrument was used to detect CIMT. Based on CIMT grouping, 18 patients in normal group (CIMT  $\leq$  0.9 mm) and 23 in thickened group (CIMT 0.9~1.2 mm) and 22 in plaque group (CIMT  $>$  1.2 mm). The age, sex, T2DM course, BMI, WHR, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), fasting blood glucose (FPG), serum creatinine (SCr), fasting insulin (FINS), glycosylated hemoglobin (HbA1c), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and 2h blood glucose after meals (2hPG), urinary protein excretion rate

基金项目:2017年安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(1704f0804042)

作者单位:1.合肥市第二人民医院全科医学科,安徽,合肥 230011

2.合肥市第二人民医院临床营养科,安徽,合肥 230011

\*通信作者:孙媛媛, E-mail:ahmusyy@sina.com

(UAER) were compared, and the correlation between CIMT and hs-CRP and UAER was analyzed. Results There were no statistically significant differences in age, gender, BMI, WHR, SBP, DBP, FINS, and SCr in the three groups ( $P>0.05$ ). The differences in the course of disease, HbA1c, TC, HDL-C, LDL-C, hs-CRP, and UAER in the three groups were statistically significant ( $P<0.05$ ). FPG, 2hPG and TG in the plaque and thickening group were significantly higher than those in the normal group ( $P<0.05$ ). CIMT was positively correlated with the course of disease, FPG, 2hPG, HbA1c, TG, TC, LDL-C, hs-CRP, and UAER in T2DM patients ( $P<0.05$ ), and negatively correlated with HDL-C ( $P=0.027$ ). Conclusion CIMT and hs-CRP are closely related to UAER in T2DM patients. The combined detection of hs-CRP and UAER can predict the early assessment of macrovascular disease or AS in T2DM patients.

[KEY WORDS] 2 diabetes mellitus; Carotid intima thickness; Hypersensitive C reactive protein; Urinary protein excretion rate; Correlation

国内 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 患病基数巨大, 各类 T2DM 所致相关并发症亦呈增长趋势进展。据调查<sup>[1]</sup>, 心血管病变因素死亡的 T2DM 患者最高, 动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 则是糖尿病患者心脑血管疾病进展核心因素。研究认为<sup>[2]</sup>, T2DM 患者颈动脉中层内膜厚度 (Carotid Intima-Media Thickness, CIMT) 增加是发生 AS 早期指标。刘培健等<sup>[3]</sup>认为, 尿微量白蛋白属心血管病变高危影响因素之一, 亦是心血管事件独立预测指标。研究证实<sup>[4]</sup>, T2DM 与 AS 病变进展中均有慢性炎症反应, C 反应蛋白 (C-reactive Protein, CRP) 则是 AS 疾病重要标志物之一, 但 T2DM 患者早期 CIMT 增厚过程仅存在低量 CRP, 故本研究检测超敏 C 反应蛋白 (Highsensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 与尿白蛋白排泄率 (Urinary albumin excretion rate, UAER), 探析 T2DM 患者 CIMT 与 hs-CRP、UAER 的相关性。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集本院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月收治的 T2DM 患者 63 例, 年龄 53~72 岁, 平均年龄 ( $63.81\pm 6.02$ ) 岁, 男性 41 例, 女性 22 例。均检查符合中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) 诊断标准<sup>[5]</sup>, 病程 1~17 年, 平均病程 ( $9.52\pm 4.17$ ) 年。纳入标准: ① T2DM 确诊<sup>[5]</sup>; ② 近期 (3 个月内) 无感染史; ③ 意识清晰, 遵医行为良好; ④ 无急性代谢紊乱; ⑤ 近期末服用噻唑烷二酮类药物; ⑥ 所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准: ① 合并心衰; ② 肝、肾功能障碍; ③ 伴免疫系统疾病; ④ 甲状腺疾病; ⑤ 恶性肿瘤; ⑥ 高血压; ⑦ 吸烟、酗

酒史; ⑧ 糖尿病引发肾病、神经病变、视网膜病变等; ⑨ 心绞痛、心肌梗死病史。本实验通过医院伦理委员会批准同意。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CIMT 检测

采用 LOGIQ500 型彩色多普勒超声诊断仪 (美国 GE), 患者垫高肩部, 颈部呈后仰状, 伸展暴露颈部, 以线振型探头, 频率调控 8.2~10.0 MHz, 测定左右两侧 CIMT, 测量点选择颈总动脉、交叉部及颈内外动脉, 均扫描交叉膨大点、近心 1 cm 点、远心 1 cm 点, 双侧颈动脉监测 12 个点, 取左右 CIMT 均值为检出结果。参考《中国高血压防治指南》定义的动脉粥样硬化靶器官损害标准<sup>[6]</sup>, 将 T2DM 患者分为正常组 ( $CIMT\leq 0.9$  mm), 增厚组 ( $CIMT 0.9\sim 1.2$  mm), 斑块组 ( $CIMT>1.2$  mm)。

#### 1.2.2 资料收集

整理患者年龄、性别、T2DM 病程、身高、体重、腰围、臀围, 计算体重指数 (Body Mass Index, BMI) 与腰臀比 (Waist hip ratio, WHR)。

#### 1.2.3 指标检测

监测患者收缩压 (Systolic Blood Pressure, SBP)、舒张压 (Diastolic blood pressure, DBP)。取 T2DM 患者外周静脉血 (空腹) 5 mL, 采用 COBAS 800 型全自动生化检测仪检测总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、空腹血糖 (Fasting blood glucose, FPG)、血肌酐 (Serum creatinine, SCr)、空腹胰岛素 (Fasting insulin, FINS); 采用高效液相色谱分析法检测糖化血红蛋白 (Glycohe-

moglobin A1c, HbA1c); 酶联免疫吸附法检测超敏 C 反应蛋白 (Highsensitivity C-reactive protein, hs-CRP); 患者口服葡萄糖 2 h, 取外周静脉血 2 mL 检测餐后 2 h 血糖 (2hPostprandial blood glucose, 2hPG); 取 3 h 尿液, 用免疫比浊法检测尿白蛋白排泄率 (Urinary albumin excretion rate, UAER)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计数资料以  $n(\%)$ , 行  $\chi^2$  检验, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 呈正态分布, 两组间用  $t$  检验, 多组采用方差分析; 相关性分析采用 Pearson 法, 颈动脉斑块危险影响因素采用 Logistic 多因素回归分析, 以  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

基于 CIMT 测定结果分组, 正常组 (CIMT  $\leq 0.9$  mm) 18 例 (图 1), 增厚组 (CIMT 0.9~1.2 mm) 23 例 (图 2), 斑块组 (CIMT  $> 1.2$  mm) 22 例 (图 3)。

2.1 3 组临床资料比较

3 组年龄、性别、BMI、WHR、SBP、DBP、FINS、SCr 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 3 组病程、HbA1c、TC、HDL-C、LDL-C、hs-CRP、UAER 比较

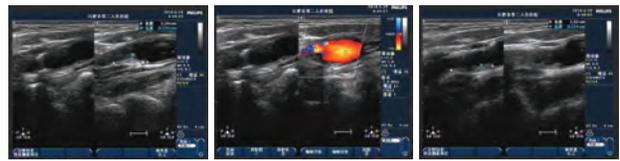


图 1 右侧 CIMT 0.89 mm, 左侧 CIMT 0.87 mm  
Figure 1 CIMT 0.89 mm on the right, CIMT 0.87 mm on the left



图 2 右侧 CIMT 1.02 mm, 左侧 CIMT 1.03 mm  
Figure 2 Right CIMT 1.02 mm, left CIMT 1.03 mm



图 3 右侧 CIMT 1.21 mm, 左侧 CIMT 1.40 mm  
Figure 3 Right CIMT 1.21 mm, left CIMT 1.40 mm

差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 斑块组、增厚组 FPG、2hPG、TG 均明显高于正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表 1。

表 1 3 组临床资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of Clinical Data of 3 Groups ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	正常组 (n=18)	增厚组 (n=23)	斑块组 (n=22)	F 值	P 值
年龄 (岁)	63.47±6.24	63.85±5.72	64.11±5.88	0.06	0.9438
男/女	11/7	16/7	14/8	0.3485	0.8401
病程 (年)	7.95±4.28	9.37±4.05 <sup>a</sup>	11.24±4.12 <sup>a</sup>	3.19	0.0483
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.73±2.17	25.62±2.05	25.43±2.09	0.11	0.8994
WHR	0.91±0.06	0.90±0.07	0.90±0.08	0.13	0.8809
SBP (mmHg)	131.81±13.07	133.54±13.52	134.07±13.66	0.15	0.8615
DBP (mmHg)	80.16±9.62	78.34±9.88	77.28±9.43	0.45	0.6428
FPG (mmol/L)	8.24±1.86	9.59±1.94 <sup>a</sup>	10.42±2.25 <sup>a</sup>	5.73	0.0053
2hPG (mmol/L)	12.57±1.51	13.78±1.63 <sup>a</sup>	14.19±1.72 <sup>a</sup>	5.17	0.0085
HbA1c (%)	7.36±1.09	8.11±1.13 <sup>a</sup>	8.82±1.27 <sup>ab</sup>	7.72	0.0010
TG (mmol/L)	1.68±0.52	2.23±0.61 <sup>a</sup>	2.57±0.66 <sup>a</sup>	10.80	0.0001
TC (mmol/L)	5.73±1.02	6.45±1.12 <sup>a</sup>	7.13±1.15 <sup>ab</sup>	7.98	0.0008
HDL-C (mmol/L)	1.51±0.17	1.28±0.15 <sup>a</sup>	0.98±0.13 <sup>ab</sup>	63.44	0.0000
LDL-C (mmol/L)	2.71±0.31	2.99±0.36 <sup>a</sup>	3.42±0.43 <sup>ab</sup>	18.53	0.0000
FINS (mIU/L)	18.96±5.43	19.34±5.62	19.73±5.77	0.09	0.9110
SCr (mmol/L)	73.46±11.68	75.31±12.72	76.08±12.85	0.58	0.5618
hs-CRP (mg/L)	2.07±0.85	2.79±0.92 <sup>a</sup>	3.85±0.97 <sup>ab</sup>	19.15	0.0000
UAER (μg/min)	18.69±6.28	69.73±15.88 <sup>a</sup>	173.54±41.15 <sup>ab</sup>	182.68	0.0000

注: 与正常组比较<sup>a</sup>  $P < 0.05$ , 与增厚组比较<sup>b</sup>  $P < 0.05$

## 2.2 T2DM 患者 CIMT 与其他因素的相关分析

T2DM 患者 CIMT 与病程、FPG、2hPG、HbA1c、TG、TC、LDL-C、hs-CRP、UAER 呈正相关性,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与 HDL-C 呈负相关性,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表 2。

表 2 T2DM 患者 CIMT 与其他因素的相关分析

Table 2 T2DM Correlation analysis between patient CIMT and other factors

变量	r 值	P 值
病程	0.196	0.039
FPG	0.264	0.015
2hPG	0.253	0.019
HbA1c	0.297	<0.001
TG	0.246	0.018
TC	0.255	0.015
HDL-C	-0.249	0.027
LDL-C	0.316	0.008
FINS	0.197	0.302
SCr	0.062	0.575
hs-CRP	0.329	<0.001
UAER	0.288	<0.001

## 2.3 颈动脉斑块危险因素 Logistic 回归分析

将 T2DM 患者 CIMT>1.2 mm(颈动脉斑块)作为因变量,以病程、FPG、2hPG、HbA1c、TG、TC、HDL-C、LDL-C、FINS、SCr、hs-CRP、UAER 为自变量,行 Logistic 多因素回归分析,结果得出:病程、HbA1c、TC、LDL-C、hs-CRP、UAER 属 T2DM 患者并发颈动脉斑块的危险因素,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表 3。

表 3 颈动脉斑块危险因素 Logistic 回归分析

Table 3 Risk factors Logistic regression analysis of carotid plaque

变量	$\beta$ 值	Wald 值	OR(95%CI)	P 值
病程	2.778	4.982	1.546(1.029~2.142)	0.025
HbA1c	2.661	4.831	1.438(0.985~2.021)	0.023
TC	0.762	4.125	1.223(1.006~1.372)	0.029
LDL-C	0.613	3.686	1.825(1.297~2.605)	0.035
hs-CRP	3.079	6.407	28.464(2.145~73.212)	<0.001
UAER	2.136	4.356	8.564(1.208~43.597)	<0.001

## 3 讨论

研究发现<sup>[7]</sup>,因大血管病变死亡的 T2DM 患者占 60%以上。研究指出<sup>[8]</sup>,颈动脉内膜作为 AS 发展受累初始部位,T2DM 所致早期血管病变亦表现

为动脉血管内膜增厚,并逐步呈粥样硬化斑块进展至动脉血管内腔狭窄。故 CIMT 也是反映颈动脉早期 AS 主要评价指标。

目前临床对 T2DM 并发大血管病变的病因机制尚未定论。但众研究证据表明<sup>[9]</sup>,T2DM 与 AS 均为慢性炎症性病变,受细胞因子介导炎症反应。Jamshid 等<sup>[10]</sup>指出,CRP 与 T2DM 及 AS 等大血管病变均有明显相关性,CRP 可促进 T2DM 患者炎症反应,且属 AS 高危影响因素之一。杨霞等<sup>[11]</sup>研究,CRP 水平增长可促进 T2DM 患者慢性炎症反应,属 T2DM 患者并发 CIMT 增厚影响因素。故 hs-CRP 水平变化可预测、评估 T2DM 患者早期 AS 风险。

新近研究发现<sup>[12]</sup>,微量白蛋白尿与 T2DM 患者大心血管病变有密切关联,亦为心血管疾病独立危险因素之一。张春霞等<sup>[13]</sup>研究,CIMT 与 24 h 尿微量白蛋白有明显相关性。本研究结果发现,UAER 与 T2DM 患者 CIMT 呈正相关,且多因素 Logistic 回归分析证实属颈动脉斑块的危险因素。表明尿白蛋白排泄率增长,预示 T2DM 患者存在大血管病变的可能。分析可知,T2DM 患者微量白蛋白水平增长,即存在全身性内皮细胞功能紊乱,进而损伤微血管,加之机体长期高血糖环境影响,慢性炎症及脂毒性反应对受损内皮细胞的渗透作用,促进大血管病变或 AS 进展<sup>[14]</sup>。故 UAER 可作为反映大血管早期病变指标。

本研究结果表明 HbA1c、TC、LDL-C 属 T2DM 患者并发颈动脉斑块的危险因素。由此推论可知,T2DM 患者血糖、血脂水平及炎症反应均均参与 CIMT 增厚与大血管病变过程,与韩莉莎等<sup>[15]</sup>研究一致。另外本研究各组患者血压比较未见明显差异,可能与本研究病例收集排除高血压有关。

综上所述,T2DM 患者 CIMT 与 hs-CRP 与 UAER 密切相关,hs-CRP 与 UAER 联合检测可预测评估 T2DM 患者早期大血管病变或 AS。

## 参考文献

- [1] Lee J, Wan J, Lee L, et al. Study of the NLRP3 inflammatory component genes and downstream cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with carotid atherosclerosis [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1):217.
- [2] Liu CZ, Zhong Q, Huang YQ. Elevated Plasma miR-29a Levels Are Associated with Increased Carotid Intima-Media Thickness in Atherosclerosis Patients [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 241(3):183-188.

- [3] 刘培健, 王玉林. 老年冠心病合并糖尿病患者尿微量白蛋白水平与冠状动脉病变的关系[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(6):617-619.
- [4] 刘效荣, 张旋, 徐萌, 等. 初诊2型糖尿病合并动脉粥样硬化患者血清CTRP12表达及其机制研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(7):1048-1050.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4):292-344.
- [6] 《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南2018年修订版[J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(1):1-44.
- [7] 洪天配, 母义明, 纪立农, 等. 2型糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病患者降糖药物应用专家共识[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2017, 25(7):481-492.
- [8] Hamamura M, Mita T, Osonoi Y, et al. Relationships Among Conventional Cardiovascular Risk Factors and Lifestyle Habits With Arterial Stiffness in Type 2 Diabetic Patients [J]. J Clin Med Res, 2017, 9(4):297-302.
- [9] Denimal D, Monier S, Brindisi MC, et al. Impairment of the Ability of HDL From Patients With Metabolic Syndrome but Without Diabetes Mellitus to Activate eNOS: Correction by SIP Enrichment [J]. Arteriosclerosis, 2017, 37(5):804-811.
- [10] Vafaieimaneh J, Parham M, Norouzi S, et al. Insulin resistance and coronary artery disease in non-diabetic patients: Is there any correlation? [J]. Caspian J Intern Med, 2018, 9(2):121-126.
- [11] 杨霞, 郭毅, 杨俊杰, 等. 高敏C反应蛋白对2型糖尿病合并冠状动脉临界病变患者斑块进展的预测价值[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(7):632-634.
- [12] 陆德川, 缪从庆, 孟信龙. 血清补体C1q与2型糖尿病患者尿微量白蛋白的相关性研究[J]. 中国医师进修杂志, 2019, 42(3):214-217.
- [13] 张春霞. 2型糖尿病病人同型半胱氨酸水平与靶器官功能损伤的关联性研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(5):932-935.
- [14] 张荣先, 奚雪梅, 宋晓玲, 等. 合并微量白蛋白尿的老年糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度的变化分析[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(5):362-365.
- [15] 韩莉莎, 王琼, 李丹, 等. 普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3):224-228.

(上接第436页)

## 参考文献

- [1] 夏嘉鼎, 赵凯峰, 唐文斌, 等. 脓毒症心肌损伤后心脏舒缩功能的动态变化[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(6):35-38.
- [2] 孙雪莲, 肖红丽, 谭志敏, 等. 脓毒症心肌损伤患者临床特征及危险因素研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(4):494-497.
- [3] 陶金松, 郑若龙, 李健, 等. 脓毒症心肌病患者循环miR-155诊断价值的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(11):1545-1547.
- [4] 周巧, 马渝, 肖玲, 等. 脓毒症患者血清miRNA-21和PCT动态表达及其临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(7):907-912.
- [5] 中国医师协会急诊医师分会, 中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. 中国急救医学, 2018, 38(9):741-756.
- [6] Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature [J]. Crit Care, 2018, 22(1):112.
- [7] Karnad DR, Saseedharan S. Myocardial Dysfunction in Sepsis and Septic Shock [J]. J Assoc Physicians India, 2017, 65(12):11-12.
- [8] 常方圆, 冯泽瑞, 许迎春, 等. miR-21在黄芪甲苷保护ox-LDL诱导的内皮细胞炎症损伤过程中的作用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4):276-282, 309.
- [9] Sheng B, Zhao L, Zang X, et al. miR-375 ameliorates sepsis by downregulating miR-21 level via inhibiting JAK2-STAT3 signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86:254-261.
- [10] Marques-Rocha JL, Garcia-Lacarte M, Samblas M, et al. Regulatory roles of miR-155 and let-7b on the expression of inflammation-related genes in THP-1 cells: effects of fatty acids [J]. J Physiol Biochem, 2018, 74(4):579-589.
- [11] Jekarl DW, Lee S, Kim M, et al. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis based on SEPSIS-3 [J]. J Clin Lab Anal, 2019, 16:e22996.
- [12] Zhou Y, Liu Z, Huang J, et al. Usefulness of the heparin-binding protein level to diagnose sepsis and septic shock according to Sepsis-3 compared with procalcitonin and C reactive protein: a prospective cohort study in China [J]. BMJ Open, 2019, 9(4):e026527.
- [13] 宋于康, 李叶戊子, 王妙淑. 脓毒症早期采用心肌标志物诊断心功能障碍的预后评估[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(10):1631-1633.
- [14] 夏嘉鼎, 苏震, 郑辉宇, 等. 脓毒症性心脏功能障碍患者肌钙蛋白I表达水平的变化及预后评估价值[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(11):1001-1004.
- [15] Li XJ, Tan EL, Zhao CP, et al. Accuracy of intercellular adhesion molecule-1 for diagnosing sepsis: A systematic review and meta-analysis protocol [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(24):e16019.
- [16] Jekarl DW, Kim KS, Lee S, et al. Cytokine and molecular networks in sepsis cases: a network biology approach [J]. Eur Cytokine Netw, 2018, 29(3):103-111.
- [17] Costa RT, Araújo OR, Brunialti MKC, et al. T helper type cytokines in sepsis: time-shared variance and correlation with organ dysfunction and hospital mortality [J]. Braz J Infect Dis, 2019, 23(2):79-85.

## 血清中 OPG、TNF- $\alpha$ 和脂联素对妊娠期糖尿病的诊断分析

温洁\* 刘萍 郭蕊

**[摘要]** 目的 探讨 GDM 孕妇血液循环中的 OPG, TNF- $\alpha$ , 脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$  比值及其与代谢综合征生物标志物的关系和临床意义。方法 使用酶联免疫吸附测定方法测量 40 名 GDM 妇女和 40 名健康孕妇血清中 OPG, TNF- $\alpha$  和总脂联素的水平。分析 OPG、TNF- $\alpha$  和脂联素与妊娠期糖尿病程度的相关性。结果 两组资料比较显示,胎龄、BMI、TG、TC、LDL-C 比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 年龄、FBG、HDL-C、TG/TC、TC/HDL-C、LDL-C/HDL-C、AIP、胰岛素、HOMA-IR、QUICKI 比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。GDM 组的 TNF- $\alpha$  表达水平高于 NGT 组;而 OPG、脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$  的比值显著低于 NGT 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。脂联素/TNF- $\alpha$  比值与胰岛素抵抗呈负相关 ( $r=-0.68$ ,  $P<0.05$ ),甘油三酸酯 ( $r=-0.39$ ,  $P<0.05$ ) 与胰岛素敏感性呈正相关 ( $r=0.69$ ,  $P<0.05$ )。多元线性回归分析表明,脂联素/TNF- $\alpha$  比值与胰岛素抵抗独立相关。二元逻辑回归分析表明,GDM 与 OPG 水平呈正相关,与脂联素/TNF- $\alpha$  比值呈负相关。结论 GDM 孕妇血液循环中的 OPG 水平升高而脂联素/TNF- $\alpha$  比值明显降低。该比率可能是评估孕妇胰岛素抵抗和血脂异常高风险以及 GDM 诊断和治疗监测目标的有效生物标志物。

**[关键词]** 妊娠期糖尿病; 护骨素; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 脂联素; 胰岛素抵抗

### Diagnostic analysis of serum OPG, TNF - $\alpha$ and adiponectin in gestational diabetes mellitus

WEN Jie\*, LIU Ping, GUO Rui

(Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Tangshan, Hebei, China, 063000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore OPG, TNF- $\alpha$ , adiponectin and adiponectin/TNF- $\alpha$  ratio in the blood circulation of gestational diabetes mellitus (GDM) pregnant women and the relationship with metabolic syndrome biomarkers and clinical significance. **Methods** 40 women with GDM and 40 normal pregnant women were recruited in this study. The levels of serum OPG, TNF- $\alpha$  and total adiponectin were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation between OPG, TNF- $\alpha$  and adiponectin and the degree of GDM was analyzed. **Results** There was no statistically significant difference in gestational age, BMI, TG, TC, LDL-C ( $P>0.05$ ). The age of pregnant women, FBG, HDL-C, TG/TC, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, AIP, insulin, HOMA-IR, and QUICKI were statistically significant between two groups ( $P<0.05$ ). The expression level of TNF- $\alpha$  in the GDM group was higher than that in the control group. The ratio of OPG, adiponectin and adiponectin/TNF- $\alpha$  was significantly lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). Adiponectin/TNF- $\alpha$  ratio was negatively correlated with insulin resistance ( $r=-0.68$ ,  $P<0.05$ ). Triglycerides ( $r=-0.39$ ,  $P<0.05$ ) were positively correlated with insulin sensitivity ( $r=0.69$ ,  $P<0.05$ ). Multiple linear

基金项目:河北医学科学研究重点项目(20191162)

作者单位:华北理工大学附属医院妇产科,河北,唐山 063000

\*通信作者:温洁, E-mail: guchengchengpa@163.com

regression analysis showed that the adiponectin/TNF- $\alpha$  ratio was independently related to insulin resistance. Binary logistic regression analysis indicated that GDM was positively correlated with OPG levels and negatively correlated with adiponectin/TNF- $\alpha$  ratio. **Conclusion** the OPG level in the GDM group increased, while the adiponectin/TNF- $\alpha$  ratio decreased significantly. This ratio may be an effective biomarker for assessing pregnant women's high risk of insulin resistance and dyslipidemia, as well as GDM diagnostic and treatment monitoring targets.

[KEY WORDS] Gestational diabetes mellitus; Osteoprotein; Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Adiponectin; Insulin resistance

妊娠糖尿病 (Gestational diabetes mellitus, GDM), 这是在怀孕期间定义为发作或第一诊断葡萄糖耐受不良, 是最重要的妊娠并发症之一<sup>[1-3]</sup>。GDM 会导致胎儿早产、畸形和孕妇的产后发生糖尿病和代谢综合征<sup>[4]</sup>。因此认识与发现 GDM 早期标志具有重要的意义。大量的细胞因子参与了 GDM 的病理生理的发展过程, 近年来, 在 GDM 中越来越多地研究了护骨素 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG)、促炎细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和抗炎细胞因子如脂联素 (adiponectin) 的作用<sup>[5]</sup>。OPG 除参与骨代谢外, 与一些代谢性疾病也有关联。TNF- $\alpha$  是可能在怀孕期间引起胰岛素抵抗的细胞因子之一。在另一方面, 脂联素作为抗炎细胞因子, 通过刺激 AMP 激活的蛋白激酶, 增加骨骼肌葡萄糖摄取促进胰岛素致敏<sup>[6]</sup>。目前的部分研究中得出一些矛盾的结果, 并未清晰的分析出 GDM 发生的可能机制。OPG、TNF- $\alpha$  和脂联素这类炎症细胞因子的失衡会引发各种细胞因子变化, 导致机体能量代谢的紊乱, 从而引发疾病。本研究将探讨与正常耐糖量 (normal glucose tolerance, NGT) 孕妇组相比 GDM 孕妇血液循环中的 OPG、TNF- $\alpha$ 、脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$  比值及其与代谢综合征生物标志物的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2018 年 12 月在华北理工大学附属医院产科建档并接受常规产前检查的 40 名 GDM 初产妇 (GDM 组), 以及 40 名在妊娠 24~28 周时正常的 (NGT 组)。所有患者及家属均已签署知情同意书。本实验获得医院伦理委员会批准同意。

纳入标准: ①单胎、头胎妊娠初产妇; ②年龄为 22~35 岁。排除标准为: ①重要内脏器官功能障

碍患者; ②服用过内分泌药物患者; ③长期吸烟患者。

### 1.2 诊断标准

GDM 的诊断是根据 100 克口服葡萄糖耐量试验进行的<sup>[7]</sup>。方法为 100 g 葡萄糖溶解于 250 mL 水中, 五分钟内口服。口服前取空腹血, 口服后每 30 分钟取血, 共 4 次, 绘制血糖水平曲线。空腹血糖上限为 5.6 mmol/L, 一小时后血糖上限为 10.3 mmol/L, 两小时后血糖上限为 8.6 mmol/L, 有两项超过上限值得则判断为 GDM。

### 1.3 方法

测量志愿者的身高, 体重, 血压, 并空腹情况下抽取静脉血 5 mL 于取血管, 3 000 r/min 离心 5 min 留取血浆。采用酶标仪 (Thermo, Multiskan FC) 酶联免疫测定法测定血清 TNF- $\alpha$ 、脂联素、胰岛素。使用全自动生化仪 (Olympus, AU400) 测量空腹血清葡萄糖 (FBG), 总胆固醇 (TC), 甘油三酸酯 (TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)。根据制造商, 批内和批间变异系数 < 10%。低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 由 Friedewald 方程估算<sup>[8]</sup>; 计算出包括 TC/HDL-C 比, LDL-C/HDL-C 比和 TG/TC 比; 使用  $\log(TG/HDL-C)$  公式计算血浆的动脉粥样硬化指数 (AIP) 真胰岛素 (TINS)<sup>[9]</sup>。

### 1.4 评价指标和计算公式

使用胰岛素抵抗稳态模型评估 (HOMA-IR) 指数公式  $HOMA-IR = (FPG \times FINS) / 22.5$  计算胰岛素抵抗<sup>[10]</sup>。定量胰岛素敏感性检查指数 (QUICKI)  $QUICKI = 1 / [\log FINS (\mu U/mL) + \log FBG (mg/dL)]$  用于估计胰岛素敏感性<sup>[11]</sup>。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料用  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 组间差异比较采用  $t$  检验或非参数检验。Person 相关分析统计各项指标的关系,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本临床资料的比较

两组资料比较显示,胎龄、BMI、TG、TC、LDL-C比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );年龄、FBG、HDL-C、TG/TC、TC/HDL-C、LDL-C/HDL-C、AIP、胰岛素、HOMA-IR、QUICKI比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 妊娠糖尿病和正常孕妇的生化特征( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Biochemical characteristics of gestational diabetes mellitus (GDM) and normal pregnant women ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	NGT( $n=40$ )	GDM( $n=40$ )	$t$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	29.25±0.58	31.57±0.54	18.516	<0.001
胎龄(周)	26.15±0.24	26.23±0.22	1.554	>0.05
BMI( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	27.25±1.18	27.66±1.17	1.560	>0.05
FBG( $\text{mg}/\text{dL}$ )	78.45±1.29	100.83±1.54	70.458	<0.001
TG( $\text{mg}/\text{dL}$ )	221.83±74	256.12±69.12	2.142	>0.01
TC( $\text{mg}/\text{dL}$ )	242.67±30.18	225.84±39.88	2.128	>0.01
HDL-C( $\text{mg}/\text{dL}$ )	52.21±2.95	34.7±2.71	27.646	<0.001
LDL-C( $\text{mg}/\text{dL}$ )	146.1±27.84	139.92±20.11	1.138	>0.05
TG/TC	0.94±0.06	1.17±0.1	12.474	<0.001
TC/HDL-C	5.32±0.54	7.88±0.65	19.160	<0.001
LDL-C/HDL-C	3.23±0.36	5.17±0.58	17.974	<0.001
AIP	0.63±0.04	0.87±0.04	26.833	<0.001
胰岛素( $\mu\text{IU}/\text{mL}$ )	9.54±0.55	12.56±0.9	18.109	<0.001
HOMA-IR	1.85±0.11	3.11±0.22	32.398	<0.001
QUICKI	0.36±0.01	0.33±0.01	13.416	<0.001

### 2.2 NGT和GDM组OPG、TNF- $\alpha$ 和脂联素水平的比较

GDM组的TNF- $\alpha$ 表达水平高于NGT组。而OPG、脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$ 的比值显著低于NGT组。在NGT组中,HOMA-IR指数值与脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$ 比值呈负相关,与TNF- $\alpha$ 呈正相关。QUICKI与脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$ 比值呈正相关,与TNF- $\alpha$ 值、LDL-C/HDL-C的比值和TG/TC比值呈负相关。见表2。

表2 妊娠糖尿病和正常孕妇的OPG、TNF- $\alpha$ 和脂联素水平( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 OPG, TNF- $\alpha$  and adiponectin levels of gestational diabetes mellitus (GDM) and normal pregnant women ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	$n$	OPG	Adiponectin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\text{pg}/\text{mL}$ )	Adiponectin/TNF- $\alpha$ ratio
NGT	40	2224.76±881.47	6.37±0.59	115.68±12.64	4.80±0.07
GDM	40	1148.15±700.13	4.50±0.38	225.08±27.35	4.31±0.05
$t$ 值		6.049	16.853	22.964	36.026
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 OPG与临床指标的相关研究结果

回归分析表明,HOMA-IR指数与TNF- $\alpha$ 、TG、TG/TC比和AIP呈正相关;与脂联素/TNF- $\alpha$ 比值呈负相关。QUICKI的值与TNF- $\alpha$ 、TG、TG/TC比和AIP呈负相关;与脂联素/TNF- $\alpha$ 比值呈正相关。见表3。

表3 临床指标的相关性研究分析

Table 3 Research and analysis of the correlation of clinical indicators

项目	HOMA-IR		QUICKI	
	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值
TNF- $\alpha$	0.38	0.001	-0.38	0.001
TG	0.30	0.006	-0.31	0.006
TG/TC	0.35	0.001	-0.35	0.001
AIP	0.36	0.001	-0.36	0.006
Adiponectin/TNF- $\alpha$ ratio	-0.45	0.001	0.45	0.001

## 3 讨论

妊娠期糖尿病是围产期常见的并发症之一,其发病机制为随着孕期的进展,孕妇体内胰岛素样物水平升高引发胰岛素抵抗,导致体内代谢紊乱和炎症的发生。妊娠期糖尿病会影响胎儿的生长发育,提高不良妊娠发生的几率,提前检测发现妊娠期糖尿病可有效降低孕妇妊娠风险。

有研究显示血浆、胎盘组织、脂肪组织中OPG的表达在糖尿病组和正常组无显著差异<sup>[12]</sup>。而本研究发现GDM组OPG水平显著高于正常组。Akinci等发现有GDM病史同时伴有代谢综合征的患者OPG水平显著升高,其与BMI、空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR及C-反应蛋白呈正相关<sup>[13]</sup>。动物实验发现在小鼠体内重复注射OPG后体内循环的中单核细胞趋化蛋白-1和TNF- $\alpha$ 表达明显升高<sup>[14]</sup>。上述研究表明OPG与代谢、胰岛素抵抗及炎症反应密切相关。GDM是一种慢性炎症状态,炎症反应是胰岛素抵抗的触发因素,推测OPG可

能通过炎症反应机制参与 HOMA-IR 的发生。本研究相关分析结果表明血清 OPG 水平可能受年龄、机体糖代谢状态及胰岛素抵抗的影响。另一方面, GDM 患者 OPG 的升高可能加重胰岛素抵抗, 胰岛素分泌增加, 胰岛素敏感性下降, 进而导致血糖升高。Logistic 回归分析提示 OPG 水平升高会增加 GDM 的发生风险, 是其危险因素。

糖尿病引起的高脂血症导致高脂环境对  $\beta$  细胞有毒性。脂联素刺激脂肪细胞中的脂质存储, 这可能有助于降低  $\beta$  细胞的脂毒性<sup>[15]</sup>。与正常孕妇相比, GDM 孕妇血液循环中脂联素和 TNF- $\alpha$  的循环水平出现失衡, 并且它们与代谢综合征生物标记物相关。López-Tinoco<sup>[16]</sup> 的研究发现, 与正常妊娠相比, GDM 孕妇体内脂联素水平降低, TNF- $\alpha$  水平显著增加。在 Liu 等<sup>[17]</sup> 人的研究中, HOMA-IR 与脂联素呈负相关, 与 TNF- $\alpha$  呈正相关。Aye 等<sup>[18]</sup> 人进在妊娠肥胖小鼠模型中的研究发现, 使用合成的脂联素受体激动剂可能是增加母体和胎盘组织上功能性脂联素的有效干预措施, 以减少由于母体肥胖和 GDM 引起的代谢和激素并发症。

脂联素减弱了 TNF- $\alpha$  和 IL10 对胎盘系统的作用, 减少了胎盘系统的代谢活性, 导致向胎儿运输的氨基酸减少<sup>[19]</sup>。同时, 妊娠期糖尿病孕妇中脂联素/TNF- $\alpha$  的比例下降, 与胰岛素抵抗呈负相关。因此, 本研究中观察到的脂联素和脂联素/TNF- $\alpha$  比值与 FBG 和 TG 的负相关可以作为脂联素对 GDM 孕妇代谢综合征并发症的保护作用。

总之, 本研究发现妊娠期糖尿病患者存在 OPG、脂联素和 TNF- $\alpha$  的分泌失调。OPG 与脂联素/TNF- $\alpha$  的比值可能比单独使用脂联素和 TNF- $\alpha$  的信息更能预测孕妇胰岛素抵抗和代谢综合征的高风险。OPG 与脂联素/TNF- $\alpha$  比值可以作为潜在的妊娠期糖尿病危险因素, 对诊断或治疗监测目标有临床意义。

## 参考文献

[1] Shobeiri S, Abediankenari S, Lashtoo-Aghaee B, et al. Evaluation of soluble human leukocyte antigen-G in peripheral blood of pregnant women with gestational diabetes mellitus [Z]. 2016; 7, 178-182.

- [2] Brogin Moreli J, Cirino Ruocco A M, Vernini J M, et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics[Z]. 2012; 2012, 230742.
- [3] Yeral M I, Ozgu-Erdinc A S, Uygun D, et al. Prediction of gestational diabetes mellitus in the first trimester, comparison of fasting plasma glucose, two-step and one-step methods: a prospective randomized controlled trial[Z]. 2014; 46, 512-518.
- [4] 李茂香, 李玉, 吕媛媛, 等. 血清 Chemerin、25(OH)D<sub>3</sub>、visfatin 水平检测对妊娠期糖尿病的诊断价值及与患者胰岛素抵抗的关联性[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6): 503-507.
- [5] Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, et al. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus [Z]. 2012; 2012, 549748.
- [6] Xu J, Hong Z Y, Ping C Y, et al. Maternal Circulating Concentrations of Tumor Necrosis Factor-Alpha, Leptin, and Adiponectin in Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Sci World J, 2014; 1-12.
- [7] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J]. 中华围产医学杂志, 2014.
- [8] Anna L, Aleksandra R, Iwona B, et al. Serum Adiponectin and Leptin Concentrations in Relation to Body Fat Distribution, Hematological Indices and Lipid Profile in Humans[J]. Int J Environ Res Public Health, 12(9): 11528-11548.
- [9] Akbas E M, Timuroglu A, Ozcicek A, et al. Association of uric acid, Atherogenic index of plasma and albuminuria in di mel [J]. Int J Clin Exp mental Med, 2014, 7(12): 5737-5743.
- [10] Vafaieimaneh J, Bagherzadeh M, Heidari A, et al. Diabetic patients infected with helicobacter pylori have a higher Insulin Resistance Degree[J]. 2014, 5(3): 137-142.
- [11] Katz A, Nambi S S, Mather K, et al. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans [J]. J Clin Endocr Metab, 2000, 85(7): 2402-2410.
- [12] Telejko B, Kalejta K, Kuzmicki M, et al. The association of bone turnover markers with pro- and anti-inflammatory adipokines in patients with gestational diabetes [J]. Ann Agr Env Med, 2015, 22(2): 307-312.
- [13] Akinci B, Celtik A, Yuksel F, et al. Increased osteoprotegerin levels in women with previous gestational diabetes developing metabolic syndrome [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 91(1): 26-31.
- [14] Bernardi S, Fabris B, Thomas M, et al. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes [J]. Mol Cell Endocrinology, 2014, 394(1-2): 13-20.

## 类风湿关节炎并发医院感染因素及CRP、sCD14-ST预测价值

孟庆防\* 郭冬芳 党铮 刘喆

**[摘要]** 目的 研究类风湿关节炎并发医院感染危险因素及血浆C反应蛋白(CRP)联合可溶性CD14亚型(sCD14-ST)检测早期预测价值。方法 选取2016年12月至2019年3月于本院就诊的类风湿关节炎患者164例为研究对象,观察其相关资料,监测其血浆CRP和sCD14-ST水平变化;采用logistic分析类风湿关节炎并发医院感染危险因素;且绘制受试者工作特征曲线(ROC曲线),明确CRP和sCD14-ST对类风湿关节炎并发医院感染早期预测价值。结果 医院感染22例,感染率为13.41%。糖尿病、侵入性操作、置管、免疫抑制剂、住院时间分别与同组类型比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。T2、T3、T4时,并发医院感染者CRP和sCD14-ST水平呈先升高、后下降趋势,未并发医院感染者则呈持续下降趋势;且并发医院感染者CRP和sCD14-ST水平均高于未并发医院感染者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。多因素logistic回归分析证实糖尿病、侵入性操作、置管、免疫抑制剂、住院时间及血浆CRP和sCD14-ST是导致类风湿关节炎并发医院感染的危险因素( $P<0.05$ )。ROC曲线显示CRP、sCD14-ST及其联合检测AUC为0.712、0.804、0.918,敏感度71.02%、79.55%、87.22%,特异性72.27%、77.48%、85.96%。结论 类风湿关节炎并发医院感染危险因素多样,而加强具有上述因素人群筛查与早期检测血浆CRP、sCD14-ST水平变化,利于早发现、早干预,降低医院感染率。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 医院感染; 危险因素; C反应蛋白; 可溶性CD14亚型; 预测价值

### Nosocomial infection factors and prediction of CRP and sCD14-ST in patients with rheumatoid arthritis

MENG Qingfang\*, GUO Dongfang, DANG Zheng, LIU Zhe

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

**[ABSTRACT]** Objective To study the risk factors of rheumatoid arthritis complicated with nosocomial infection and the early predictive value of plasma C-reactive protein (CRP) combined with soluble CD14 subtype (sCD14-ST). Methods A total of 164 patients with rheumatoid arthritis who were admitted to the hospital from December 2016 to March 2019 were enrolled in the study. The relevant data were observed to monitor the changes of plasma CRP and sCD14-ST levels. Logistic analysis of rheumatoid joints was used. The risk factors for nosocomial infection were complicated by inflammation; and the receiver operating characteristic curve (ROC curve) was drawn to determine the early predictive value of CRP and sCD14-ST for rheumatoid arthritis complicated with nosocomial infection. Results There were 22 cases of nosocomial infection, and the infection rate was 13.41%. Diabetes, invasive procedure, catheterization, immunosuppressive agents, and hospitalization time were compared with the same group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). At T2, T3 and T4, the levels of CRP and sCD14-ST in patients with nosocomial infections in-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201816216)

作者单位:驻马店市中心医院风湿免疫科,河南,驻马店 463000

\*通信作者:孟庆防, E-mail: mengfak@163.com

creased first and then decreased, while those without nosocomial infections continued to decline. The levels of CRP and sCD14-ST in patients with nosocomial infections were higher than those without nosocomial infections ( $P<0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis confirmed that diabetes mellitus, invasive operation, catheterization, immunosuppressive agents, hospitalization time and plasma CRP and sCD14-ST were risk factors for nosocomial infection in rheumatoid arthritis ( $P<0.05$ ). ROC curve showed that CRP, sCD14-ST and their combined detection AUC were 0.712, 0.804, 0.918 respectively; sensitivity were 71.02%, 79.55%, 87.22% respectively; specificity were 72.27%, 77.48%, 85.96% respectively. **Conclusion** There are various risk factors for rheumatoid arthritis complicated with nosocomial infection. Strengthening screening of plasma CRP and sCD14-ST levels are helpful for early detection, early intervention and reduction of nosocomial infection rate.

[KEY WORDS] Rheumatoid arthritis; Nosocomial infection; Risk factors; C-reactive protein; Soluble CD14 subtype; Predictive value

类风湿关节炎作为风湿性疾病的常见类型之一,以关节进行性破坏和高致残率为主要特征,不仅影响关节功能,同时还可侵袭血管、肺脏和神经等机体组织器官,致患者身体机能不断下降<sup>[1-2]</sup>。免疫抑制剂和糖皮质激素虽能有效控制病情进展,但长期使用能对机体内环境及代谢造成不同程度影响,致细胞免疫和体液免疫功能持续下降,造成医院感染率显著升高<sup>[3-4]</sup>,最终影响手术治疗结局,甚至使患者临床死亡率增加(1.3~2)倍<sup>[5]</sup>。据流行病学调查显示目前类风湿关节炎并发医院感染率已愈 30.98%,其中多部位感染率高达 10.76%<sup>[6-7]</sup>,明显超过其他内科医院感染平均水平(9.27%~10.31%)<sup>[8]</sup>,成为临床亟待解决的问题。抗菌药物虽能有效控制感染,但增加了患者经济负担及耐药菌株产生机率,不符合当前事后干预向事前防控转变的医疗模式理念。过知网等数据库检索发现,有关类风湿关节炎并发医院感染危险因素研究涉及不足,尤其关于本地区报道寥寥无几,或仅为单因素统计<sup>[9-10]</sup>;而相关监测指标多种多样且并无明确的“金标准”,不利于类风湿关节炎并发医院感染的全面早期防控。本研究通过分析本地区类风湿关节炎并发医院感染危险因素,同时选取 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)联合可溶性 CD14 亚型(Soluble CD14 subtype, sCD14-ST)指标对患者医院感染进行预测,为降低类风湿关节炎并发医院感染提供新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 12 月至 2019 年 3 月于本院就诊的类风湿关节炎患者 164 例为研究对象,男 55 例、

女 109 例,年龄 22~85 岁,病程 3~24 个月,类风湿关节炎活动指数 1.3~6.0,合并基础疾病:糖尿病 14 例、高血压 19 例、高脂血症 8 例,非甾体抗炎药使用 142 例、糖皮质激素使用 89 例、免疫抑制剂使用 53 例,住院时间 7~38 d。

纳入标准:①符合类风湿关节炎诊断标准<sup>[11]</sup>且初次入院接受治疗。②具备一定理解力、沟通能力。③病历资料完整且依从性强,能坚持完成本研究。④所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:①合并心肺肝肾功能严重异常和免疫缺陷性疾病、恶性肿瘤。②其他类型风湿免疫性疾病。③入组前合并感染性疾病。研究获医院伦理委员会批准。

### 1.2 研究方法

采用回顾性研究方法观察类风湿关节炎患者相关资料,监测其血浆 CRP 和 sCD14-ST 水平变化,采用 logistic 重点分析类风湿关节炎并发医院感染危险因素;且绘制受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic curve, ROC 曲线),明确 CRP 和 sCD14-ST 对类风湿关节炎并发医院感染的早期预测价值。

标本采集与来源:分别于手术前(T0)、手术结束(T1)、术后疑似感染时(T2)、感染 24 h(T3)和感染控制时(T4),抽取患者外周静脉血 4~5 mL,置于含有 10%的乙二胺四乙酸二钾的采集管(上海西宝生物科技有限公司),采用高速离心机(上海测维光电技术有限公司,型号 TGL-20MS 型)以 3 000 转/min 速度离心 10~15 min,获取血浆即刻送检。CRP 水平检测:采用 Siemens BN II 系统(德国西门子公司);sCD14-ST 水平检测:采用 PATH-FAST 系统(日本三菱化工公司),均利用酶联免疫

双抗体吸附法测定,试剂盒由北京康思润业生物技术有限公司提供。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析。计量资料用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用 LSD-*t* 检验;计数资料用 *n* (%)表示,采用  $\chi^2$  检验比较。将差异具有统计学意义的单因素纳入多因素 logistic 回归模型。且绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)。比较 CRP 和 sCD14-ST 指标曲线下面积(Area under the curve, AUC),计算其灵敏度、特异性;AUC<0.50 说明指标无早期预测价值,AUC=1.0 为最理想指标。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 类风湿关节炎患者医院感染率及部位分布

医院感染 22 例,感染率为 13.41%。22 例医院感染患者,以呼吸道感染 12(54.55%)为主,其余依次为泌尿道感染 7(31.82%)和皮肤感染 2(9.09%),其他感染 1(4.55%)。

### 2.2 类风湿关节炎患者并发医院感染临床危险因素

结果显示糖尿病、侵入性操作、置管、免疫抑制剂、住院时间分别与同组类型比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 类风湿关节炎患者并发医院感染临床危险因素分析 [*n*(%)]

Table 1 Clinical risk factors of nosocomial infection in patients with rheumatoid arthritis [*n*(%)]

相关因素	例数	感染	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	
性别	男	55	7(12.73)	0.459	0.753
	女	109	15(13.76)		
年龄	≥65岁	113	16(14.16)	2.845	0.118
	<65岁	51	6(11.76)		
合并基础疾病	糖尿病	14	3(21.43)	4.316	0.035
	高血压	19	1(5.26)		
	高脂血症	8	1(12.50)		
侵入性操作	是	54	12(22.22)	4.975	0.029
	否	110	10(9.09)		
置管	是	68	12(17.65)	4.016	0.040
	否	96	10(10.42)		
药物使用史	非甾体抗炎药	142	5(3.52)	5.418	0.021
	糖皮质激素	89	9(10.11)		
	免疫抑制剂	53	8(15.09)		
住院时间	≥28 d	91	15(16.48)	4.592	0.032
	<28 d	73	7(9.59)		

### 2.3 类风湿关节炎患者并发医院感染实验室指标因素

T0、T1 时,两组患者 CRP 和 sCD14-ST 指标水平比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);T2、T3、T4 时,并发医院感染者 CRP 和 sCD14-ST 水平呈先升高、后下降趋势,未并发医院感染者则呈持续下降趋势;且 T2、T3、T4 时,并发医院感染者 CRP 和 sCD14-ST 水平均高于未并发医院感染者,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 2 类风湿关节炎患者并发医院感染实验室指标因素分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Analysis of Laboratory Indicators of Nosocomial Infection in Patients with Rheumatoid Arthritis ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	并发医院感染者 ( <i>n</i> =22)	未并发医院感染者 ( <i>n</i> =142)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	
CRP (mg/L)	T0	16.50±10.00	16.10±9.78	0.464	0.712
	T1	25.20±12.00	24.68±12.47	1.014	0.421
	T2	43.20±18.10	20.10±11.20	4.117	0.038
	T3	65.00±24.30	18.30±9.84	4.598	0.031
	T4	18.40±11.30	15.20±10.00	3.159	0.048
	<i>F</i> 值	4.293	4.008		
<i>P</i> 值	0.036	0.041			
sCD14-ST (pg/mL)	T0	178.50±28.40	175.20±25.00	0.925	0.512
	T1	251.00±38.40	249.00±36.50	1.006	0.500
	T2	978.60±176.80	230.00±31.70	4.994	0.027
	T3	1430.00±216.50	197.80±30.00	5.513	0.020
	T4	517.20±84.60	185.20±27.40	4.672	0.030
	<i>F</i> 值	4.842	4.327		
<i>P</i> 值	0.030	0.034			

### 2.4 类风湿关节炎并发医院感染影响因素 logistic 回归分析

结果显示糖尿病、侵入性操作、置管、免疫抑制剂、住院时间及血浆 CRP 和 sCD14-ST 是导致类风湿关节炎并发医院感染的危险因素(*P*<0.05),见表 3。

### 2.5 血浆 CRP 和 sCD14-ST 水平早期预测类风湿关节炎并发医院感染 ROC 曲线分析

CRP、sCD14-ST 及其联合检测中,以二者联合检测 AUC 最大且敏感度、特异性最高,其余依次为 sCD14-ST、CRP,见表 4。

## 3 讨论

研究结果显示本地区类风湿关节炎并发医院

表3 类风湿关节炎并发医院感染影响因素 logistic 回归分析

Table 3 Logistic regression analysis of factors affecting nosocomial infection in rheumatoid arthritis

自变量	$\beta$ 值	S.E值	P值	OR值	95%CI
糖尿病	1.460	0.577	0.024	4.307	2.714~12.730
侵入性操作	1.329	0.601	0.029	3.836	2.240~11.680
置管	1.851	0.632	0.018	4.338	2.812~16.005
免疫抑制剂	2.280	0.730	0.016	4.672	3.141~18.658
住院时间	1.785	0.687	0.022	3.654	2.021~9.747
CRP	1.761	0.639	0.023	3.638	2.056~10.582
sCD14-ST	1.383	0.625	0.026	4.548	3.087~17.152

表4 血浆CRP和sCD14-ST水平早期预测类风湿关节炎并发医院感染ROC曲线分析

Table 4 Plasma CRP and sCD14-ST levels for early prediction of rheumatoid arthritis complicated with nosocomial infection ROC curve analysis

指标	截断值	AUC	敏感度 (%)	特异性 (%)
CRP	25.10 mg/L	0.712	71.02	72.27
sCD14-ST	801.80 pg/mL	0.804	79.55	77.48
CRO联合sCD14-ST	-	0.918	87.22	85.96

感染率为13.41%，略低于部分文献30.98%报道率<sup>[12]</sup>，可能与本地区对医院感染重视度、完善的防控流程和定期培训学习等因素有关；同时感染部位与其他文献报道一致。多因素 logistic 回归模型结果显示糖尿病、侵入性操作、置管、免疫抑制剂、住院时间及血浆CRP和sCD14-ST作为类风湿关节炎并发医院感染危险因素，其原因不外乎以下：如①血糖水平升高可削弱巨噬细胞、单核细胞等细胞的趋化、黏附能力及对病原菌的杀伤、吞噬功能；同时高水平状态的血糖环境可致局部组织缺血缺氧，不利于组织黏膜修复，为病原菌生长与繁殖提供了培养基<sup>[13]</sup>。②侵入性操作不当可损害患者管道黏膜组织完整性，致黏膜防御屏障受损而将其内部组织结构暴露于外部环境，为病原菌微生物的黏附与定植创造了外部条件。③置管作为一种异物，可致机体内部与外界相通，增加了病原菌侵入机率<sup>[14]</sup>。④甲氨蝶呤、来氟米特等作为抗代谢类免疫抑制剂能促使活性T细胞凋亡、抑制B细胞产生IgG和IgM<sup>[15]</sup>，环磷酰胺则能对初次、再次免疫应答反应起到抑制作用<sup>[16]</sup>，雷公藤同样能对机体细胞免疫和体液免疫造成抑制<sup>[17]</sup>，因此无

论何种免疫抑制剂均能通过不同途径、不同方法导致患者免疫功能下降，削弱细胞抗原反应性，利于促发感染或使体内条件致病菌转化、移位、扩散。⑤类风湿关节炎患者受到长期使用免疫抑制剂和糖皮质激素影响，其本身抵抗力下降显著，所以对外界病原菌感受力处于高水平状态；而住院病房是病原菌聚集场所，因此类风湿关节炎患者易成为高危对象。⑥类风湿关节炎患者受到风湿因子等作用机制影响，CRP水平可呈现升高态势；且随着该指标水平持续升高，能进一步激活补体，促进白介素等大量致炎因子释放，启动和扩大“瀑布样”炎症级联反应<sup>[18]</sup>。另外，受到类风湿关节炎自身免疫机制影响，sCD14-ST可出现不同程度升高<sup>[19]</sup>；sCD14-ST结构中含有脂多糖受体，该受体能与病原菌释放的内毒素相结合，结合越多，越易加速细胞炎性信号传导，加剧炎症反应，最终诱发机体感染<sup>[20]</sup>。因此二者水平状态与类风湿关节炎并发医院感染密切相关。ROC曲线表明CRP、sCD14-ST联合检测优势最为显著，可能与sCD14-ST检测弥补了CRP特异性不足之弊端有关。

总之，类风湿关节炎并发医院感染危险因素多样，而加强具有上述因素人群筛查与早期检测血浆CRP、sCD14-ST水平变化，利于早发现、早干预，降低医院感染率。

## 参考文献

- [1] M.M.A. Verhoeven, P.M.J. Welsing, J.W. J. Bijlsma, et al. Effectiveness of Remission Induction Strategies for Early Rheumatoid Arthritis: a Systematic Literature Review [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2019, 21(6):1-10.
- [2] YU Y, YANG Y, BIAN Y, et al. Hydrogen gas protects against intestinal injury in wild type but not NRF2 knockout mice with severe sepsis by regulating HO-1 and HMGB1 release[J]. *Shock*, 2017, 48(3):364-370.
- [3] Josef SS, Ferdinand CB, Gerd RB, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(1):3-15.
- [4] Patel N, Gwam C U, Khlopas A, et al. Outcomes of Cementless Total Knee Arthroplasty in Patients With Rheumatoid Arthritis [J]. *Orthopedics*, 2018, 41(2):103-106.
- [5] BRODSKA H, VALENTA J, PELINKOVA K, et al. Diagnostic and prognostic value of presepsin vs. established biomarkers in critically ill patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(4):658-668.

- [6] KRAJEWSK A-WIODARCZYK M, STOMPOR T. Osteoporosis and vascular calcification in rheumatoid arthritis-the role of osteoprotegerin and sclerostin [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2017, 43(253):41-47.
- [7] Pagliarulo V, Alba S, Gallone MF, et al. Diagnostic Accuracy of Hexaminolevulinate in a Cohort of Patients Undergoing Radical Cystectomy[J]. *J Endourol*, 2017, 31(4):405-411.
- [8] BORTOLUZZI A, FURINI F, GENERALI E, et al. One year in review 2018: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(3):347-361.
- [9] Nazem K, Motififard M, Yousefian M. Variations in ESR and CRP in total knee arthroplasty and total hip arthroplasty in Iranian patients from 2009 to 2011[J]. *Adv Biomed Rese*, 2016, 30(5):148-153.
- [10] 徐艳,于哲,臧银善. 类风湿关节炎并发感染的特点及危险因素分析[J]. *当代医学*, 2018, 24(30):61-64.
- [11] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎. *实用骨科学*[M]. 第4版. 北京:人民军医出版社, 2012:693-696.
- [12] 张彦,俞娉,李利,等. 风湿免疫性疾病患者医院感染易感因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(15):2276-2278.
- [13] KIM SJ, PARK JS, LEE DW, et al. Trichostatin a protects liver against septic injury through inhibiting Toll-like receptor signaling[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(4):387-394.
- [14] 贾丁丁,乔永杰,张洪,等. ESR和CRP对晚期类风湿关节炎TKA手术风险评估的意义[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2017, 32(1):107-109.
- [15] MARTÍNEZ-FEITO A, PLASENCIA-RODRÍGUEZ C, NAVARRO-COMPÁN V, et al. The effect of methotrexate versus other disease-modifying anti-rheumatic drugs on serum drug levels and clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors[J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(3):949-954.
- [16] Glant T T, Timea O, Adrienn M, et al. Characterization and Localization of Citrullinated Proteoglycan Aggrecan in Human Articular Cartilage: [J]. *Plos One*, 2016, 11(3):1-16.
- [17] 陈芍,梁朝洋,张杰,等. 雷公藤多甙片与甲氨喋呤联合治疗类风湿关节炎的临床疗效及对炎症因子的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(4):713-716.
- [18] 吴玉芹,奎莉越,赵晓芬,等. C-反应蛋白、血清淀粉酶A蛋白及中性粒细胞表面抗原CD64对新生儿感染性疾病的早期诊断价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(5):327-331.
- [19] JÄMSÄ J, ALA-KOKKO T, HUOTARI V, et al. Neutrophil CD64, C-reactive p rotein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU-Post-test p robabilities [J]. *J Crit Care*, 2017, 43(43):139-142.
- [20] Nur Efe İris, Taner Yıldırım, Habip Gedik, et al. Could Neutrophil CD64 Expression Be Used as a Diagnostic Parameter of Bacteremia in Patients with Febrile Neutropenia? [J]. *Turk J Hematol*, 2017, 34(2):167-173.

(上接第440页)

- [11] 孔庆鑫,沈林海,徐虹,等. 虚拟实验室技术评价 *recA* 标准序列比对法对洋葱伯克霍尔德菌复合体种别鉴定效果[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(18):3025-3028, 3034.
- [12] 余萌,王似锦,戴翠,等. *recA* 基因及核糖体分型技术在洋葱伯克霍尔德菌复合体鉴别与溯源分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1521-1526.
- [13] 冯震,杨燕,张宁,等. 基于 *gyrB* 基因的伯克霍尔德菌属核酸测序鉴定与系统进化分析[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(11):1940-1944.
- [14] Papaleo MC, Perrin E, Maida I, et al. Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the *hisA* gene[J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 10):1163-1170.
- [15] 孙谦,屈青云,胡燕燕,等. 比较MALDI-TOF MS直接涂片法与蛋白提取法鉴定洋葱伯克霍尔德菌群的应用研究[J]. *实用预防医学*, 2015, 22(11):1387-1389.
- [16] Furlan JPR, Pitondo-Silva A, Braz VS, et al. Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2019, 35(3):39.
- [17] Lambiasi A, Del Pezzo M, Cerbone D, et al. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 92(2):145-149.
- [18] Zakharaova I, Teteryatnikova N, Toporkov A, et al. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex [J]. *Acta Trop*, 2017, 174:1-8.
- [19] 傅琼瑶,陈春羽,邬娇,等. 一种快速定量检测类鼻疽伯克霍尔德菌的方法建立及评价[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(17):1734-1738.
- [20] Jimenez L, Jashari T, Vasquez J, et al. Real-Time PCR Detection of *Burkholderia cepacia* in Pharmaceutical Products Contaminated with Low Levels of Bacterial Contamination [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2018, 72(1):73-80.
- [21] Wright C, Herbert G, Pilkington R, et al. Real-time PCR method for the quantification of *Burkholderia cepacia* complex attached to lung epithelial cells and inhibition of that attachment [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(5):500-506.

· 论 著 ·

# 17 $\beta$ -雌二醇对 rBMSCs 肝祖细胞定向分化及 Wnt 信号通路的调控作用

曾令锋<sup>1</sup> 黄俊宇<sup>2</sup> 熊瑶<sup>4</sup> 张志东<sup>1</sup> 王景浩<sup>1</sup> 黄硕<sup>3\*</sup> 韦宏成<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 目的 探究 17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>)对大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)肝祖细胞定向分化能力及 Wnt 信号通路的调控作用。方法 通过全骨髓贴壁法获得稳定的 rBMSCs,将 rBMSCs 分为  $\alpha$ -MEM 培养基(Control)、肝向诱导培养基(经典)、17 $\beta$ -E<sub>2</sub>+ $\alpha$ -MEM 培养基(E<sub>2</sub>)、17 $\beta$ -E<sub>2</sub>+肝向诱导培养基(经典+E<sub>2</sub>)组,共 4 组,显微镜下观察形态学变化,发光免疫法检测细胞裂解液 AFP 含量,运用 Western bolt 法检测 Wnt $\beta$ -catenin 信号蛋白(Wnt3a、 $\beta$ -catenin 及 LRP-5)表达。结果 在形态学上,经典与经典+E<sub>2</sub>组的 rBMSCs 逐渐呈肝祖细胞样变化,而 Control 组和 E<sub>2</sub>组无明显改变。经典组、经典+E<sub>2</sub>组 AFP 值显著高于 Control 组、E<sub>2</sub>组( $P < 0.05$ );经典+E<sub>2</sub>组 AFP 值显著高于经典组( $P < 0.05$ )。与 Control 组及 E<sub>2</sub>组相比,经典组与经典+E<sub>2</sub>组  $\beta$ -Catenin、Wnt3a 表达量显著降低( $P < 0.05$ ),且经典+E<sub>2</sub>组  $\beta$ -Catenin、Wnt3a 表达量显著低于经典组( $P < 0.05$ );而 LRP-5 的表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>可促 rBMSCs 肝祖细胞定向分化,其机制可能与调控 Wnt $\beta$ -catenin 信号通路相关。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 17 $\beta$ -雌二醇; Wnt 信号通路; 肝祖细胞定向分化

## Regulation of 17 $\beta$ -estradiol on the differentiation of hepatic progenitor cells and Wnt signaling pathway in rBMSCs

ZENG Lingfeng<sup>1</sup>, HUANG Junyu<sup>2</sup>, XIONG Yao<sup>4</sup>, ZHANG Zhidong<sup>1</sup>, WANG Jinghao<sup>1</sup>, HUANG Shuo<sup>3\*</sup>, WEI Hongcheng<sup>2\*</sup>

(1. Department of pharmacy, The first affiliated hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630; 2. Department of gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong, China, 510630; 3. Departments of Radiology, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China, 430030; 4. The fifth affiliated hospital, Guangzhou medical university, Guangzhou, Guangdong, China, 510700)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the regulatory effect of 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) on the differentiation of hepatic progenitor cells of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) and Wnt signaling pathway. Methods rBMSCs were obtained by whole bone marrow adherence method. The cells were divided into four groups:  $\alpha$ -MEM medium (control), liver-inducing medium (classical), and E<sub>2</sub>+ $\alpha$ -MEM medium (E<sub>2</sub>), E<sub>2</sub>+hepatic inducing medium (classical+E<sub>2</sub>), observed in morphology. The AFP concentration was measured using the luminescence immunoassay. The expression of Wnt signaling proteins, included Wnt3a,  $\beta$ -

基金项目:中央高校青年基金项目(11619347)

作者单位:1. 暨南大学附属第一医院药理学部,广东,广州 510630

2. 暨南大学附属第一医院消化科人工肝,广东,广州 510630

3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科,湖北,武汉 430030

4. 广州医科大学附属第五医院,广东,广州 510700

\*通信作者:黄硕, E-mail:33831827@qq.com; 韦宏成, E-mail:twchc@jnu.edu.cn

注:曾令锋与黄俊宇为共同第一作者

catenin and LRP-5, was detected by Western blot. **Results** Morphologically, rBMSCs in the classic and classic + E2 groups gradually showed liver progenitor-like changes, while the control group and E2 group showed no significant changes. The AFP concentration of classic group and classic + E2 group was significantly higher than that of the control group and E2 group ( $P < 0.05$ ). The AFP value of classic + E2 group was significantly higher than that of the classic group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group and the E2 group, the expression levels of  $\beta$ -Catenin and Wnt3a in the classic group and the classic + E2 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of  $\beta$ -Catenin and Wnt3a in the classic + E2 group were significantly lower than that in the classic group ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in the expression of LRP-5 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** 17 $\beta$ -E2 can promote the differentiation of rBMSCs hepatic progenitor cells, and the mechanism may be related to the regulation of Wnt $\beta$ -catenin signaling pathway.

[KEY WORDS] Bone mesenchymal stem cells; 17 $\beta$ -estradiol; Wnt signaling pathway; Differentiation of hepatic progenitor cells

人工肝支持系统 (artificial liver support system, ALSS) 作为替代肝脏功能的治疗方法, 可暂时延缓或维持晚期肝脏疾病患者的生命, 包括非生物型、生物型以及混合型。研究表明, 生物型人工肝通过稳定的体外培养肝细胞生物反应器, 发挥肝细胞多种功能, 能明显降低病死率, 是未来人工肝发展的方向<sup>[1-2]</sup>。因此, 如何在体外获得稳定的肝细胞源, 是人工肝技术发展的关键。骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 可直接分化成肝细胞, 降解细胞外基质蛋白, 减少细胞外基质沉积, 并刺激肝细胞功能的修复和免疫调节等方式, 从而改善肝功能, 减缓肝硬化进程。另外, 研究表明<sup>[3-6]</sup>, 雌激素对肝硬化具有保护作用。目前, BMSCs 肝向分化的机制和雌激素是否影响大鼠骨髓间充质干细胞 (rat Bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs) 肝向分化均尚不清楚。本研究通过体外诱导 rBMSCs 定向分化成肝祖细胞, 探讨 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) 对 rBMSCs 肝祖细胞向分化的影响及其潜在作用机制, 验证 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 是否通过调控 Wnt 信号通路影响 rBMSCs 肝祖细胞向分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

rBMSCs 由暨南大学肿瘤研究所捐赠。

### 1.2 主要试剂与仪器

$\alpha$ -MEM 培养基 (美国 HyClone); 成骨诱导完全培养基、成脂诱导完全培养基、D-Hanks 平衡盐缓冲液 (广州 PanEra); 优级胎牛血清 (天津灏洋); 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco); 17 $\beta$ -雌二醇 (西安嘉博盈); CCK-8 试剂盒 (北京 Dojindo); CD29 抗

体、CD45 抗体、CD80 抗体、CD90 抗体 (美国 Biolegend); Tris-HCL (pH 8.3) (北京索莱宝);  $\beta$ -Catenin 蛋白抗体、Wnt3a 蛋白抗体、LRP-5 蛋白抗体、GAPDH 蛋白抗体、WB 一抗稀释液 (美国 CST)。单人双面净化工作台 (上海一恒 SW-CJ-IF)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo Scientific 3111 型)、低速/高速离心机 (德国 eppendorf Centrifuge 5702)、倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS CK40)、酶标仪 (美国 Bio-Rad 680 型)、流式细胞仪 (美国 BD FACSAria 型)。微量核酸蛋白定量仪 (上海 Boyue ScanDrop 100)、转膜仪 (北京赛百奥 17-4070)、凝胶成像系统 (上海天能 Tanon-1600)、水平电泳槽 (上海天能 HE-120)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养与细胞增殖

取 P<sub>3</sub>-P<sub>5</sub> 代的 rBMSCs, 培养于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 条件: 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度培养箱中培养, 每 3 d 换液, 待细胞铺满整个培养瓶, 以 1:2 比例进行传代。细胞分为 4 组:  $\alpha$ -MEM 完全培养基 (Control) 组、15% FBS 成肝诱导完全培养基 (经典) 组、(10<sup>-6</sup> mol/L) 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> +  $\alpha$ -MEM 完全培养基 (E<sub>2</sub>) 组、(10<sup>-6</sup> mol/L) 17 $\beta$ -E<sub>2</sub> + 成肝诱导完全培养基 (经典+E<sub>2</sub>) 组。

取 P<sub>3</sub>-P<sub>5</sub> 代的 rBMSCs, 弃去培养基, 用 D-Hanks 液清洗 2 次及胰酶消化制成单细胞悬液。96 孔板中每孔接种 2 000 个细胞, 设置 6 个复孔, 共 6 行 10 列, 每孔加入 200  $\mu$ L 完全培养基, 放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养; 隔日起, 每日取 1 列 6 孔进行 CCK-8 细胞活性检测, 每孔 100  $\mu$ L 培养基加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 并置于培养箱中孵育 2.5 h 后, 置于酶标仪下, 调零后测量在 450 nm 处的吸光度

(OD值)。以时间(天)为横坐标,OD值为纵坐标绘制*rBMSCs*生长曲线。

### 1.3.2 细胞流式

制成单细胞悬液。2 000 rpm离心6 min,去上清,用D-Hanks液重悬细胞,重复3次,取300 μL单细胞悬液于1.5 mL离心管中,再加入700 μL无水乙醇,充分混匀,用封口膜封闭,4℃过夜。D-Hanks液洗涤2次,取500 μL重悬细胞,1 600 rpm离心10 min,弃上清,加入200 μL PI染液,混匀,室温避光孵育15 min,过滤,用流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.3.3 *rBMSCs* 表面标志物测定

制成单细胞悬液并调整密度为 $1 \times 10^6$  cells/mL;按操作说明分别加入CD29、CD45、CD80、CD90,37℃下孵育30 min;使用流式细胞仪测定;

### 1.3.4 *rBMSCs* 骨向及脂向分化能力鉴定

按1.4.1操作培养细胞,待细胞融合60%左右分别加入成骨诱导培养基、成脂诱导培养基,待细胞长满后,弃去培养瓶中培养基,用D-Hanks液清洗3次,分别加入95%乙醇固定10 min,用蒸馏水漂洗3次,分别加入0.1% Tris-HCL-茜素红染液、饱和油红O染液37℃孵育45 min、60 min,用蒸馏水漂洗多余Tris-HCL-茜素红染液,60%异丙醇漂洗多油红O染液,置于显微镜下观察并拍照。

### 1.3.5 *rBMSCs* AFP的测定

按1.4.1及1.4.2操作培养细胞,第3、6、10天对4组细胞重悬并进行裂解,取300 μL置于化学发光免疫分析仪上测定各组AFP值。

### 1.3.6 Wnt信号通路的调控作用

按1.4.1及1.4.2操作培养细胞,制成单细胞悬液,离心后加入细胞裂解液,置于冰上;提取总蛋白,微量核酸蛋白定量仪测定总蛋白浓度,以1:4比例加入蛋白上样缓冲液,充分混匀,99℃水浴加热10 min,冷却至室温,灌胶、电泳,转膜,一抗(β-Catenin、Wnt3a、LRP-5)4℃孵育过夜,二抗37℃孵育2 h,显影。

### 1.3.7 统计学方法

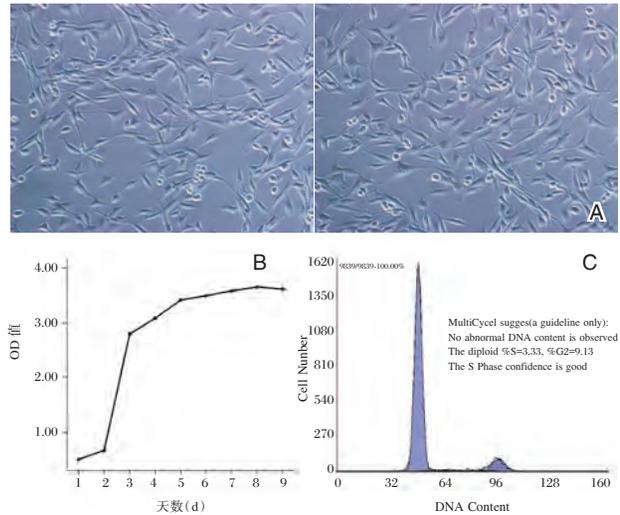
采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的差异比较采用单因素方差分析,两组间的差异比较采用Bonferroni检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *rBMSCs* 的鉴定

镜下见*rBMSCs*呈贴壁生长,细胞呈放射状、

梭形或平行排列。且细胞形态随传代次数的增多而表现的越均一。见图1A。*rBMSCs*呈倒“S”形增长,从第2 d开始快速增长,第8 d到达顶峰,随后逐渐进入平台期,增长较为缓慢。见图1B。*rBMSCs* G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞为87.5%,G<sub>2</sub>+S/M期细胞为12.5%,表明大部分*rBMSCs*处于静息期,只有少部分细胞处于增殖期,符合干细胞生物学特性。见图1C。



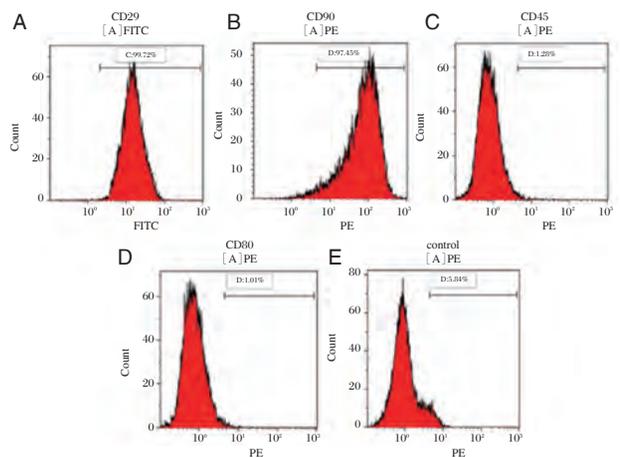
注:A:P<sub>3</sub>代及P<sub>4</sub>代*rBMSCs*接种3d;B:P<sub>3</sub>代*rBMSCs*生长曲线;C:P<sub>3</sub>代*rBMSCs*细胞周期。

图1 *rBMSCs*的鉴定

Figure 1 Identification of *rBMSCs*

### 2.4 *rBMSCs* 表面标志物的鉴定

结果显示*rBMSCs*表达CD29、CD90的阳性率为99.72%、97.45%;而CD45、CD80的阳性率为1.28%、1.01%,符合干细胞生物学特性。见图2。



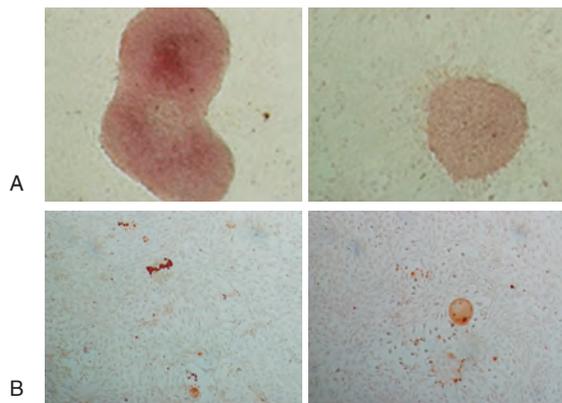
注:A、B、C、D分别为培养获得的*rBMSCs* CD29、CD90、CD45、CD80阳性表达率,E为空白对照组。

图2 P<sub>4</sub>代*rBMSCs*表面标志物的鉴定

Figure 2 Identification of surface markers of P<sub>4</sub>

### 2.5 rBMSCs 骨向及脂向分化能力鉴定

成骨诱导第 14 天后,对 rBMSCs 进行茜素红染色,镜下可见矿化结节中沉积的钙盐被染成红褐色,而周围细胞未着色。见图 3A。对 rBMSCs 进行油红 O 染色,镜下可见脂肪细胞因脂质累及被染成红色。见图 3B。



注:A:P<sub>4</sub>代 rBMSCs 成骨诱导后茜素红染色; B: P<sub>4</sub>代 rBMSCs 脂诱导后油红 O 染色。

图 3 rBMSCs 的骨向及脂向分化能力鉴定 (×100)

Figure 3 Identification of differentiation potency of rBMSCs from P<sub>4</sub> generation (×100)

### 2.7 rBMSCs 向肝祖细胞定向诱导后形态学变化

第 3 天,经典组与经典+E<sub>2</sub>组的 rBMSCs 由长梭形逐渐呈多边形、类圆形改变,细胞增殖速度减缓,核浆比例变小,贴壁能力逐渐减弱,至第 10 天,大多数细胞失去原有形态,呈三角形或肝板样排列,与肝祖细胞形态相似。而 Control 组和 E<sub>2</sub>组无明显形态学改变,基本呈均匀的长梭形。见图 4。

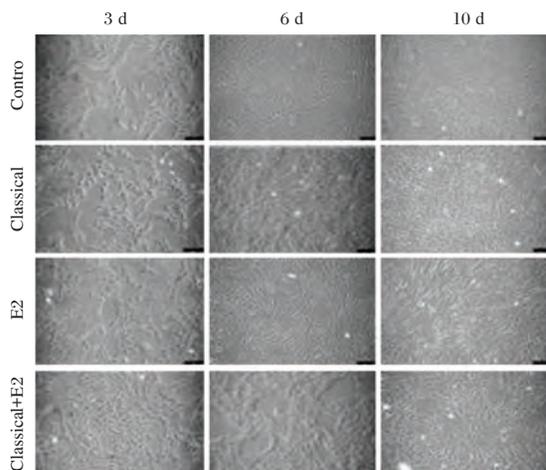
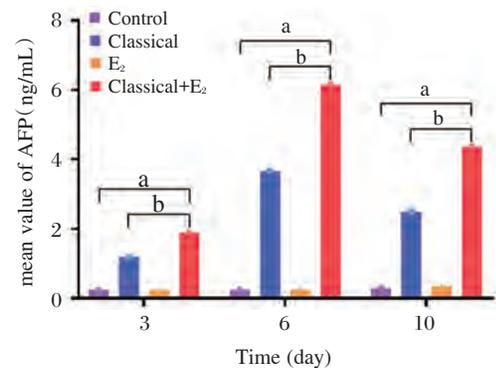


图 4 各组 rBMSCs 定向诱导 3、6、10 d 后细胞形态 (×100)

Figure 4 Cell morphology after 3, 6 and 10 days of rBMSCs induction in each group (×100)

### 2.8 各组 rBMSCs AFP 值的测定

Bonferroni 检验结果,不同组间 AFP 值均数显著不同 ( $F=8.948, P=0.012$ ),差异有统计学意义,而不同天数间 AFP 值均数无明显改变 ( $P>0.05$ ),差异无统计学意义。经典组、经典+E<sub>2</sub>组的 AFP 值显著增高于 Control、E<sub>2</sub>组 ( $P<0.05$ ),且经典+E<sub>2</sub>组 AFP 值显著高于经典组 ( $P<0.05$ ),而 Control、E<sub>2</sub>组 AFP 值均为 0 ng/mL。见图 5。



注:与 Control 组相比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与经典组相比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 5 各组 rBMSCs AFP 均值

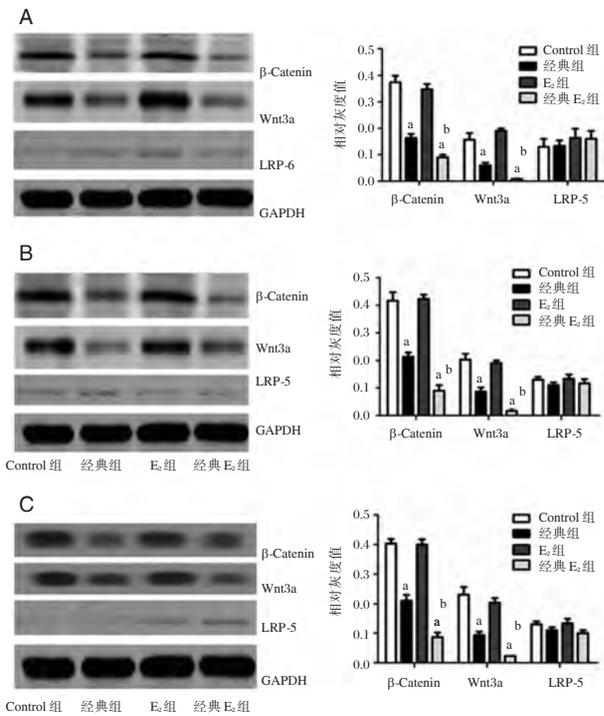
Figure 5 Average AFP of rBMSCs in each group

### 2.9 各组 rBMSCs 肝祖细胞向分化过程中 Wnt 信号通路的表达情况

运用 Western Blot 法分别检测第 3、6、10 天各组 rBMSCs 中 Wnt3a、 $\beta$ -Catenin、LRP-5 的蛋白表达量。与 Control 组及 E<sub>2</sub>组相比,经典组与经典+E<sub>2</sub>组中的  $\beta$ -Catenin、Wnt3a 表达量均显著降低 ( $P<0.05$ ),且经典+E<sub>2</sub>组  $\beta$ -Catenin、Wnt3a 表达量均显著低于经典组 ( $P<0.05$ );而 4 组间 LRP-5 的表达差异均无显著性 ( $P>0.05$ );且不同天数间各组  $\beta$ -Catenin、Wnt3a、LRP-5 的表达差异均无显著性 ( $P>0.05$ )。见图 6。

## 3 讨论

肝纤维化是一个不可逆的过程,若发展为肝硬化失代偿期,目前治疗手段有限,且病死率高。最近,肝细胞移植成为了国内外研究的热点<sup>[7-8]</sup>,但如何构建稳定安全的功能性肝细胞体外培养体系仍是一个难题。BMSCs 来源于骨髓,是一类具有多向分化潜能的干细胞,其易于获取、增殖迅速及无排斥反应等优点,无需考虑伦理问题,是较为理想的肝细胞源。



注:A、B、C分别为第3、6、10天各组Wnt信号蛋白的表达情况;与Control组相比较,\* $P < 0.05$ ;与经典组相比较,\* $P < 0.05$ 。

图6 各组Wnt信号蛋白的表达

Figure 6 Expression of Wnt signaling protein in each group

*rBMSCs* 源于大鼠骨髓,倒置显微镜下观察原代的 *rBMSCs* 多呈类圆形,贴壁生长,随着传代次数增多,逐渐变为长梭形,呈簇状生长,且形态越均一。*rBMSCs* 在骨髓有核细胞中含量不足 0.1%,且其生物学特性易在体外扩增时被破坏<sup>[9]</sup>,由此,寻找一种合适的体外培养体系极为重要。本实验运用全骨髓贴壁法体外培养 *rBMSCs*,通过验证,均符合干细胞生物学特性,从而建立了稳定的 *rBMSCs* 体外培养体系。

研究发现<sup>[10-11]</sup>,雌激素作用于 *BMSCs* 时,除了影响其分泌生长激素的量,还可降低在氧化应激时的凋亡率,其中可能与促进抗凋亡因子及抑制凋亡因子的表达相关。而雌激素影响 *BMSCs* 的增殖、分化和迁移的机制主要通过核受体及质膜受体信号通路,前者指雌激素与雌激素受体相结合,作为转录因子启动基因转录,从而刺激 *BMSCs* 的核酸合成;后者则指通过与质膜上表达的雌激素受体相结合,激活细胞内信号通路,影响 *BMSCs* 的增殖<sup>[12-13]</sup>。本实验结果证实  $17\beta-E_2$  可促进 *rBMSCs* 向肝祖细胞分化,其机制可能与  $17\beta-E_2$  促进 *rBMSCs* 活化,抑制其凋亡,进而促使更多的

*rBMSCs* 向肝祖细胞分化相关。

Wnt $\beta$ -catenin 信号通路作为经典的 Wnt 信号通路,在细胞的增殖分化、动物胚胎形成等事件中起重要作用<sup>[14-16]</sup>。研究发现,Wnt $\beta$ -catenin 信号通路在非肝细胞的内胚层细胞转变成肝细胞的过程中起着关键的作用。本实验通过 Western Blot 法检测 4 组 *rBMSCs* Wnt3a、 $\beta$ -Catenin、LRP-5 的蛋白表达量,结果示经典+E<sub>2</sub>组 Wnt3a、 $\beta$ -Catenin 蛋白含量明显低于其它 3 组,从而推测  $17\beta-E_2$  可能通过调控 Wnt $\beta$ -catenin 信号通路来促进 *rBMSCs* 向肝祖细胞分化。其机制可能与  $17\beta-E_2$  下调 Wnt $\beta$ -catenin 信号蛋白 Wnt3a 和  $\beta$ -Catenin 有关。

### 参考文献

- [1] Struecker B, Raschzok N, Sauer I M. Liver support strategies: cutting - edge technologies [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(3):166-176.
- [2] Cizekowska M, Pluta K. Clinical applications of liver support systems[J]. Postepy Biochem, 2019, 65(3):193-201.
- [3] Zhang B, Zhang C G, Ji L H, et al. Estrogen receptor  $\beta$  selective agonist ameliorates liver cirrhosis in rats by inhibiting the activation and proliferation of hepatic stellate cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(3):747-755.
- [4] Besse-Patin A, Leveille M, Oropeza D, et al. Estrogen Signals Through Peroxisome Proliferator - Activated Receptor - gamma Coactivator 1alpha to Reduce Oxidative Damage Associated With Diet-Induced Fatty Liver Disease [J]. Gastroenterology, 2017, 152(1):243-256.
- [5] Galmes-Pascual B M, Martinez-Cignoni M R, Moran-Costoya A, et al.  $17\beta$ -estradiol ameliorates lipotoxicity-induced hepatic mitochondrial oxidative stress and insulin resistance [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 150:148-160.
- [6] Zhang B, Ji L H, Zhang C G, et al. Gender differences in vascular reactivity of mesenteric arterioles in portal hypertensive and non-portal hypertensive rats [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(39):5953-5960.
- [7] Lee C W, Chen Y F, Wu H H, et al. Historical Perspectives and Advances in Mesenchymal Stem Cell Research for the Treatment of Liver Diseases [J]. Gastroenterology, 2018, 154(1):46-56.
- [8] Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, et al. New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants [J]. Stem Cell Res, 2013, 11(1):563-573.
- [9] Lou G, Chen Z, Zheng M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(6):e346.

## 成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度的相关性以及对并发脑梗死的预测价值

黄一苇\* 张昊 李灵真

**[摘要]** 目的 探讨成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度的相关性以及对并发脑梗死的预测价值。方法 2017年5月至2018年5月间本院首诊的 OSAHS 患者 87 例,根据呼吸暂停低通气指数(AHI)将 OSAHS 患者分为轻中度组 56 例、重度组 31 例,取同期在本院进行体检的健康成年人 50 例作为正常对照组。检测各组研究对象的血清 MIF 水平,动脉血气指标:血氧分压( $\text{PaO}_2$ )、二氧化碳分压( $\text{PaCO}_2$ )、血氧饱和度( $\text{SaO}_2$ )、PH 值,睡眠结构参数:睡眠潜伏期、总睡眠时间、觉醒总时间、觉醒次数、快速眼动睡眠(REM)占总睡眠时间百分比(REM%)、非快速眼动睡眠(NREM)占总睡眠时间百分比(NREM%),血清炎症因子:C反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1(IL-1)水平的差异。采用 Pearson 检验评估成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与缺氧、睡眠结构紊乱及血管内皮损伤程度的相关关系。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 MIF 对 OSAHS 患者远期脑梗死发生的预测价值。结果 轻中度组、重度组患者血清 MIF 的水平高于正常对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ 、PH 水平低于正常对照组, $\text{PaCO}_2$ 水平高于正常对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数、NREM%大于正常对照组,总睡眠时间、REM%小于正常对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );血清中 CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 的水平高于正常对照组( $P<0.05$ )。重度组患者上述指标变化幅度均大于轻中度组患者( $P<0.05$ )。相关性分析发现,成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平与病情严重程度直接相关。ROC 曲线显示,当血清 MIF 水平为 13.28 ng/mL 时,约登指数最大为 40.70,此时曲线下面积为 0.773, (95% CI: 0.631~0.914),预测脑梗死发生的灵敏度为 83.56%、特异度为 57.14%, $P=0.001$ 。结论 成年 OSAHS 患者血清 MIF 水平异常增高,且在反映病情严重程度方面有一定价值。

**[关键词]** OSAHS; MIF; 动脉血气; 睡眠结构; 炎症反应; 脑梗死

### Estimated value of serum MIF level in assessing hypoxia, sleep disorder and vascular endothelial injury in adult OSAHS patients

HUANG Yiwei\*, ZHANG Hao, LI Lingzhen

( Department of Neurology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan, China, 463000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the correlation between serum macrophage migration inhibiting factor (MIF) level and severity of in adult OSAHS patients, and its predictive value to long-term risk of cerebral infarction in patients. Methods 87 cases of adult OSAHS patients in our hospital during May 2017 to May 2018 were divided into mild to moderate group ( $n=56$ )、severe group ( $n=31$ ) according to apnea hypopnea index (AHI). The differences in serum MIF, arterial blood gas indicators [Blood oxygen partial pressure ( $\text{PaO}_2$ ), carbon dioxide partial pressure ( $\text{PaCO}_2$ ), blood oxygen saturation ( $\text{SaO}_2$ ), PH value], sleep structural parameters [sleep latency, total sleep time, total wake time, wake times, percentage of REM in total sleep time (REM%), percentage of NREM in total sleep time (NREM%)] and serum inflammatory

基金项目:驻马店市科技发展项目(18ZF063)

作者单位:驻马店市中心医院神经内三科,河南,驻马店 463000

\*通信作者:黄一苇, E-mail: jianhuangc819099@163.com

cytokines [C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1)] were compared among the subjects in each group. Pearson test was used to evaluate the correlation between serum MIF level and hypoxia, sleep disorder and vascular endothelial injury in adult OSAHS patients. The ROC curve was used to analyze the predictive value of MIF for long-term cerebral infarction in OSAHS patients. **Results** Serum MIF level of mild to moderate group, severe group were higher than those in normal control group; PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> and PH levels were lower than normal control group, PaCO<sub>2</sub> level was higher than that in normal control group; Sleep latency, total time of awakening, number of awakening and NREM% were greater than those in normal control group, while total sleep time and REM% were smaller than those in normal control group; serum levels of CRP, TNF- $\alpha$ , IL-1 were higher than those in normal control group, level of NO was lower than that of normal control group ( $P < 0.05$ ). Changes of above indexes in severe group were all greater than those in mild and moderate group ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that serum MIF level of adult OSAHS patients was directly correlated with the severity of disease. ROC curve showed that when serum MIF level was 13.28 ng/mL, the maximum yoden index was 40.70, and the area under the curve was 0.773 (95% CI: 0.631~0.914). The sensitivity and specificity of predicting the occurrence of cerebral infarction were 83.56% and 57.14%,  $P = 0.001$ . **Conclusion** Serum MIF level of adult OSAHS patients increases abnormally, which has certain value in reflecting the severity of disease.

[KEY WORDS] OSAHS; MIF; Arterial blood gases; Sleep structure; Endothelial injury; Inflammatory response; Cerebral infarction

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 是指上气道塌陷引起的呼吸暂停、通气不足, 患者可频繁发生血氧饱和度下降、白天嗜睡, 远期增加其心血管事件发生概率、威胁其生命安全<sup>[1-2]</sup>。早期明确 OSAHS 病情严重程度, 是采取合理高效干预措施、获得良好治疗结局的关键所在。巨噬细胞移动抑制因子 (Macrophage migration inhibitor, MIF) 是一种炎症反应促进因子, 已经被证实<sup>[3]</sup>在慢性阻塞性肺疾病等慢性炎症性疾病的发生发展中扮演重要角色。有研究指出 OSAHS 也属于一种炎症反应性疾病, 但关于 MIF 与 OSAHS 的关系研究涉及不多。文中检测 OSAHS 患者血清 MIF 的水平, 探讨其水平对 OSAHS 病情严重程度的评估价值, 具体阐述如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

2017年5月至2018年5月间本院首诊的 OSAHS 患者 87 例, 根据呼吸暂停低通气指数 (AHI) 将 OSAHS 患者分为轻中度组 56 例、重度组 31 例, 取同期在本院进行体检的健康成年人 50 例作为正常对照组, 年龄 21~59 岁, 平均年龄 (44.76 $\pm$ 7.65) 岁, 男性 28 例, 女性 22 例。纳入标准: ①符合中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组制定的《阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指

南 (2011 年修订版)》<sup>[4]</sup>中对 OSAHS 的定义; ②年龄 18~79 周岁; ③首次确诊 OSAHS、既往无相关治疗史。排除标准: ①合并慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等可能引起夜间缺氧的疾病; ②合并冠心病、心肌梗死等心脏疾患; ③既往肺部手术史; ④合并恶性肿瘤性疾病。根据呼吸暂停低通气指数 (Apnea-hypopnea Index, AHI) 将 OSAHS 患者分为轻中度组 (5 次/h $\leq$ AHI<30 次/h) 56 例、重度组 (AHI $\geq$ 30 次) 31 例。所有患者及家属均已签署知情同意书。本次研究获本院伦理委员会审核批准。

### 1.2 血清 MIF 水平检测

留取 3 组研究对象的晨 8:00 am 空腹肘静脉血液标本 3.0 mL, 37 $^{\circ}$ C 静置 2 h 后高速离心分离上层血清, 使用酶标仪 (HBS-1101, BioRad) 采用酶联免疫吸附法 (Human MIF ELISA Kit, 碧云天) 检测 MIF 水平。

### 1.3 病情相关指标

留取 3 组研究对象的晨 8:00 am 空腹桡动脉血液标本 2.0 mL, 采用美国 GEM3000 血气分析仪测定血氧分压 (Oxygen partial pressure, PaO<sub>2</sub>)、二氧化碳分压 (Partial pressure of carbon dioxide, PaCO<sub>2</sub>)、血氧饱和度 (Oxygen saturation, SaO<sub>2</sub>)、PH 值等动脉血气指标水平。采用美国伟康公司 Alice4 多导睡眠图仪监测研究对象的睡眠结构参数, 包括睡眠潜伏期、总睡眠时间、觉醒总时间、觉醒次数、快速眼动睡眠 (Rapid eye movement,

REM)占总睡眠时间百分比(REM%)、非快速眼动睡眠(Non Rapid Eye Movement, NREM)占总睡眠时间百分比(NREM%)。同样获取外周静脉血血清标本,使用酶标仪(HBS-1101, BioRad)采用酶联免疫吸附法检测炎症因子的水平,包括C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)(Human CRP ELISA Kit, 碧云天)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )(Human TNF- $\alpha$  ELISA Kit, 碧云天)、白介素-1(Interleukin-1, IL-1)(Human IL-1 ELISA Kit, 碧云天)。

### 1.4 脑梗死的随访

采用查询门诊或住院病例资料、电话回访等方式进行随访,随访内容为是否发生脑梗死,随访终点为2019年10月31日。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 20.0软件处理。符合正态分布的

计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用方差检验,组间两两比较采用LSD- $t$ 法。计数资料以 $n$ (%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。两种数据的相关性分析采用Pearson检验。MIF对脑梗死的预测价值采用受试者工作特征(Receiver operating characteristic curve, ROC)曲线分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清MIF水平和动脉血气指标

轻中度组、重度组患者血清MIF的水平高于正常对照组,且随病情加重血清MIF水平进一步上升( $P < 0.05$ )。轻中度组、重度组患者的 $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ 、PH水平低于正常对照组, $\text{PaCO}_2$ 水平高于正常对照组,且随病情加重上述指标变化幅度进一步增加( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 3组MIF和动脉血气指标水平的比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of serum MIF and arterial blood gas index levels between the 3 groups $(\bar{x} \pm s)$

指标	正常对照组( $n=50$ )	轻中度组( $n=56$ )	重度组( $n=31$ )	$F/\chi^2$ 值	$P$ 值
男/女	28/22	34/22	22/9	1.822	0.402
年龄	44.76 $\pm$ 7.65	44.83 $\pm$ 8.29	45.10 $\pm$ 8.32	0.652	0.516
体质指数	24.50 $\pm$ 3.74	24.87 $\pm$ 3.49	24.76 $\pm$ 3.52	0.782	0.436
MIF	8.59 $\pm$ 0.97	11.51 $\pm$ 0.76	13.73 $\pm$ 0.98	16.454	0.000
$\text{PaO}_2$	98.63 $\pm$ 1.23	92.20 $\pm$ 5.81	83.64 $\pm$ 9.52	7.725	0.000
$\text{PaCO}_2$	38.46 $\pm$ 5.10	44.80 $\pm$ 6.37	50.72 $\pm$ 7.34	9.470	0.000
$\text{SaO}_2$	98.77 $\pm$ 1.20	94.65 $\pm$ 3.42	85.84 $\pm$ 9.20	10.711	0.000
PH	7.39 $\pm$ 0.11	7.28 $\pm$ 0.18	7.13 $\pm$ 0.24	8.295	0.000

### 2.2 睡眠结构参数

轻中度组、重度组患者的睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数、NREM%大于正常对照组,总

睡眠时间、REM%小于正常对照组,且随病情加重上述指标变化幅度进一步增加( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 3组睡眠结构参数水平的比较 $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of sleep structure parameters between 3 groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	$n$	睡眠潜伏期(min)	总睡眠时间(min)	觉醒总时间(min)	觉醒次数(次)	REM%	NREM%
正常对照组	50	30.15 $\pm$ 4.28	439.74 $\pm$ 73.13	57.12 $\pm$ 8.59	5.46 $\pm$ 0.68	22.38 $\pm$ 2.75	73.10 $\pm$ 8.65
轻中度组	56	43.84 $\pm$ 5.61	380.31 $\pm$ 45.82	79.66 $\pm$ 9.21	8.20 $\pm$ 0.92	19.45 $\pm$ 2.17	82.64 $\pm$ 9.53
重度组	31	57.96 $\pm$ 8.22	311.49 $\pm$ 37.24	93.74 $\pm$ 11.85	9.76 $\pm$ 1.14	14.02 $\pm$ 1.83	87.92 $\pm$ 9.70
$F$ 值		15.914	10.920	15.549	12.845	15.372	8.055
$P$ 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.3 炎症因子

轻中度组、重度组患者血清中CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1

的水平高于正常对照组,且随病情加重上述指标变化幅度进一步增加( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 3组血清炎症因子水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of serum inflammatory cytokine levels between 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CRP (mg/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 (pg/mL)
正常对照组	50	1.05 $\pm$ 0.23	3.46 $\pm$ 0.48	2.81 $\pm$ 0.35
轻中度组	56	4.28 $\pm$ 0.59	9.21 $\pm$ 1.52	5.03 $\pm$ 0.57
重度组	31	10.64 $\pm$ 2.12	17.58 $\pm$ 2.63	9.74 $\pm$ 1.13
F值		29.022	35.634	34.385
P值		0.000	0.000	0.000

### 2.4 相关性分析

OSAHS患者血清MIF水平与PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、PH水平呈负相关,与PaCO<sub>2</sub>水平呈正相关;与睡眠潜伏期、觉醒总时间、觉醒次数、NREM%呈正相关,与总睡眠时间、REM%呈负相关;与CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1水平呈正相关( $P < 0.05$ )见表4。

表4 OSAHS患者血清MIF水平并病情指标的相关性分析  
Table 4 Correlation analysis of serum MIF level and disease indexes in OSAHS patients

指标	r值	P值
PaO <sub>2</sub>	-0.764	0.000
PaCO <sub>2</sub>	0.661	0.018
SaO <sub>2</sub>	-0.599	0.028
PH	-0.684	0.009
睡眠潜伏期	0.637	0.022
总睡眠时间	-0.702	0.003
觉醒总时间	0.814	0.000
觉醒次数	0.653	0.020
REM%	-0.775	0.000
NREM%	0.696	0.005
CRP	0.682	0.010
TNF- $\alpha$	0.723	0.000
IL-1	0.597	0.029

### 2.6 ROC曲线分析

随访期内,87例OSAHS患者中出现脑梗死14例。当血清MIF水平为13.28 ng/mL时,约登指数最大为40.70,此时曲线下面积为0.773, (95%CI: 0.631~0.914),预测脑梗死发生的灵敏度为83.56%、特异度为57.14%,  $P=0.001$ 。见图1。

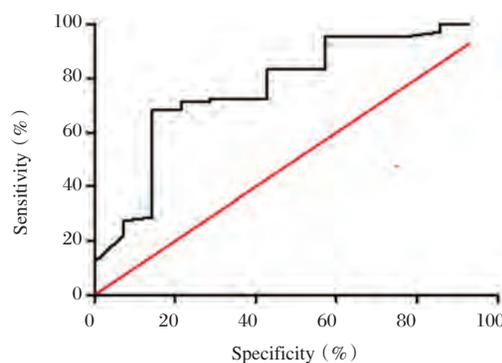


图1 血清MIF对OSAHS患者脑梗死发生风险的预测价值

Figure 1 Predictive value of serum MIF in OSAHS patients with cerebral infarction

## 3 讨论

OSAHS所致睡眠呼吸紊乱可对全身多个脏器造成损害,同时是公认的心血管疾病独立危险因素。较多研究<sup>[5-7]</sup>指出OSAHS患者存在血清多种炎症因子高表达,可能是一种特殊的炎症性疾病。MIF由垂体分泌,参与糖皮质激素的负反馈调节,同时在炎症反应的调节中也发挥重要作用。

OSAHS患者上气道软组织过多、结构相对狭窄,夜间上气道扩张代偿机制缺失,入睡后可出现气道扩张肌及软腭、舌根等结构塌陷,共同导致上气道塌陷甚至完全闭塞<sup>[8-9]</sup>。以上解剖及病理改变使得患者吸气时气流受限,低通气及呼吸停顿发生<sup>[10-11]</sup>。本实验结果与上述理论吻合,且随病情加重患者PaO<sub>2</sub>、PH值下降更为显著,PaCO<sub>2</sub>值则进一步上升。动脉血气指标水平异常与后续OSAHS患者心血管疾病发生、认知功能减退等也密切相关,是反映疾病严重程度的重要指标之一。睡眠结构紊乱是OSAHS患者的主要特征之一<sup>[12-14]</sup>,多导睡眠图仪可量化明确OSAHS患者的睡眠结构紊乱程度这与患者气道塌陷所致持续慢性缺氧密切相关。文中OSAHS患者血清MIF水平与上述血气指标、睡眠结构紊乱程度均直接相关,提示MIF可反映OSAHS病情严重程度,且可能直接或间接参与疾病进展。

OSAHS患者持续处于慢性缺氧状态,其产生的氧化应激反应可促进大量炎症因子释放,这可能是后续患者血管内皮损伤、心血管事件发生风险增加的内在机制之一<sup>[15]</sup>。文中OSAHS患者血

清中 CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 的水平较健康人群高,且随病情加重 CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 水平进一步增高。ROC 曲线分析发现,血清 MIF 水平为 13.28 ng/mL 时对 OSAHS 患者远期发生脑梗死的预测价值最高,检测血清 MIF 水平对 OSAHS 患者脑梗死发生风险具有一定预测价值。

综上所述,可得出以下结论:OSAHS 患者血清中 MIF 水平异常增高,且具体水平与患者缺氧程度、睡眠结构紊乱程度、炎症反应程度直接相关,可能是反映 OSAHS 病情严重程度的有效、简便指标之一。且血清 MIF 水平对 OSAHS 患者的远期脑梗死发生风险具有一定预测价值。本研究也存在一定局限性,如纳入病例数有限、未涉及 MIF 影响 OSAHS 的基础机制,有待后续研究进一步完善。

## 参考文献

- [1] Ko CY, Fan JM, Hu AK, et al. Disruption of sleep architecture in Prevotella enterotype of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(5): e01287.
- [2] Ko CY, Liu QQ, Su HZ, et al. Gut microbiota in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: disease-related dysbiosis and metabolic comorbidities [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(7): 905-917.
- [3] 郁昊达, 范晓东, 殷波, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清巨噬细胞移动抑制因子的表达 [J]. *江苏医药*, 2016, 42(4): 437-439.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011年修订版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 9-12.
- [5] Wang X, Wang Y, Cai Z, et al. Alterations of IGF-1, complement C3 and superoxide dismutase in patients with moderate-to-severe obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(3): 217-228.
- [6] Toujani S, Kaabachi W, Mjid M, et al. Vitamin D deficiency and interleukin-17 relationship in severe obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Ann Thorac Med*, 2017, 12(2): 107-113.
- [7] Lu D, Li N, Yao X, et al. Potential inflammatory markers in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2017, 17(1): 47-53.
- [8] Ko CY, Fan JM, Hu AK, et al. Disruption of sleep architecture in Prevotella enterotype of patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(5): e01287.
- [9] 郭建梅, 赵季红. 慢性心力衰竭合并阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者经鼻持续气道正压通气治疗效果分析 [J]. *中国医药*, 2019, 14(2): 204-207.
- [10] 赵丹, 刘娅钦, 袁国航, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征对患者肾功能的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(7): 1128-1130.
- [11] Xie H, Yin J, Bai Y, et al. Differential expression of immune markers in the patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(3): 735-744.
- [12] 涂文斌, 刘常青. 经鼻持续正压通气对癫痫合并睡眠暂停患者睡眠结构和基质金属蛋白酶-9及肿瘤坏死因子水平影响分析 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2019, 14(6): 316-317.
- [13] 陈惟虎, 胡春玖, 汪永干, 等. OSAHS 患者同期多平面手术前后睡眠结构的变化及疗效分析 [J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2019, 27(2): 127-129.
- [14] Ye H, Zheng C, Lan X, et al. Evaluation of retinal vasculature before and after treatment of children with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome by optical coherence tomography angiography [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 257(3): 543-548.
- [15] Liu J, Li Z, Liu Z, et al. Exhaled nitric oxide from the central airway and alveoli in OSAHS patients: the potential correlations and clinical implications [J]. *Sleep Breath*, 2016, 20(1): 145-154.
- [15] Ye R, Holland W L, Gordillo R, et al. Adiponectin is essential for lipid homeostasis and survival under insulin deficiency and promotes  $\beta$ -cell regeneration [J]. *Elife*, 2014, 3.
- [16] López-Tinoco C, Roca M, Fernández-Deudero A, et al. Cytokine profile, metabolic syndrome and cardiovascular disease risk in women with late-onset gestational diabetes mellitus [J]. *Cytokine*, 2012, 58(1): 14-19.
- [17] Liu T, Fang Z, Yang D, et al. [Correlation between the inflammatory factors and adipocytokines with gestational diabetes mellitus and their change in puerperium] [Z]. 2012: 47, 436-439.
- [18] Aye I L M H, Rosario F J, Powell T L, et al. Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth [J]. *P Nati Acad Sci*, 2015, 112(41): 12858-12863.
- [19] Aye I L M H, Jansson T, Powell T L. TNF- $\alpha$  stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling [J]. *Phys Rep*, 2015, 3(10).

(上接第 453 页)

## 急性呼吸窘迫综合征患者血清PCT、NT-proBNP水平变化及意义

杨慧亮\* 李颖 巴晓彤

**[摘要]** 目的 探究急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者血清降钙素原(PCT)、N末端B型脑钠肽前体(NT-proBNP)变化及意义。方法 选取本院2017年10月至2019年10月收治的96例ARDS患者,根据患者病情严重程度分为轻度组( $n=39$ )、中度组( $n=31$ )和重度组( $n=26$ ),并观测患者住院28d死亡情况,分为生存组( $n=84$ )和死亡组( $n=12$ ),记录患者临床基线资料、血清因子等指标,对比各组差异,Spearman 检验分析血清PCT、NT-proBNP与SOFA、APACHE II的相关性;受试者工作特征曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)分析血清PCT、NT-proBNP在ARDS患者预后诊断中的价值。结果 轻度组、中度组及重度组性别、年龄、呼吸频率、吸氧浓度、平均动脉压(MAP)、中心静脉压(CVP)、白细胞计数(WBC)、血红蛋白(Hb)、白蛋白(ALB)比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。轻度组、中度组及重度组RICU住院时间、机械通气时间、氧合指数(OI)、心率(HR)、PCT、NT-proBNP、SOFA及APACHE II评分比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。PCT与SOFA及APACHE II评分存在明显正相关性,NT-proBNP与SOFA及APACHE II评分存在明显负相关性,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。存活组与死亡组血清PCT、NT-proBNP水平比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。ROC曲线结果显示,PCT、NT-proBNP及两者联合诊断的AUC分别为0.847(95%CI 0.795~0.900)、0.729(95%CI 0.657~0.802)、0.932(95%CI 0.899~0.965)。结论 血清PCT、NT-proBNP对于预测ARDS患者病情严重程度及预后具有显著价值,可作为ARDS早期诊断的参考指标。

**[关键词]** 急性呼吸窘迫综合征;降钙素原;N末端B型脑钠肽前体

### Changes and significance of serum PCT and NT-proBNP levels in patients with acute respiratory distress syndrome

YANG Huiliang\*, LI Ying, BA Xiaotong

(Department of Emergency Medicine, Daxing Teaching Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 102600)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the changes and significance of serum procalcitonin (PCT) and N-terminal B-type natriuretic peptide precursor (NT-proBNP) in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** A total of 96 patients with ARDS treated in our hospital from October 2017 to October 2019 were selected and divided into mild group ( $n=39$ ), moderate group ( $n=31$ ), and severe group ( $n=26$ ) according to the severity of their patients. And observe the 28-day deaths of patients in the hospital. They were divided into survival group ( $n=84$ ) and death group ( $n=12$ ). Patients' clinical baseline data, serum factors and other indicators were recorded. Differences between the groups were compared. Spearman test was used to analyze serum PCT, The correlation between NT-proBNP and SOFA and APACHE II; the receiver operating characteristic curve (ROC) and the area under the curve (AUC) analyzed the value of serum PCT

基金项目:大兴基金项目(XZYF2017-22)

作者单位:首都医科大学大兴教学医院急诊内科,北京 102600

\*通信作者:杨慧亮, E-mail:shijiu546754@163.com

and NT-pro BNP in the prognosis diagnosis of ARDS patients. **Results** Differences in gender, age, respiratory rate, oxygen concentration, mean arterial pressure (MAP), central venous pressure (CVP), white blood cell count (WBC), hemoglobin (Hb), albumin (ALB) in mild, moderate and severe groups no statistical significance ( $P>0.05$ ). There were statistically significant differences in hospitalization time, mechanical ventilation time, oxygenation index (OI), heart rate (HR), PCT, NT-pro BNP, SOFA, and APACHE II scores in the mild, moderate and severe groups ( $P<0.05$ ). There was a significant positive correlation between PCT and SOFA and APACHE II scores, and a significant negative correlation between NT-pro BNP and SOFA and APACHE II scores ( $P<0.05$ ). The differences in serum PCT and NT-pro BNP levels between the survival group and the death group were statistically significant ( $P<0.05$ ). ROC curve results showed that the AUC of PCT, NT-pro BNP, and the combined diagnosis were 0.847 (95% CI 0.795-0.900), 0.729 (95% CI 0.657-0.802), 0.932 (95% CI 0.899-0.965). **Conclusion** Serum PCT and NT-pro BNP have significant value in predicting the severity and prognosis of patients with ARDS, and can be used as reference indicators for early diagnosis of ARDS.

[KEY WORDS] Acute respiratory distress syndrome; Procalcitonin; N-terminal B-type natriuretic peptide precursor

急性呼吸窘迫综合征 (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床上较为常见的一类急危重症, 患者以弥漫性内皮和肺泡损伤为主要特征, 可导致患者肺泡水肿、气体交换功能崩溃及低氧性呼吸衰竭等, 患者死亡率较高。大量生物学标志物与 ARDS 的发生发展及预后密切相关, 寻找可靠的分子标志物对于其临床诊疗及患者预后具有重要意义<sup>[1]</sup>。ARDS 直接或间接损伤肺部, 并可累及全身多个器官, 炎症因子激增是 ARDS 的主要发病机制, 中性粒细胞、巨噬细胞的聚集活化, 促进大量炎症趋化因子产生和损伤肺组织<sup>[2]</sup>。降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 为机体感染和炎症反应的有效生物标志物, 与患者感染严重程度及预后关系密切<sup>[3]</sup>。N 末端 B 型脑钠肽前体 (N-terminal B-type natriuretic peptide precursor, NT-proBNP) 反映了心室功能及负荷情况, 而研究发现多种炎症因子可以刺激其基因转录和表达<sup>[4]</sup>。因此, 本研究对急性呼吸窘迫综合征患者血清 PCT、NT-proBNP 水平变化及意义进行了探究, 以期对 ARDS 患者的临床诊疗和预后改善提供有效支持。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月收治的 96 例 ARDS 患者。根据柏林定义 ARDS 诊断标准评<sup>[5]</sup>估患者病情严重程度, 并分为轻度组 ( $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ ,  $n=39$ )、中度组 ( $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ ,  $n=31$ ) 和重度组

( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ ,  $n=26$ ), 并观测患者住院 28d 死亡情况, 分为生存组 ( $n=84$ ) 和死亡组 ( $n=12$ )。纳入标准: ①符合“柏林定义”关于 ARDS 的诊断标准<sup>[5]</sup>; ②发病至入院时间  $<24 \text{ h}$ ; ③肺部 X 线显示双肺有斑片状阴影; ④患者或家属知情同意并签署知情同意书。排除标准: ①合并肝、肾、心等重要脏器功能异常者; ②合并大面积肺栓塞、慢性阻塞性肺病、肺动脉高压、恶性肿瘤、免疫功能异常及精神疾病患者; ③多脏器衰竭终末期或入院 24 h 内死亡患者; ④其他因素所致无法配合完成此研究者。3 组患者在性别、年龄上比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。

### 1.2 方法

记录所有患者性别、年龄等临床基线资料, 根据患者病情给予平喘解痉、祛痰、抗炎、抗感染、纠正水电解质酸碱平衡、呼吸机辅助等治疗, 统计患者机械通气时间、呼吸重症监护病房 (Respiratory intensive care unit, RICU) 住院时间、呼吸频率、吸氧浓度等指标。

所有患者入院后测量平均动脉压 (Mean arterial pressure, MAP)、中心静脉压 (Central venous pressure, CVP)、心率 (Heart rate, HR)、氧合指数 (Oxygenation index, OI) 指标, 抽取 5 mL 空腹静脉血, 采用迈瑞 BS-220 全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司) 测定白细胞计数 (White blood cell count, WBC)、血红蛋白 (Hemoglobin, Hb)、白蛋白 (Albumin, ALB) 水平。PCT 采用 BRAHMS 快速半定法 (PCT-Q) 测定, NT-pro

BNP 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定,试剂盒均购自北京中山金桥生物技术有限公司。患者入院 28d 后采用序贯器官功能衰竭(Sequential Organ Failure Assessment, SOFA)评分及急性生理学及慢性健康状况评分 II (acute physiology and chronic health evaluation scoring system, APACHE II)评估患者预后情况,均分数越高,患者预后越差。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计数资料以  $n$  表示,计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两两比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析; Spearman 检验分析血清 PCT、NT-proBNP 与 SOFA、APACHE II 的相关性;受试者工作特征曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)分析血清 PCT、NT-pro BNP 在 ARDS 患者预后诊断中的价值。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同严重程度 ARDS 患者基线资料比较

轻度组、中度组及重度组患者性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );3 组患者 RICU 住

院时间、机械通气时间比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着患者病情加重,RICU 住院时间、机械通气时间显著增加。见表 1。

表 1 不同严重程度 ARDS 患者基线资料比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 1 Comparison of baseline data of patients with ARDS of different severity  $(\bar{x} \pm s)$

组别	$n$	年龄(岁)	性别(男/女)	RICU 住院时间(d)	机械通气时间(d)
轻度组	39	67.8±3.7	23/16	5.7±0.9	5.1±1.1
中度组	31	68.5±4.5	17/14	9.2±1.9 <sup>a</sup>	8.8±1.7 <sup>a</sup>
重度组	26	67.3±4.1	15/11	16.8±3.5 <sup>ab</sup>	15.9±3.6 <sup>ab</sup>
$F$ 值		0.473	0.011	17.650	17.145
$P$ 值		0.630	0.9182	0.000	0.000

注:与轻度组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与中度组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 不同严重程度 ARDS 患者临床资料比较

轻度组、中度组及重度组患者呼吸频率、吸氧浓度、MAP、CVP、WBC、Hb、ALB 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。轻度组、中度组及重度组 OI、HR、PCT、NT-pro BNP、SOFA 及 APACHE II 评分比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着患者病情加重,OI 显著降低,HR、PCT、NT-pro BNP、SOFA 及 APACHE II 评分显著升高。见表 2。

表 2 不同严重程度 ARDS 患者临床资料比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of clinical data of patients with ARDS of different severity  $(\bar{x} \pm s)$

项目	轻度组( $n=39$ )	中度组( $n=31$ )	重度组( $n=26$ )	$F$ 值	$P$ 值
呼吸频率(次/min)	29.8±4.0	31.5±4.4	31.6±3.8	1.874	0.064
吸氧浓度(L/min)	0.6±0.2	0.7±0.4	0.7±0.5	1.067	0.293
OI	118.2±9.9	96.4±7.8	84.3±8.3	19.787	0.000
MAP(mmHg)	85.3±11.5	84.4±10.9	81.8±11.7	1.470	0.145
CVP(cmH <sub>2</sub> O)	9.3±2.9	8.7±3.1	8.3±3.6	1.526	0.130
HR(次/min)	93.8±7.2	98.3±8.1 <sup>a</sup>	113.1±11.4 <sup>ab</sup>	10.163	0.000
WBC( $\times 10^9/L$ )	6.7±1.8	7.2±2.0	7.5±2.6	1.838	0.069
Hb(g/L)	116.8±22.4	113.8±21.9	109.8±24.5	1.522	0.131
ALB(g/L)	28.8±5.3	27.6±4.6	27.0±5.2	1.669	0.098
PCT(ng/mL)	5.2±1.7	7.2±1.8 <sup>a</sup>	9.6±2.3 <sup>ab</sup>	11.104	0.000
NT-pro BNP(ng/L)	1399.5±164.2	2427.8±207.5 <sup>a</sup>	4438.6±369.7 <sup>ab</sup>	55.514	0.000
SOFA(分)	7.1±1.7	8.7±1.1 <sup>a</sup>	10.1±3.2 <sup>ab</sup>	5.688	0.000
APACHE II(分)	15.3±3.6	19.2±4.1 <sup>a</sup>	25.2±3.9 <sup>ab</sup>	13.251	0.000

注:与轻度组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与中度组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 ARDS 患者血清 PCT、NT-pro BNP 与 APACHE II、SOFA 评分的相关性分析

PCT 与 SOFA( $r=0.492, P=0.000$ )及 APACHE II ( $r=0.473, P=0.000$ )评分存在明显正相关性,NT-pro BNP 与 SOFA( $r=0.416, P=0.000$ )及 APACHE II ( $r=$

0.485,  $P=0.000$ )评分存在明显负相关性,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.4 不同预后 ARDS 患者血清 PCT、NT-pro BNP 水平比较

存活组患者血清 PCT 水平显著低于死亡组患

者,NT-pro BNP水平显著高于死亡组患者,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 不同预后ARDS患者血清PCT、NT-pro BNP水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of serum PCT and NT-pro BNP levels in patients with ARDS with different prognosis ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PCT(ng/mL)	NT-pro BNP(ng/L)
存活组	84	6.6±1.9	1576.3±163.5
死亡组	12	10.3±2.8	4722.1±405.2
t值		4.434	26.586
P值		0.001	0.000

## 2.5 PCT、NT-pro BNP对于ARDS患者预后诊断的ROC曲线

ROC曲线结果显示,PCT、NT-pro BNP及两者联合诊断的AUC分别为0.847(95%CI 0.795~0.900)、0.729(95%CI 0.657~0.802)、0.932(95%CI 0.899~0.965),当PCT为6.3 ng/mL时,其诊断敏感度为0.835、特异度为0.759,当NT-pro BNP为2794.5 ng/L时,其诊断敏感度为0.721,特异度为0.729,联合诊断的敏感度为0.913,特异度为0.906。见图1。

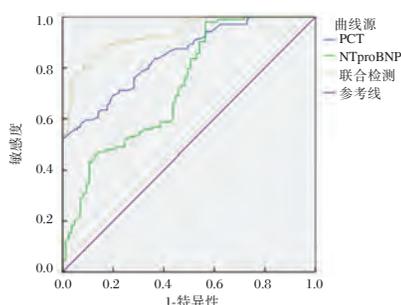


图1 PCT、NT-pro BNP对于ARDS患者预后诊断的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of PCT and NT-pro BNP for prognosis diagnosis of ARDS patients

## 3 讨论

ARDS常发生于休克、严重创伤、感染及烧伤等,死亡率极高,严重危害了患者的生命健康及生活质量。ARDS的发病与全身炎症有着密切关系,研究认为抗炎因子、促炎因子动态平衡被打破导致机体发生细胞炎性因子失控性释放,进而导致ARDS和急性肺损伤(ALI)的发生<sup>[6-7]</sup>。另有研究报告<sup>[8]</sup>,炎症因子水平异常升高贯穿于ARDS发生

发展的整个过程,相关炎症反应加剧凝血过程,导致ARDS患者肺微血管内血栓形成的病理变化。本研究对ARDS患者机体炎症相关细胞因子与患者疾病程度及预后的相关性进行探究,以期对ARDS患者的临床诊疗和预后评估提供依据。本研究结果显示,ARDS患者随着病情加重,OI逐渐降低,HR显著增加,MAP、CVP、呼吸频率、血常规指标出现细微变化,这是因为病情越严重,患者血清炎症反应和炎症损伤越严重,促进了肺组织及微血管透明膜物理性屏障损伤,并加重了心室负荷和功能障碍;随着ARDS患者病情加重,患者发生局部肺栓塞的风险也越高,溶解酶原、纤维蛋白激活也越严重,患者疾病越严重,预后越差<sup>[9]</sup>。

PCT为一种含有116个氨基酸的蛋白质,其为降钙素的前提激素,正常机体中PCT主要由甲状腺C细胞分泌并经细胞内蛋白水解酶水解的主要活性成分。正常人体中PCT含量极低,但在创伤、感染和脓毒症等患者中PCT明显升高。PCT反映了机体炎症反应的活跃程度,并对于严重感染诊断具有较高的灵敏度和特异度<sup>[10-11]</sup>。本研究中,随着患者疾病程度加重,血清PCT水平明显升高。提示,随着患者病情恶化,PCT出现进行性升高。脑钠肽(BNP)是由心室分泌的脑钠肽前体裂解而成,并生成NT-pro BNP。NT-pro BNP稳定性好,半衰期较长,可作为反应机体BNP水平的有效指示指标<sup>[12]</sup>。NT-pro BNP升高与心脏压力负荷升高及功能障碍有关,ARDS患者低氧血症导致肺血管收缩和栓塞,导致心肌氧输送及心输出量减少,心脏压力负荷和功能失代偿明显增加,并随病情发展,这种现象进一步加剧<sup>[13]</sup>。NT-pro BNP升高还与ARDS患者肺动脉高压及心功能不全有关,研究表明<sup>[14]</sup>中枢神经系统、甲状腺、肺部等心脏外组织存在BNP转录基因,但其分泌功能较心肌细胞低。还有研究表明<sup>[15]</sup>,IL-6、TNF- $\alpha$ 、内毒素等炎症因子可通过炎症介质通路刺激心肌细胞BNP相关基因,从而促进NT-pro BNP水平增加。综上所述,血清PCT、NT-pro BNP对于预测ARDS患者病情严重程度及预后具有显著价值,可作为ARDS早期诊断的参考指标。

## 参考文献

- [1] Hendrickson CM, Matthay MA. Potential Value of Biomarker Signatures in Sepsis and Acute Respiratory Distress Syn-

(下转第477页)

· 论 著 ·

## 人附睾蛋白4和趋化因子配体9在狼疮性肾炎诊断及预后的应用价值

魏华\* 张彩凤 王佳丽

**[摘要]** 目的 探讨人附睾蛋白4(HE4)、趋化因子配体9(CXCL9)在狼疮性肾炎(LN)诊断及预后的应用价值。方法 选取本院2016年1月~2018年1月收治的82例LN患者作为研究组,另选取80例系统性红斑狼疮(SLE)未合并LN患者作为对照组。检测、对比两组入院时血清HE4、CXCL9水平,应用受试者工作(ROC)曲线分析血清HE4、CXCL9水平诊断价值。研究组均给予常规治疗,共治疗6个月,治疗后随访1年,根据是否发生复合肾脏终点事件分为预后不良者与预后良好者。统计对比两者入院时、治疗6个月后血清HE4、CXCL9水平,采用Logistic回归分析LN预后影响因素,应用ROC曲线分析血清HE4、CXCL9水平对预后不良的预测价值。结果 研究组入院时血清HE4、CXCL9水平高于对照组( $P<0.05$ );ROC曲线分析显示,血清HE4、CXCL9联合诊断AUC为0.773,大于HE4(0.670)、CXCL9(0.613),当HE4截断值 $>160.07$  U/mL、CXCL9截断值 $>218.93$  pg/mL时,敏感度为76.83%,特异度为76.25%;预后不良者治疗6个月后血清HE4、CXCL9水平高于预后良好者( $P<0.05$ );Logistic回归分析显示,SLEDAI评分( $OR=2.820$ )、血清HE4( $OR=1.283$ )、CXCL9( $OR=2.141$ )水平是LN预后的重要因素( $P<0.05$ );ROC曲线分析显示,治疗6个月后CXCL9预测预后不良AUC为0.670,大于HE4(0.667),当截断值 $>191.88$ 时,敏感度为60.00%,特异度为76.12%。结论 血清HE4、CXCL9在LN中呈高表达状态,联合检测具有良好诊断价值,是预后的重要因素,可作为预后不良的预测因子。

**[关键词]** 狼疮性肾炎;趋化因子配体9;人附睾蛋白4;复合肾脏终点事件

### The application value of human epididymis protein 4 and chemokine ligand 9 in the diagnosis and prognosis of lupus nephritis

WEI Hua\*, ZHANG Caifeng, WANG Jiali

(Department of nephrology, Xinxiang central hospital, Xinxiang, Henan, China, 453000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the value of human epididymis protein 4 (HE4) and chemokine ligand 9 (CXCL9) in the diagnosis and prognosis of lupus nephritis (LN). Methods 82 patients with LN who were admitted to our hospital were enrolled from January 2016 to January 2018. Eighty patients with systemic lupus erythematosus (SLE) without LN were selected as the control group. Serum HE4 and CXCL9 levels were measured and compared between the two groups. The diagnostic value of serum HE4 and CXCL9 levels was analyzed by using the receiver work (ROC) curve. All the patients in the study group received routine treatment for 6 months. After the treatment, they were followed up for 1 year. According to whether the compound renal endpoint occurred, the patients with poor prognosis and prognosis were classified. The serum levels of HE4 and CXCL9 were measured at the time of admission and 6 months after treatment. Logistic regression analysis was used to analyze the prognostic factors of LN. The ROC curve was used to analyze the predictive value of serum HE4 and CXCL9 levels for poor prognosis. Results The levels of serum HE4 and CX-

基金项目:河南省科技厅重点科技攻关项目(122102310013)

作者单位:新乡市中心医院肾内科,河南,新乡 453000

\*通信作者:魏华, E-mail: 15637359221@163.com

CL9 in the study group were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The ROC curve analysis showed that the combined AUC of serum HE4 and CXCL9 was 0.773, which was greater than HE4 (0.670) and CXCL9 (0.613), when the cutoff value of HE4 $>160.07$  U/mL and the cutoff value of CXCL9 $>218.93$  pg/mL, the sensitivity was 76.83% and the specificity was 76.25%; the serum HE4 and CXCL9 levels were higher than those with good prognosis after 6 months of treatment ( $P<0.05$ ). Logistic regression analysis showed that SLE-DAI score ( $OR=2.820$ ), serum HE4 ( $OR=1.283$ ), and CXCL9 ( $OR=2.141$ ) levels were important factors affecting the prognosis of LN ( $P<0.05$ ); the ROC curve analysis showed that CXCL9 predicted a poor prognosis AUC of 0.670 after treatment for 6 months, which was greater than HE4 (0.667), when the cutoff value was  $>191.88$ , the sensitivity was 60.00% and the specificity was 76.12%. **Conclusion** Serum HE4 and CXCL9 are highly expressed in LN. Combined detection has good diagnostic value and is an important prognostic factor. It can be used as a predictor of poor prognosis.

[KEY WORDS] Lupus nephritis; Chemokine ligand 9; Human epididymis protein 4; Composite renal endpoint

狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)属于系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)最常见且严重并发症之一,可明显提高心血管疾病、终末期肾病发生风险<sup>[1-2]</sup>。目前,临床尚无根治LN手段,患者通常预后较差。据流行病学调查显示,肾脏受累在我国SLE患者死亡原因中仅次于感染居于第二位<sup>[3]</sup>。积极探索可靠诊断及预后相关指标对及时调整治疗方案、改善预后情况、降低死亡风险具有重要意义。相关研究表明,趋化因子配体9(CXCL9)属于趋化因子家族重要成员,可结合受体介导细胞迁移,激活免疫活性细胞、抗原递呈细胞,调控机体免疫机制,参与SLE发病、进展过程<sup>[4]</sup>。另有文献指出,慢性肾脏疾病造成肾脏受损后,肾远曲小管可释放人附睾蛋白4(Human epididymal protein 4, HE4)进入血液,导致其血清含量异常升高<sup>[5]</sup>。但关于两者在LN诊断与预后的价值仍缺乏循证依据。基于此,本研究首次综合分析HE4、CXCL9在LN诊断及预后的应用价值,旨在为临床诊治该病提供参考依据。详情如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2016年1月~2018年1月收治的82例LN患者作为研究组,男性12例,女性70例,年龄20~63岁,平均年龄( $35.31\pm 7.33$ )岁,肾功能指标:血肌酐( $126.30\pm 35.27$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,尿素氮( $9.22\pm 2.05$ ) $\text{mmol/L}$ 。另选取80例系统性红斑狼疮(SLE)未合并LN患者作为对照组,男性11例,女性69例,年龄21~64岁,平均年龄( $36.48\pm 6.90$ )岁,肾功能指标:血肌酐( $98.23\pm 27.76$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,尿素氮

( $7.81\pm 1.75$ ) $\text{mmol/L}$ 。两组年龄、性别等一般资料均衡可比( $P>0.05$ ),两组肾功能指标(血肌酐、尿素氮)相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。本研究经我院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①研究组均经临床诊断、肾组织活检证实为LN,且符合美国风湿病学会制定的LN相关诊断标准<sup>[6]</sup>;②对照组均确诊为SLE,且未合并LN;③两组临床资料完整;④患者及家属均知情本研究方案,自愿签署知情承诺书。排除标准:①伴有恶性肿瘤疾病者;②存在慢性炎症性疾病、免疫性疾病者;③心肝肺等其他重要脏器严重功能异常者;④合并其他急慢性肾脏疾病者;⑤参与本研究前1个月内服用细胞毒性药物或免疫抑制剂者;⑥伴有全身感染性疾病者;临床资料缺失者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 检测方法

采集空腹静脉血4 mL,离心处理,离心速率为2 500 r/min,离心半径为15 cm,离心时间为10 min,取上清液,保存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 条件下,待检。采用化学发光法检测血清HE4水平,购自美国雅培公司的全自动化学发光分析仪及配套试剂盒进行检测;采用酶联免疫吸附法检测血清CXCL9水平,选择购自美国BIOTEK公司的酶标检测仪(EI800型)及试剂盒进行检测,严格按照说明书实施操作步骤。

#### 1.2.2 治疗方法

研究组所有患者均给予泼尼松,初期口服1.0 mg/(kg·d),2个月后减少剂量至10 mg/d;来氟米特最初3 d负荷量50 mg/d,之后口服20 mg/d;厄贝沙坦口服100 mg/次,1次/d。共治疗6个月。随访1年,统计复合肾脏终点事件发生情况,主要

包括终末期肾病、血清肌酐倍增、肾小球滤过率(eGFR)下降 $\geq 50\%$ 、全因死亡。

### 1.4 统计学处理

使用SPSS 24.0软件进行数据处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,t检验,计数资料以n(%)表示, $\chi^2$ 检验,采用Logistic回归分析探究LN预后影响因素,应用ROC曲线分析血清HE4、CXCL9水平对LN诊断及预测预后价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组入院时血清HE4、CXCL9水平

研究组入院时血清HE4、CXCL9水平高于对照组( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 两组入院时血清HE4、CXCL9水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum HE4 and CXCL9 levels in two groups at admission ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HE4(U/mL)	CXCL9(pg/mL)
研究组	82	184.35 $\pm$ 62.24	234.46 $\pm$ 42.09
对照组	80	126.27 $\pm$ 58.82	207.11 $\pm$ 38.20
t值		6.101	4.328
P值		<0.001	<0.001

### 2.2 血清HE4、CXCL9水平诊断价值

ROC曲线分析显示,血清HE4、CXCL9联合诊断AUC为0.773,大于HE4(0.670)、CXCL9(0.613),当HE4截断值 $>160.07$  U/mL、CXCL9截

断值 $>218.93$  pg/mL,敏感度为76.83%,特异度为76.25%。见表2。

### 2.3 不同预后患者一般资料

治疗随访1年,无脱落病例,共发生复合肾脏终点事件15例,包括2例全因死亡、8例终末期肾病、5例肾小球滤过率(eGFR)下降 $\geq 50\%$ 。预后良好者年龄、性别、病程与预后不良者相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );预后良好者SLE疾病活动指数(SLEDAI)评分低于预后不良者( $P < 0.05$ ),见表3。

表3 不同预后患者一般资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of General information of patients with different prognosis ( $\bar{x} \pm s$ )

资料	预后良好者 (n=67)	预后不良者 (n=15)	t/ $\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)	35.14 $\pm$ 7.06	36.09 $\pm$ 6.57	0.477	0.635
病程(年)	1.60 $\pm$ 0.49	1.74 $\pm$ 0.61	0.955	0.342
性别(男/女)	10/57	2/13	0.061	0.805
SLEDAI评分(分)	12.80 $\pm$ 2.33	17.16 $\pm$ 2.51	6.461	<0.001

### 2.4 不同预后患者入院时、治疗6个月后血清HE4、CXCL9水平

两者入院时血清HE4、CXCL9水平无明显差异( $P > 0.05$ );预后不良者治疗6个月后血清HE4、CXCL9水平高于预后良好者( $P < 0.05$ ),见表4。

表2 ROC分析结果

Table 2 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z统计	P值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)
HE4	0.670	0.588~0.753	4.044	<0.001	$>162.08$ U/mL	45.12	81.25
CXCL9	0.613	0.526~0.700	2.559	0.011	$>221.07$ pg/mL	75.61	43.75
两者联合	0.773	0.697~0.848	7.092	<0.001	HE4 $>160.07$ U/mL、CXCL9 $>218.93$ pg/mL	76.83	76.25

表4 不同预后患者入院时、治疗6个月后血清HE4、CXCL9水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Serum HE4 and CXCL9 levels at admission to patients with different prognosis at 6 months after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HE4(U/mL)		CXCL9(pg/mL)	
		入院时	治疗6个月后	入院时	治疗6个月后
预后不良者组	15	193.39 $\pm$ 35.49	137.58 $\pm$ 27.25	247.73 $\pm$ 38.84	201.85 $\pm$ 33.51
预后良好者组	67	182.32 $\pm$ 31.26	116.19 $\pm$ 24.17	231.49 $\pm$ 34.77	174.31 $\pm$ 28.26
t值		1.210	3.027	1.601	3.297
P值		0.230	<0.05	0.113	<0.05

## 2.5 LN 预后影响因素分析

以是否发生预后不良事件作为因变量(未发生预后不良事件赋值为0,发生预后不良事件赋值为1),将 SLEDAI 评分、血清 HE4、CXCL9 水平作为自变量,纳入 Logistic 多因素回归分析模型,结果显示,SLEDAI 评分、血清 HE4、CXCL9 水平是 LN 预后的重要影响因素( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 5 LN 预后影响因素分析  
Table 5 Analysis of factors affecting LN prognosis

变量	$\beta$ 值	S.E. 值	Wald/ $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI	P 值
SLEDAI 评分	1.037	0.425	5.949	2.820	1.558~5.103	0.001
血清 HE4	0.249	0.131	3.620	1.283	1.020~1.614	0.001
血清 CXCL9	0.761	0.308	6.109	2.141	1.319~3.475	0.001

## 2.6 血清 HE4、CXCL9 水平对预后不良的预测价值

ROC 曲线分析显示,治疗 6 个月后 CXCL9 预测预后不良 AUC 为 0.670,大于 HE4(0.667),当截断值  $> 191.88$  时,敏感度为 60.00%,特异度为 76.12%。图 1。

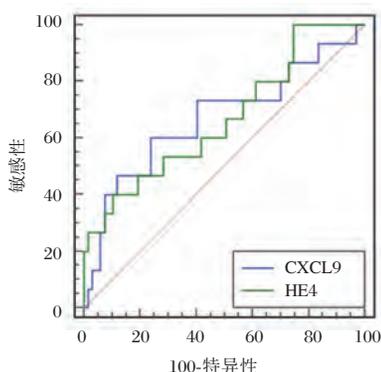


图 1 血清 HE4、CXCL9 预测预后不良 ROC 曲线

Figure 1 Serum HE4, CXCL9 predict prognosis ROC curve

## 3 讨论

据相关资料数据统计显示,与无肾脏累及的 SLE 患者相比,LN 患者死亡率高 2.23 倍,一旦发生终末期肾病,则将死亡风险升高至 9.2 倍,防治形势极为严峻<sup>[7]</sup>。目前,肾组织活检是临床诊断 LN 金标准,对治疗及预后判断均具有较高应用价值,但其属于有创检查方式,操作可重复性差,加之采取肾组织标本有限,无法全面反映肾组织病理改变<sup>[8]</sup>。因此,寻找易获取、非侵入性且灵敏的生物学标志物成为临床重要研究方向。

HE4 属于新型肿瘤标志物,主要表达于近端气管上皮、生殖道、肾脏远曲小管、结肠黏膜、乳腺上皮,在正常人体内表达较低<sup>[9-10]</sup>。既往临床研究多侧重 HE4 与卵巢癌、子宫内膜癌、肺癌等恶性肿瘤发生之间关系分析,证实其与多种恶性病变密切相关<sup>[11-12]</sup>。近年来,HE4 在肾功能损伤方面的相关机制成为国内外研究热点。桑国耀等<sup>[13]</sup>报道发现,血清 HE4 在慢性肾脏疾病中具有较高辅助诊断价值,其表达水平与病情严重程度呈正相关,有利于准确判断疾病分期,提示血清 HE4 可能参与肾脏组织病理改变过程。本研结果显示说明血清 HE4 在 LN 中呈异常高表达趋势,且与预后情况密切相关。同时,李红卫等<sup>[14]</sup>研究在 SLE 患者预后和风险评估中进行多项指标检测,证实血清 HE4 在其诊疗及预后中具有重要意义。

临床普遍认为,LN 病理进展的主要机制是免疫复合物形成、沉积于肾小球,导致肾组织细胞产生大量细胞因子,造成免疫细胞功能异常<sup>[15]</sup>。文献指出,CXCL9 属于 IFN- $\gamma$  诱导型 CXC 类趋化因子,是一种高效淋巴细胞趋化剂,与系统性、器官特异性自身免疫疾病发病机制密切相关<sup>[16]</sup>。CXCL9 与受体结合后,可激活 CD4 阳性的 T 细胞、杀伤细胞、巨噬细胞,促使其移动、积聚,最终形成免疫性炎症反应<sup>[17]</sup>。而 LN 患者系膜增生程度异常升高、T 淋巴细胞显著增加被认为与 CXCL9 表达在病发生后持续升高密切相关<sup>[18]</sup>。本研究还发现,治疗 6 个月后,LN 患者血清 CXCL9 明显下降,预后良好者下降幅度较为明显,且 Logistic 回归分析显示,血清 CXCL9 水平是 LN 预后的重要影响因素。提示较高血清 CXCL9 水平会影响预后,临床应予以重视,及早给予针对性治疗措施。

本研究结果说明临床针对 LN 患者可通过检测血清 HE4、CXCL9 水平辅助疾病诊断,并于治疗期间监测两者血清水平变化预测预后结局,有利于及时调整治疗方案,积极改善预后情况。

综上所述,血清 HE4、CXCL9 在 LN 中呈高表达状态,联合检测具有良好诊断价值,是预后的重要影响因素,可作为预后不良的预测因子。

## 参考文献

- [1] 董雅倩,卢宛媛,唐澜,等. 狼疮性肾炎发病机制、生物标志物及治疗现状研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(10): 33-37.
- [2] 冯韵霖,牟俊杰,张萍,等. 不同分型狼疮性肾炎的潜在临床预测指标[J]. 西部医学, 2018, 30(2): 234-237.

- [3] Wang Z, Wang Y, Zhu R, et al. Long-Term Survival and Death Causes of Systemic Lupus Erythematosus in China [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(17):e794.
- [4] 王倩,刘伟,卢葳,等. 系统性红斑狼疮患者血清中趋化因子 CXCL9, CXCL10 及 CXCL11 的检测[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2015, 29(2):125-128.
- [5] 李安平,刘洪梅,李婵,等. 血清 ProGRP 和 HE4 在慢性肾脏病患者中的临床意义[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(10):50-52.
- [6] Hahn BH, Mcmahon MA, Wilkinson A, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(6):797-808.
- [7] Mok CC, Kwok RC, Yip PS. Effect of renal disease on the standardized mortality ratio and life expectancy of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8):2154-2160.
- [8] 徐黎明,沈军. 血清瘦素和脂联素联合检测在狼疮性肾炎诊断中的价值[J]. *检验医学*, 2019, 34(5):401-404.
- [9] 李玮珊,王丹波. 肿瘤标志物 HE4 在卵巢癌中的应用研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(6):196-199.
- [10] 单峰,乔海风,刘曼华,等. T-型钙离子通道、CA125 及 HE4 在上皮性卵巢癌中检测探讨[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(3):119-121.
- [11] 沈红良,李娜. 肺癌患者血清 HE4、CEA、NSE 水平变化及临床诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(1):109-112.
- [12] Dong C, Liu P, Li C. Value of HE4 Combined with Cancer Antigen 125 in the Diagnosis of Endometrial Cancer [J]. *Pakistan J Med Sci*, 2017, 33(4):1013-1017.
- [13] 桑国耀,胡金伟,张朝霞. 血清 HE4 在慢性肾脏疾病分期中的诊断价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(1):45-48.
- [14] 李红卫,曹建霞,陈丽. 多项检测在系统性红斑狼疮患者预后和风险评估中的作用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(11):78-80.
- [15] 赵韶静,曾艳,李正东. 狼疮性肾炎患者 IL-15 表达情况及免疫病理损伤特点[J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(5):439-443.
- [16] Kuo P, Tuong Z K, Teoh S M, et al. HPV16E7 Induced Hyperplasia Promotes CXCL9/10 Expression and Induces CXCR3<sup>+</sup> T cell Migration to Skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(6):1348-1359.
- [17] Tajfirouz D, West DM, Yin XT, et al. CXCL9 compensates for the absence of CXCL10 during recurrent Herpetic stromal keratitis [J]. *Virology*, 2017, 63(506):7-13.
- [18] 林秋萍. 趋化因子 CXCL9/10/11 在人肾小球系膜细胞上的表达及在狼疮肾炎诊断中的意义[D]. 福建中医药大学, 2016.

(上接第 472 页)

- drome in Children and Adults [J]. *Crit care med*, 2020, 48(3):428-430.
- [2] 唐甜,谭利平. 炎症反应在脓毒症 ARDS 发病机制中的作用[J]. *重庆医学*, 2017, 46(15):2146-2149.
- [3] Li H, Wang D, Wei W, et al. The Predictive Value of Coefficient of PCT × BG for Anastomotic Leak in Esophageal Carcinoma Patients With ARDS After Esophagectomy [J]. *J intensive care med*, 2019, 34(7):572-577.
- [4] 唐玉珍,魏继红,张国虎. 有创与无创机械通气对高龄急性呼吸窘迫综合征患者血气分析、血浆脑钠肽及 C 反应蛋白水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(9):2464-2465.
- [5] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. *JAMA*, 2012, 307(23):2526-2533.
- [6] Bein T, Weber-Carstens S, Apfelbacher C, et al. The quality of acute intensive care and the incidence of critical events have an impact on health-related quality of life in survivors of the acute respiratory distress syndrome - a nationwide prospective multicenter observational study [J]. *German medical science*, 2020, 8(1):277.
- [7] Chambers ED, White A, Vang A, et al. Blockade of equilibrative nucleoside transporter 1/2 protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury and NLRP3 inflammasome activation [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1):1516-1531.
- [8] 李依,邓磊. 早期使用肝素对急性呼吸窘迫综合征患者预后相关指标的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(06):783-786.
- [9] 郭献阳,张明,魏大臻,等. 辛伐他汀对中重度急性呼吸窘迫综合征患者炎症反应及凝血功能的影响[J]. *中国全科医学*, 2015, 18(16):1931-1935.
- [10] 沈红卫,胡佳元. 乌司他丁联合盐酸氨溴索对老年急性成人呼吸窘迫综合征患者血清 PCT、sTM、TNF- $\alpha$  水平及氧化应激的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(5):984-986.
- [11] 曾广志,唐召力,陈海玉. 血液净化联合抗菌药物对 ARDS 合并肺部感染患者 EVLWI 及 PCT 的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(2):189-193.
- [12] 李舟文. NT-proBNP 在小儿病毒性心肌炎诊断和心功能评估中的应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2016, 8(3):178-181.
- [13] 刘映霞,陈培锦. 肺保护通气对急性呼吸窘迫综合征患者的疗效及对右心功能的影响[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(4):560-565.
- [14] 林化,倪琦,李超乾. 早期联合监测血管外肺水指数、肺血管通透性指数及血清氨基末端脑钠肽前体评估急性呼吸窘迫综合征患者预后的价值[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(11):1813-1815.
- [15] 王敏. Pro-BNP 与儿童急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的相关性研究[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(7):643-645.

## 宫颈磷癌组织中 Survivin 的表达及其与患者临床病理特征的关系

额尔德木图 贾玉玲\* 秦晓玲 牛丽蓉 宝莹娜 郁志龙

**[摘要]** **目的** 探讨宫颈磷癌组织中凋亡抑制因子(Survivin)的表达及其与患者临床病理特征的关系。**方法** 收集2012年8月至2019年8月在本科治疗的200例宫颈磷癌患者的癌组织标本,同时取经病理检查证实为正常宫颈组织的200例癌旁组织作为对照。另选取同期在我院经宫颈肿瘤切除术后病理学诊断确诊的宫颈鳞状上皮内病变的50例患者的病理组织。采用免疫组织化学染色法检测宫颈磷癌组织、癌旁组织及宫颈鳞状上皮内病变组织中 Survivin 蛋白的表达,采用 PCR 法检测各组织中 Survivin mRNA 的表达,并分析宫颈磷癌组织中 Survivin 表达与患者临床病理特征的关系。**结果** 免疫组织化学结果显示, Survivin 在癌组织中主要定位于细胞质或和细胞核,呈弱阳性至强阳性表达,且 Survivin 在细胞核的表达变化随分期增加而表达增强,宫颈磷癌组织中 Survivin 总阳性率(100.00%)显著高于癌旁组织(0.00%)和宫颈鳞状上皮内病变组织(0.00%),差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。RT-PCR 检测结果显示, Survivin mRNA 在宫颈磷癌组织中的相对表达量明显高于癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ ), Survivin mRNA 癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织组织中的表达相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。不同 FIGO 分期、组织分级、浸润深度及有无淋巴结转移的宫颈磷癌患者组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达情况存在明显差异( $P<0.05$ ),但不同年龄的宫颈磷癌患者组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达情况无明显差异( $P>0.05$ )。**结论** 宫颈磷癌组织中 Survivin 的表达明显增加,且与宫颈磷癌的临床分期、恶性程度及侵袭转移有关。

**[关键词]** 宫颈磷癌; Survivin; 临床病理特征

### The expression of Survivin in cervical phosphorous carcinoma and its relationship with clinicopathological features

Eerdemutu JIA Yuling\*, QIN Xiaoling, NIU Li rong, BAO Ying na, YU Zhilong

(Department of radiotherapy, affiliated hospital of Inner Mongolia medical university, Hohhot, Mongolia, China, 010050)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression of Survivin and its relationship with clinicopathological features of cervical phosphorous carcinoma. **Methods** From August 2012 to August 2019, 200 cases of cancer tissue samples from cervical phosphorus cancer patients were collected, and 200 cases of paracancerous tissues confirmed by pathological examination as normal cervical tissues were taken as controls. In addition, 50 cases of cervical squamous intraepithelial lesions confirmed by pathology after cervical tumor resection were selected. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of survivin protein in cervical squamous cell carcinoma tissues, paracancerous tissues and cervical squamous intraepithelial lesion. The expression of survivin mRNA in each tissue was detected by PCR. The relationship between the expression of Survivin and the clinicopathological features of cervical phosphorous carcinoma was

基金项目:内蒙古自治区应用技术研究项目(20130403)

作者单位:内蒙古医科大学附属医院放疗科,内蒙古,呼和浩特 010050

\*通信作者:贾玉玲, E-mail: iyjbb299278@163.com

analyzed. **Results** Immunohistochemical results show that survivin is mainly located in the cytoplasm or nucleus in cancer tissues, and it is weakly positive to strong positive expression. The expression of survivin in the nucleus is increased with the stage. The total positive rate of survivin (100.00%) in cervical phosphorous carcinoma tissue was significantly higher than that in paracancerous tissues (0.00%) and cervical squamous intraepithelial lesion tissue (0.00%), the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). RT-PCR test results showed that the relative expression of survivin mRNA in cervical phosphorous carcinoma was significantly higher than that in adjacent tissues and cervical squamous intraepithelial lesions ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the expression of survivin mRNA between adjacent tissues and cervical squamous intraepithelial lesions ( $P>0.05$ ). There were significant differences in the expression of survivin protein and mRNA in cervical cancer tissues with different FIGO stages, tissue grades, invasion depth and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference in the expression of survivin protein and mRNA in cervical cancer tissues of different ages ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Survivin expression in cervical phosphocarcinoma tissue is significantly increased, and it is related to the clinical stage, malignant degree and invasion and metastasis of cervical phosphorous carcinoma.

[KEY WORDS] Cervical cancer; Survivin; Clinicopathological features

宫颈癌是严重威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,约占女性生殖器官恶性肿瘤的50%以上,其中宫颈鳞癌约占宫颈癌的75%~80%左右<sup>[1]</sup>。近年来的流行病学调查研究显示,我国宫颈癌患者的发病率呈逐年增加和年轻化趋势<sup>[2]</sup>,因此,临床对宫颈癌发生及发展过程中相关生物学指标变化的关注度也在不断提高。Survivin是凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员之一,具有抗凋亡、促进细胞增殖及促进血管新生等重要作用<sup>[3-4]</sup>。近年来有许多研究显示, Survivin在人类胃癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>、肺癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>等实体瘤肿瘤组织中表达增加。然而,目前有关Survivin在宫颈癌组织中的表达及其与宫颈癌增殖、侵袭、转移的确切关系尚不明确,因此,本研究旨在进一步分析宫颈鳞癌组织中Survivin的表达及其与患者临床病理特征的关系,以期为未来宫颈鳞癌的靶向治疗提供一定的参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2012年8月至2019年8月在本院收治的宫颈鳞癌患者200例,纳入标准:经临床首次确诊并通过病理学验证证实为宫颈鳞癌<sup>[9]</sup>,各项功能性指标符合研究标准,行为状态评分(Karnofsky Performance Status, KPS)70分以上,具有明确的可测量病灶者,患者及其家属同意并签署知情同意书。排除标准:对化疗药物不耐受者,肝、肾功能

存在异常者,病情严重,预计生存期<5个月者。患者的平均年龄( $54.52\pm 4.23$ )岁,分期按照国际妇产科协会(Federation International of Gynecology and Obstetr, FIGO)分期标准<sup>[10]</sup>: I b~II a期13例、II b期128例、III期22例、IV期6例,有淋巴结转移31例。宫颈鳞癌组织标本为200例患者在本院病理科库存蜡块,同时取经病理检查证实为正常宫颈组织的200例癌旁组织库存蜡块作为对照。另选取同期在本院经宫颈肿瘤切除术后病理学诊断确诊的宫颈鳞状上皮内病变的50例患者的组织标本作为对照。所有患者及家属均签署知情同意书。

### 1.2 免疫组织化学染色法检测各组织中Survivin蛋白的表达

应用免疫组织化学染色法检测宫颈鳞癌组织、癌旁组织及宫颈鳞状上皮内病变组织中Survivin蛋白的表达,将厚度为4  $\mu\text{m}$ 的石蜡切片经常规脱蜡及水化后,加入3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液灭活20 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,再加入柠檬酸盐缓冲液加热至100 $^{\circ}\text{C}$ ,维持20 min左右,以进行抗原修复。将冷却后的切片严格按照SP组织化学试剂盒(陕西信康电子科技有限公司)说明书要求进行操作。

### 1.3 免疫组织化学染色结果判定

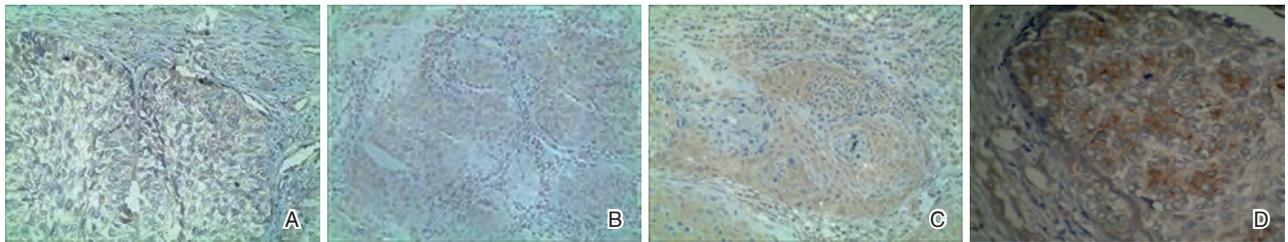
免疫组织化学片由3位主治以上的病理诊断医生盲审。阳性结果判定标准<sup>[11]</sup>:以细胞质及细胞核中出现颗粒状或弥漫性棕黄色至棕褐色染色为阳性细胞,否则视为阴性细胞。

#### 1.4 采用 RT-PCR 法检测各组织中 Survivin mRNA 的表达

超声匀浆各组织样本,按 TRIzol 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)说明书提取组织总 RNA,再逆转录为 cDNA。按照 PCR 试剂盒(广州锐博生物科技有限公司)操作说明书进行。以 GAPDH 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值法分析扩增结果。

#### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.00 处理数据,计数资料以  $n$  表示,采用秩和检验,计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用  $t$  检验或单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。



注:(A)癌旁组织阴性-;(B)宫颈癌组织弱阳性+;(C)宫颈癌组织中度阳性++(D)宫颈癌组织强阳性+++

图1 Survivin 在不同组织中的表达(免疫组织化学染色,×40)

Figure 1 The expression of Survivin in different tissues (免疫组织化学染色,×40)

#### 2.2 Survivin mRNA 在不同组织中的表达

RT-PCR 检测结果显示, Survivin mRNA 在宫颈鳞癌组织( $4.46 \pm 0.97$ )中的相对表达量明显高于癌旁组织( $1.17 \pm 0.42$ )和宫颈鳞状上皮内病变组织( $1.29 \pm 0.51$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), Survivin mRNA 癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织中的表达相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

#### 2.3 宫颈癌组织中 Survivin 的表达与患者临床病理特征的关系

根据宫颈癌患者的年龄、FIGO 分期、组织分级、浸润深度、有无淋巴结转移分为不同亚组,比较各亚组组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达的差异性,结果显示,不同 FIGO 分期、组织分级、浸润深度及有无淋巴结转移的宫颈癌患者组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达情况存在明显差异( $P < 0.05$ ),但不同年龄的宫颈癌患者并无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 3 讨论

宫颈癌是妇科临床常见的恶性肿瘤之一,多发于中年女性,严重威胁女性的健康<sup>[12]</sup>。目前已

## 2 结果

#### 2.1 Survivin 蛋白在不同组织中的表达

免疫组织化学结果显示, Survivin 在癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织中均不表达,总阳性率均为 0.00%, Survivin 在癌组织中主要定位于细胞质或和细胞核,呈弱阳性至强阳性表达,且 Survivin 在细胞核的表达变化随分期增加而表达增强;宫颈鳞癌组织中 Survivin 总阳性率显著高于癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

知 HPV 病毒是导致宫颈癌的病因,故宫颈癌成为人类第一个可通过注射疫苗、筛查等手段预防及早期发现的恶性肿瘤<sup>[13]</sup>。然而,宫颈癌易在发现早期也出现侵袭及转移,而影响患者的远期预后<sup>[14]</sup>,因此,解析宫颈癌发生及发展过程中关键生物学指标的变化情况,对于提高宫颈癌患者的预后极为重要。

宫颈癌的发生、侵袭、转移机制复杂,与多种癌基因、抑癌基因的激活、失活调控及细胞凋亡异常有关<sup>[15-16]</sup>。Survivin 是目前发现的抑制凋亡作用最强的抗凋亡因子,其可直接作用于凋亡途径的终末效应酶,而发挥抗凋亡作用<sup>[17]</sup>。此外, Survivin 还具有肿瘤异质性,可促进肿瘤细胞的异常增殖分化、参与肿瘤细胞的分裂及血管新生等多种复杂作用<sup>[18-19]</sup>。近年来大量的文献报道, Survivin 在多种肿瘤组织中表达增加<sup>[20-21]</sup>。然而,目前有关 Survivin 在宫颈癌组织中的表达及其与宫颈癌增殖、侵袭、转移的确切关系尚不明确。在本研究中,免疫组织化学结果显示, Survivin 在癌组织中主要定位于细胞质或和细胞核,呈弱阳性至强阳性表达,且 Survivin 在细胞核的表达变化随分

表1 宫颈癌组织中 Survivin 的表达与患者临床病理特征的关系 [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

Table 1 The relationship between the expression of Survivin and clinicopathological characteristics of cervical cancer [n(%), ( $\bar{x} \pm s$ )]

项目	Survivin 蛋白表达			Z 值	P 值	Survivin mRNA 表达	t/F 值	P 值
	+	++	+++					
	(n=53)	(n=61)	(n=86)					
年龄(岁)				1.531	0.317		0.575	0.472
≤60(n=137)	31(22.63)	44(32.12)	62(45.26)			4.39±0.75		
>60(n=63)	22(34.92)	17(26.98)	24(38.10)			4.52±0.63		
FIGO 分期(无淋巴结转移)				15.836	0.000		11.209	0.000
I b~ II a 期(n=13)	7(53.85)	5(38.46)	1(7.69)			1.72±0.41		
II b 期(n=128)	37(28.91)	40(31.25)	51(39.84)			2.19±0.32		
III 期(n=22)	3(13.63)	5(22.72)	14(63.64)			5.18±0.46		
IV 期(n=6)	1(16.67)	1(16.67)	4(66.67)			5.76±0.54		
淋巴结转移				8.536	0.000		7.530	0.000
有(n=31)	3(9.68)	6(19.35)	22(70.97)			5.37±0.63		
无(n=169)	50(29.59)	55(32.54)	64(37.87)			3.85±0.76		
组织分级				7.622	0.000		5.268	0.000
低分化(n=72)	4(5.56)	29(40.28)	39(54.17)			4.94±0.75		
中高分化(n=128)	49(38.28)	32(25.00)	47(36.72)			3.93±0.82		
浸润深度				10.709	0.000		6.315	0.000
<1/2(n=134)	49(36.57)	41(30.60)	44(32.84)			5.19±0.81		
≥1/2(n=66)	4(6.06)	20(30.30)	42(63.64)			3.39±0.66		

期增加而表达增强,宫颈鳞癌组织中 Survivin 总阳性率明显高于癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织,而且,RT-PCR 检测结果显示, Survivin mRNA 在宫颈鳞癌组织中的相对表达量明显高于癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织, Survivin mRNA 癌旁组织和宫颈鳞状上皮内病变组织组织中的表达相比,差异具有统计学意义( $P>0.05$ ),表明宫颈鳞癌组织中 Survivin 的表达明显增加。李桂湖等人<sup>[22]</sup>研究发现, Survivin 在宫颈鳞癌组织中的表达明显高于宫颈上皮内瘤变组织及慢性宫颈炎组织,这一结果支持本研究结果。

为了进一步研究 Survivin 表达与宫颈癌进展的关系,本研究根据宫颈癌患者的年龄、FIGO 分期、组织分级、浸润深度、有无淋巴结转移分为不同亚组,比较了各亚组组织中 Survivin 表达的差异性,结果显示,不同 FIGO 分期、组织分级、浸润深度及有无淋巴结转移的宫颈癌患者组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达情况存在明显差异,但不同年龄的宫颈癌患者组织中 Survivin 蛋白及 mRNA 表达情况无明显差异,表明宫颈鳞癌组织中 Survivin 的表达增加,使得肿瘤细胞的增殖异常,有助于肿瘤细胞向周围组织及淋巴结侵袭转移。

贾利刚等人<sup>[23]</sup>的研究显示,宫颈癌组织中 Survivin 的表达与临床分期及浸润深度有关,这与本研究结果相一致。我们推测宫颈癌组织中 Survivin 表达水平越高,则肿瘤细胞越易发生侵袭及转移,患者的预后可能越差。

综上所述,宫颈鳞癌组织中 Survivin 的表达明显增加,且与宫颈鳞癌的临床分期、恶性程度及侵袭转移有关,本研究结果有助于宫颈鳞癌的预后判断。在后续的研究中,本研究将收集更多的病例,以进一步探讨 Survivin 表达与宫颈鳞癌患者预后的关系,以期对宫颈鳞癌的精准治疗提供一定的参考依据。

### 参考文献

[1] Arrossi S, Temin S, Garland S, et al. Primary Prevention of Cervical Cancer: American Society of Clinical Oncology Resource-Stratified Guideline [J]. J Oncol Pract, 2017, 13(7): 452-457.

[2] 谢珊珊, 任鹏. 宫颈癌发病年轻化的趋势分析与相应对策 [J]. 中医药管理杂志, 2018, 9(5): 10-12.

[3] Khan Z, Khan A A, Yadav H, et al. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma [J]. Cell Mol Biol Lett, 2017, 22(1): 8.

- [4] Zumbärgel F K, Machtens D A, Curth U, et al. Survivin does not influence the anti-apoptotic action of XIAP on caspase-9[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 530-535.
- [5] Guo L, Huang C, Ji Q J. Aberrant promoter hypermethylation of p16, survivin, and retinoblastoma in gastric cancer [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(3): 164-168.
- [6] 蔡建平, 王亚东, 张晓, 等. p16 和 survivin 在肝癌中的表达及其临床意义研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(10): 778-780.
- [7] 黄妙灵, 蔡兴东, 黄志宏, 等. VEGF 和 Survivin 在肺腺癌中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2018, 39(12): 54-59.
- [8] 盛文文. 凋亡抑制因子 Livin 和 Survivin 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *泰山医学院学报*, 2018, 39(9): 31-33.
- [9] 曲首辉, 鲍志敏, 刘荣欣. TCT、活检病理在宫颈上皮瘤变及早期宫颈癌诊断中的价值分析[J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(4): 360-362.
- [10] 李静, 索红燕, 孔为民. 《国际妇产科联盟(FIGO)2018 癌症报告: 宫颈癌新分期及诊治指南》解读[J]. *中国临床医生杂志*, 2019, 47(6): 20-23.
- [11] 邓敏端, 李建平, 区海, 等. 宫颈癌前病变与宫颈鳞癌组织中 Foxp3 的表达及临床意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2011, 12(5): 338-341.
- [12] Cancer Genome Atlas Research Network, Albert Einstein College of Medicine, Analytical Biological Services. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 378-384.
- [13] Jeftic B, Papicbradovic M, Muncan J, et al. Optomagnetic Imaging Spectroscopy Application in Cervical Dysplasia and Cancer Detection: Comparison of Stained and Unstained Papanicolaou Smears [J]. *J Med Biol Eng*, 2017, 37(Suppl 6): 1-8.
- [14] Huang BX, Fang F. Progress in the Study of Lymph Node Metastasis in Early-stage Cervical Cancer [J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(4): 567-574.
- [15] Chen, Xiaoli, Chen, et al. Tumor Size at Magnetic Resonance Imaging Association With Lymph Node Metastasis and Lymphovascular Space Invasion in Resectable Cervical Cancer: A Multicenter Evaluation of Surgical Specimens [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(8): 1.
- [16] 张迪, 李晓兰. 肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体及其受体与宫颈癌的关系[J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 16(3): 245-248.
- [17] Hay K, Bialik S, Levin S, et al. Changes in cIAP2, survivin and BimEL expression characterize the switch from autophagy to apoptosis in prolonged starvation [J]. *J Int Med*, 2017, 281(5): 458-470.
- [18] Li S, Yang Y, Ding Y, et al. Impacts of survivin and caspase-3 on apoptosis and angiogenesis in oral cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3774-3779.
- [19] Braný D, Dvorská D, Slávik P, et al. Survivin and gynaecological tumours [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(4): 295-300.
- [20] Aaa A, Najafzadeh M, Davies JD, et al. Inhibition of survivin expression after using oxaliplatin and vinflunine to induce cytogenetic damage in vitro in lymphocytes from colon cancer patients and healthy individuals [J]. *Mutagenesis*, 2017, 32(5): 517-524.
- [21] 李月, 贾本智, 刘飒. ERCC1 和 Survivin 对非小细胞肺癌患者化疗效果的预测价值[J]. *热带医学杂志*, 2019, 12(3): 172-177.
- [22] 李桂湖. Survivin、p53 在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌组织中的表达及意义[J]. *中国生育健康杂志*, 2017, 28(3): 280-285.
- [23] 贾利刚, 褚兆苹, 田菲, 等. XIAP、cyclin D1 及 survivin 在宫颈癌组织中的表达及意义[J]. *癌症进展*, 2018, 16(10): 93-95+114.

(上接第 463 页)

- [10] Mihai M C, Popa M A, Suica V I, et al. Mechanism of 17 $\beta$ -estradiol stimulated integration of human mesenchymal stem cells in heart tissue [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 115-124.
- [11] Abo-Aziza F, Zaki A A, Amer A S, et al. Dihydrotestosterone and 17 $\beta$ -Estradiol Enhancement of in vitro Osteogenic Differentiation of Castrated Male Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (rBMMSCs) [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2019, 13(4): 208-219.
- [12] Liu G, Lu Y, Mai Z, et al. Suppressing MicroRNA-30b by Estrogen Promotes Osteogenesis in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 7547506.
- [13] Song N, Wang Z M, He L J, et al. Estradiol-enhanced osteogenesis of rat bone marrow stromal cells is associated with the JNK pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8589-8594.
- [14] Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt Signaling in Hematological Malignancies [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 153: 321-341.
- [15] Davoodian N, Lotfi AS, Soleimani M, Mowh SJ. MicroRNA-122 overexpression promotes hepatic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells [J]. *Cell Biochem*, 2014, 115(9): 1582-1593.
- [16] Chen H, Sun Y, Dong R, et al. Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation [J]. *plos One*, 2011, 6(5): e20238.

## 退行性心脏瓣膜病患者血清LP(a)、OPN、IRF-4表达及其临床意义

王俊华\* 崔勤涛 韩培立 刘晓晨

**[摘要]** 目的 探讨退行性心脏瓣膜病(DHVD)患者血清脂蛋白(a)[LP(a)]、骨桥蛋白(OPN)、干扰素调节因子-4(IRF-4)表达及其临床意义。方法 选取本院120例DHVD患者作为研究组,同期健康体检者115例作为对照组。比较两组血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA水平,分析DHVD发病的影响因素及血清各指标诊断DHVD的价值,并比较治疗3个月后不同疗效患者血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA水平及心功能指标[左心室射血分数(LVEF)、心脏指数(CI)]水平,分析各血清各指标与心功能指标相关性。结果 多瓣膜病变患者组、单瓣膜病变患者组及健康体检者血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA水平比较( $F=47.427, 66.514, 36.432$ ),差异有统计学意义( $P<0.05$ );冠心病、吸烟史、高血压、血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA是DHVD发病的重要影响因素( $P<0.05$ );血清各指标中,LP(a)诊断DHVD的曲线下面积(AUC)最大,为0.802,截断值敏感度为70.00%,特异度为86.09%;治疗3个月后,显效者血清LP(a)、OPN水平低于有效者、无效者,IRF-4 mRNA水平及LVEF、CI高于有效者、无效者( $P<0.05$ );血清LP(a)、OPN与LVEF、CI存在显著负相关关系,IRF-4 mRNA与LVEF、CI存在显著正相关关系,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 DHVD患者血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA表达异常,是DHVD发生的重要影响因素,在DHVD诊断及评估疗效方面具有较高应用价值。

**[关键词]** 退行性心脏瓣膜病;脂蛋白(a);骨桥蛋白;干扰素调节因子-4;心功能;诊断

### Expressions and clinical significance of serum LP(a), OPN, IRF-4 in patients with degenerative heart valve disease

WANG Junhua\*, CUI Qintao, HAN Peili, LIU Xiaochen

(Department of cardiovascular surgery, The First affiliated hospital of xinxiang medical college, Weihui Henan, China, 453100)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the expression of serum lipoprotein (a) [LP(a)], osteopontin (OPN), interferon regulatory factor-4 (IRF-4) in patients with degenerative heart valve disease (DHVD) and its clinical significance. Methods 120 patients with DHVD in our hospital were selected as the study group, and 115 healthy people who were examined during the same period were used as the control group. The serum LP(a), OPN, IRF-4 mRNA levels were compared between the two groups. The influencing factors of the incidence of DHVD and the diagnostic value of serum indicators for DHVD were analyzed. The levels of serum LP(a), OPN, IRF-4 mRNA and cardiac function indexes [left ventricular ejection fraction (LVEF), cardiac index (CI)] of patients with different therapeutic effects after 3 months of treatment were compared. The correlation between serum indexes and cardiac function indexes was evaluated. Results The serum LP(a), OPN, IRF-4 mRNA levels have significant difference in the patients with multi-valvular disease and with single-valvular disease, and healthy people ( $F=47.427, 66.514, 36.432$ ), ( $P<0.05$ ). Coronary heart disease, smoking

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(17A320017)

作者单位:新乡医学院第一附属医院心血管外科,河南,卫辉 453100

\*通信作者:王俊华, E-mail:doctorjh1981@163.com

history, high blood pressure, serum LP (a), OPN, and IRF-4 mRNA are important influencing factors for the onset of DHVD ( $P<0.05$ ). Coronary heart disease, smoking history, hypertension, serum LP(a), OPN, IRF-4 mRNA are important influencing factors of DHVD ( $P<0.05$ ). Among the various serum indexes, the area under the curve (AUC) for diagnosis of DHVD by LP (a) is the largest, 0.802, the sensitivity of the cutoff value is 70.00%, and the specificity is 86.09%. After the treatment for 3 months, the serum LP(a) and OPN levels of the effective patients were lower than those of the effective and ineffective patients, and the IRF-4 mRNA levels and LVEF, CI were higher than those of the effective and ineffective ( $P<0.05$ ). The serum LP(a) and OPN had negative correlation with LVEF and CI. Interestingly, the IRF-4 mRNA had positive correlation with LVEF and CI ( $P<0.05$ ). Conclusion The abnormal expression of serum LP (a), OPN and IRF-4 mRNA in DHVD patients is an important influencing factor of DHVD, and has high application value in the diagnosis and evaluation of DHVD.

[KEY WORDS] Degenerative heart valve disease; Lipoprotein (a); Osteopontin; Interferon regulatory factor-4; Cardiac function; Diagnosis

退行性心脏瓣膜病(Degenerative heart valvular disease, DHVD)为临床多发性瓣膜病,是引起老年人心力衰竭、心律失常、晕厥和猝死的重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。目前,临床尚无缓解 DHVD 病情进展的特效方法,主要根据患者病情及心功能给予对症治疗<sup>[3]</sup>。因此,及时明确患者病情及其心功能变化,及时调整治疗方案,对改善治疗效果及预后具有重要影响<sup>[4-5]</sup>。近年来研究指出,脂蛋白(a) [Lipoprotein (a), LP(a)、骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、干扰素调节因子-4(Interferon regulatory factor-4, IRF-4)参与心血管疾病的发生发展,其异常表达具有促进疾病进展的作用<sup>[6-8]</sup>。基于此,本研究首次分析 DHVD 患者血清 LP(a)、OPN、IRF-4 的表达及临床意义,旨在为临床诊治 DHVD 提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2016 年 1 月至 2018 年 12 月 120 例 DHVD 患者作为研究组,另选取同期健康体检者 115 例作为对照组。两组在性别、年龄、体质量、空腹血糖、是否酗酒、病变情况的对比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

纳入标准:①研究组均符合 DHVD 诊断标准<sup>[9]</sup>;②认知功能良好;③无沟通交流障碍;④临床资料完整;⑤所有患者均已签署知情同意书。⑥本实验经本院伦理委员会审批通过。排除标准:①恶性肿瘤患者;②近 3 周内感染性疾病患者;③糖尿病患者;④血液系统疾病患者;⑤先天性心脏瓣膜畸形或发育异常者;⑥合并风湿性心

脏病等其他严重心脏疾病者;⑦有心脏手术史者;⑧传染性疾病患者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 指标检测方法

采集两组晨起空腹静脉血 5 mL,其中 3 mL 血液标本以 3 000 r/min 转速离心处理 10 min,取血清置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷藏室待检,采用免疫透射比浊法测定 LP(a)水平,采用酶联免疫吸附法测定 OPN 水平;2 mL 血液标本采用 Trizol 一步法提取总 RNA,以逆转录聚合酶链反应法检测 IRF-4 mRNA 水平。

#### 1.2.2 治疗方法

研究组均给予血管扩张剂、利尿剂、洋地黄等常规对症治疗,持续治疗 3 个月后评估疗效,评估标准<sup>[10]</sup>:显效:心力衰竭症状明显减轻,心动过速、心房颤动基本控制或偶有发生,心功能改善 1 级以上;有效:心力衰竭症状好转,心功能改善 1 级;无效:未达以上标准。120 例 DHVD 患者经常规对症治疗 3 个月后,显效 38 例,有效 60 例,无效 22 例。

#### 1.2.3 观察指标

①两组入组时血清 LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA 水平。②DHVD 发病的影响因素。③分析血清 LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA 诊断 DHVD 的价值。④不同疗效患者治疗前、治疗 3 个月后血清 LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA 水平。⑤不同疗效患者治疗前、治疗 3 个月后心功能指标,包括左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)、心脏指数(Cardiac index, CI)。⑥分析血清 LP(a)、OPN、IRF-4 与 LVEF、CI 相关性。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行分析,计数资料以  $n$  (%)表示,用  $\chi^2$  检验,计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,两组间采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,通过 Logistic 进行多因素回归分析,采用 Pearson 进行相关性分析,采用受试者工作(Receiver operating characteristic, ROC)曲线分析诊断价值,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料的比较

两组资料中性别、年龄、体质量空腹血糖酗酒等指标比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 两组一般资料比较  $(\bar{x} \pm s)$

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

项目	研究组 ( $n=120$ )	对照组 ( $n=115$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
性别(女/男)	51/69	47/68	0.064	0.800
年龄(岁)	64.29±5.84	63.17±5.91	1.461	0.145
体质量(kg)	63.76±7.85	65.19±7.59	1.419	0.157
空腹血糖(mmol/L)	4.51±0.49	4.42±0.45	1.465	0.144
酗酒(例)				
是	19(15.83)	15(13.04)	0.369	0.543
否	101(84.17)	100(86.96)		
病变情况(例)				
单瓣膜病变	57(47.50)	-		
多瓣膜病变	63(52.50)	-		

### 2.2 两组血清各指标水平

多瓣膜病变患者血清 LP(a)、OPN 较单瓣膜病变患者高,且均较对照组高,多瓣膜病变患者 *IRF-4* mRNA 水平较单瓣膜病变患者低,且均较对照组低( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 两组血清 LP(a)、OPN、*IRF-4* mRNA 水平比较  $(\bar{x} \pm s)$

Table 2 Comparison of LP (a), OPN and *IRF-4* mRNA levels between the 2 groups  $(\bar{x} \pm s)$

组别	$n$	LP(a) mg/dL	OPN ( $\mu$ g/L)	<i>IRF-4</i> mRNA
研究组				
多瓣膜病变患者	63	61.93±20.57	74.23±24.16	0.75±0.04
单瓣膜病变患者	57	54.51±18.11	50.49±16.05	0.79±0.05
对照组	115	38.17±12.65	42.28±14.07	0.85±0.10
$F$ 值		47.427	66.514	36.432
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 退行性心脏瓣膜病(Degenerative heart valvular disease, DHVD)发病的影响因素

以发生 DHVD 作为因变量,将血清 LP(a)、OPN、*IRF-4* mRNA 作为自变量纳入 Logistic 回归分析模型,结果显示,冠心病、吸烟史、高血压、血清 LP(a)、OPN、*IRF-4* mRNA 是 DHVD 发病的重要影响因素( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 DHVD 发病的影响因素

Table 3 influencing factors of DHVD

变量	$\beta$ 值	$S.E$ 值	Wald/ $\chi^2$	$P$ 值	OR 值	95%CI
冠心病	1.263	0.417	9.178	<0.001	3.537	2.046~6.115
吸烟史	0.899	0.320	7.899	<0.001	2.458	1.412~4.279
高血压	0.778	0.206	14.265	<0.001	2.177	1.183~4.007
LP(a)	1.105	0.458	5.823	0.009	3.020	1.746~5.223
OPN	1.248	0.431	8.380	<0.001	3.482	2.005~6.048
<i>IRF-4</i> mRNA	1.271	0.396	10.301	<0.001	3.564	2.149~5.912

### 2.4 血清各指标诊断 DHVD 的价值

ROC 曲线分析显示,血清 LP(a)诊断 DHVD 的 AUC 为 0.802,大于 OPN、*IRF-4* mRNA,当截断值  $> 52.57$  mg/dL 时,诊断敏感度为 70.00%,特异度为 86.09%。见表 4。

### 2.5 不同疗效患者血清各指标水平

治疗 3 个月后,显效者血清 LP(a)、OPN 水平较有效者、无效者低,*IRF-4* mRNA 水平较有效者、无效者高( $P < 0.05$ ),见表 5。

### 2.6 不同疗效患者心功能指标水平

治疗 3 个月后,显效者 LVEF、CI 较有效者、无效者高( $P < 0.05$ ),见表 6。

### 2.7 血清各指标与心功能相关性

Pearson 相关性分析可知,血清 LP(a)、OPN 与 LVEF、CI 呈负相关,*IRF-4* mRNA 与 LVEF、CI 呈正相关( $P < 0.05$ ),见图 1。

## 3 讨论

本研究发现,多瓣膜病变 DHVD 患者血清 LP(a)、OPN 水平异常升高,*IRF-4* mRNA 水平较低。LP(a)具有抑制纤维蛋白溶解的作用,可促进血栓形成,同时能促进炎症细胞对血管内皮的粘附作用,从而促进动脉粥样硬化及炎性心脏疾病的发生发展<sup>[11]</sup>。OPN 是一种具有多种功能的分泌型糖基化磷蛋白,参与炎症反应、血管重塑、组织钙化等过程,在 DHVD 患者体内,OPN 的钙化作用可能

表4 ROC分析结果  
Table 4 ROC analysis results

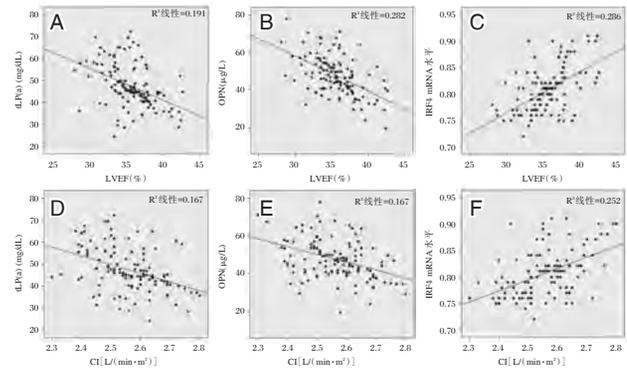
指标	AUC	95%CI	Z值	P值	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)
LP(a)	0.802	0.745-0.851	10.239	<0.001	>52.57 mg/dL	70.00	86.09
OPN	0.750	0.689-0.804	7.902	<0.001	>59.32 μg/L	57.50	83.48
IRF-4 mRNA	0.758	0.699-0.812	8.295	<0.001	≤0.82	76.67	65.22

表5 不同疗效患者血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of serum Lp (a), OPN and IRF-4 mRNA levels in patients with different therapeutic effects ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	n	治疗前	治疗3个月后
LP(a)(mg/dL)	显效者	38	56.91±16.22	42.10±7.05
	有效者	60	58.76±18.93	49.13±8.26
	无效者	22	60.05±20.01	54.39±11.87
	F值		0.226	15.220
	P值		0.798	<0.001
OPN(μg/L)	显效者	38	61.84±19.06	40.72±7.27
	有效者	60	63.27±20.85	48.01±8.15
	无效者	22	63.99±21.28	58.84±11.09
	F值		0.092	31.731
	P值		0.912	<0.001
IRF-4 mRNA	显效者	38	0.78±0.07	0.83±0.04
	有效者	60	0.77±0.06	0.80±0.03
	无效者	22	0.75±0.05	0.77±0.02
	F值		1.648	25.242
	P值		0.595	<0.001
LVEF(%)	显效者	38	30.24±3.18	38.40±3.14
	有效者	60	30.86±3.30	35.64±2.76
	无效者	22	31.01±3.74	33.29±2.28
	F值		0.522	24.542
	P值		0.595	<0.001
CI [L/(min·m <sup>2</sup> )]	显效者	38	2.43±0.15	2.65±0.12
	有效者	60	2.45±0.14	2.56±0.09
	无效者	22	2.46±0.16	2.48±0.06
	F值		0.347	22.922
	P值		0.708	<0.001

促进心脏瓣膜钙化及炎症反应加重,且能刺激心室重构,加重心肌损伤,从而促进病情进展及心功能降低<sup>[12]</sup>。此外,IRF家族对干扰素的基因表达具有调控作用,参与炎症反应、细胞周期和细胞凋亡等生物学过程,且是维持T淋巴细胞分化、功能及平衡的重要因子,随着年龄的增长,淋巴细胞内IRF-4逐渐减少,机体免疫功能降低,导致巨噬细胞过多释放炎症因子,引发心肌组织自身免疫反应,从而刺激心脏瓣膜炎症发生<sup>[13-14]</sup>。本研究经Logistic回归分析发现,血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA是DHVD发病的重要影响因素,充分表明



注:A为血清LP(a)与LVEF相关性;B为血清OPN与LVEF相关性;C为IRF-4 mRNA与LVEF相关性;D为血清LP(a)与CI相关性;E为血清OPN与CI相关性;F为IRF-4 mRNA与CI相关性

图1 血清各指标与心功能相关性

Figure 1 Serum indexes were correlated with cardiac function

DHVD患者血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA表达异常,是DHVD发生的重要影响因素。且此次研究发现,冠心病、吸烟史、高血压均为DHVD发病的重要影响因素,因此,针对合并冠心病、高血压及有吸烟史的DHVD患者,应加强治疗及干预措施,以改善病情控制效果。

基于上述结论,本研究进一步采用ROC曲线分析血清各指标对DHVD的诊断价值3种指标联合有助于改善DHVD的诊断效能,但其联合诊断的具体价值有待日后进一步探究。

此外,DHVD患者经常规对症治疗3个月后,不同疗效患者的血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA及LVEF、CI存在显著差异,进一步经Pearson进行相关性分析发现,血清LP(a)、OPN与LVEF、CI存在显著负相关关系,IRF-4 mRNA与LVEF、CI存在显著正相关关系,由此可见,血清LP(a)、OPN、IRF-4 mRNA不仅可作为DHVD的诊断、病情评估的重要指标,同时与患者治疗后心功能具有密切相关性,治疗期间动态监测其水平变化,有助于明确患者心功能改变情况,对临床及时调整治疗方案具有重要指导性作用,利于改善治疗效果及患者预后。

(下转第506页)

## 血清LBP、HSP70、DcR3水平预测急性呼吸窘迫综合征患者疾病转归的价值

马玲玲<sup>1\*</sup> 杨秋伟<sup>2</sup> 孔汴躲<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探讨血清脂多糖结合蛋白(LBP)、热休克蛋白70(HSP70)、诱捕受体3(DcR3)水平预测急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者病情转归的价值。方法 选取本院2017年5月至2019年5月收治的92例ARDS患者作为研究对象,根据30d预后情况选取存活患者64例为生存组,全因死亡患者28例为死亡组。对比分析两组血清LBP、HSP70、DcR3水平、序贯器官衰竭估计(SOFA)评分、急性生理与慢性健康II(APACHE II)评分及相关性,探讨其预后预测价值。结果 死亡组入院时、入院第7天血清LBP、DcR3水平高于生存组,HSP70水平低于生存组,SOFA、APACHE II评分高于生存组( $P<0.05$ ),且生存组入院时与入院第7天差值高于死亡组( $P<0.05$ );血清LBP、DcR3水平与SOFA、APACHE II评分呈正相关,HSP70与SOFA、APACHE II评分呈负相关( $P<0.05$ );入院第7天HSP70 AUC(0.830)>入院第7天LBP(0.806)>入院第7天DcR3(0.766);血清LBP、HSP70、DcR3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LBP、HSP70、DcR3水平与ARDS患者病情严重程度密切相关,有望成为评估ARDS预后的主要预测因子。

**[关键词]** 急性呼吸窘迫综合征;脂多糖结合蛋白;热休克蛋白70;诱捕受体3;ROC;肺损伤

### The value of serum LBP, HSP70, DcR3 levels in predicting the outcome of patients with acute respiratory distress syndrome

MA Lingling<sup>1\*</sup>, YANG Qiuwei<sup>2</sup>, KONG Bianduo<sup>1</sup>

(1. Department of respiratory medicine, luoyang first people's hospital, luoyang, Henan, China, 471000;

2. Department of endocrinology, luoyang first people's hospital, luoyang, Henan, China, 471000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the value of serum lipopolysaccharide binding protein (LBP), heat shock protein 70 (HSP70) and trap receptor 3 (DcR3) levels in predicting the outcome of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). Methods 92 patients with ARDS admitted to our hospital from May 2017 to May 2019 were recruited as the research object. According to the prognosis of 30 days, 64 surviving patients were selected as the survival group, and 28 patients with all-cause death were the death group. The serum levels of LBP, HSP70, DcR3, sequential organ failure assessment (sofa), acute physiology and chronic health II (APACHE II) were compared between the two groups. Results The serum LBP and DcR3 levels were higher in the death group on the day of admission and the 7th day after admission than those in the survival group. HSP70 level was lower than that in the survival group. SOFA and APACHE II scores were higher than in the survival group ( $P<0.05$ ). The difference in the survival group and the seventh day after admission was significant compared to the death group ( $P<0.05$ ). The Serum LBP and DcR3 levels were positively correlated with SOFA and APACHE II scores, and HSP70 was negatively corre-

基金项目:河南科技厅重点项目(20182017x)

作者单位:1. 洛阳市第一人民医院呼吸内科,河南,洛阳 471000

2. 洛阳市第一人民医院内分泌科,河南,洛阳 471000

\*通信作者:马玲玲, E-mail:18623753239@163.com

lated with SOFA and APACHE II scores ( $P<0.05$ ). Seventh day after admission, HSP70 AUC (0.830) > LBP (0.806) > DcR3 (0.766). There were significant differences in the survival curves of serum LBP, HSP70, and DcR3 between the high-risk groups and the low-risk groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Serum LBP, HSP70, and DcR3 levels are closely related to the severity of ARDS patients, and are expected to be the main predictors of ARDS prognosis.

[KEY WORDS] Acute respiratory distress syndrome; Lipopolysaccharide binding protein; Heat shock protein 70; Trap receptor 3; ROC; Lung injury

急性呼吸窘迫综合征 (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) 具有起病急骤、病死率高等特点, 数据显示, ARDS 病死率高达 35.0%~46.0%<sup>[1]</sup>。文献报道, 炎症反应失控、凋亡在 ARDS 发病机制中起着关键性作用<sup>[2]</sup>。同时, 研究表明, 脂多糖结合蛋白 (Lipopolysaccharide Binding Protein, LBP) 能激活 Toll 样受体 4 (Toll like receptor, TLR-4) 信号, 诱发炎症级联信号通路<sup>[3]</sup>。热休克蛋白 70 (Heat shock proteins 70, HSP70) 通过抑制炎症相关基因转录, 可实现抗炎症、减轻损伤、保护机体的作用。诱捕受体 3 (Decoy receptor3, DcR3) 作为多向性免疫调节因子, 能发挥抗炎、免疫调节双重作用, 是炎症性疾病、自身免疫性疾病的生物标志物<sup>[4]</sup>。但临床关于血清 LBP、HSP70、DcR3 水平对 ARDS 患者预后预测价值鲜有研究。鉴于此, 本研究旨在探讨其对 ARDS 患者预后的预测价值。具体分析如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2017 年 5 月至 2019 年 5 月收治的 92 例 ARDS 患者作为研究对象, 根据 30 d 预后情况选取存活患者 64 例为生存组, 全因死亡患者 28 例为死亡组。两组基本资料比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 均衡可比所有患者及家属均签知情同意书。本研究经我院医学伦理委员会批准。

### 1.2 选取标准

纳入标准: ①符合 ARDS 相关标准<sup>[5]</sup>; ②均经 X 线胸片正位扫描发现双肺出现斑片状阴影; ③氧合指数  $\leq 200$  mmHg; ④肺动脉嵌顿压  $\leq 18$  mmHg; ⑤临床资料完整; ⑥患者及家属知情并签署同意书。排除标准: ①存在长期免疫抑制剂或激素类药物使用史者; ②肝肾等重要脏器器质性病变者; ③间质性肺疾病者; ④精神行为异常者。

### 1.3 方法

空腹取 3 mL 静脉血, 离心 12 min, 3 000 r/min, 分离取血清, 采用酶联免疫吸附法检测血清 DcR3、HSP70、LBP 水平, 试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司, 均严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.4 观察指标

①对比两组血清 LBP、HSP70、DcR3 水平、SOFA、APACHE II 评分。其中 SOFA 评分从呼吸系统、凝血系统、肝、循环系统、神经系统、肾脏 6 个方面进行评估, 每个方面 1~4 分, 得分越高, 预后越差; APACHE II 评分最高分 71 分, >17 分为重症, 得分越高, 病情越严重, 病死率越高。②分析血清 LBP、HSP70、DcR3 水平与 SOFA、APACHE II 评分相关性。③分析 ARDS 患者预后的危险因素。④分析血清 LBP、HSP70、DcR3 预测 ARDS 患者预后价值。⑤分析血清 LBP、HSP70、DcR3 高危组、低危组生存曲线。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 计量资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 计数资料用  $n$  (%) 表示, 采用  $\chi^2$  检验, 通过 Logistic 进行多因素回归分析, 采用 Pearson 进行线性相关性分析, 采用 ROC 曲线预测预后价值, 以卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier, KM) 曲线进行生存曲线分析, 采用 Log-Rank 检验,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本资料比较

两组基本资料中, 性别、年龄、BMI 等指标比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1。

### 2.2 两组血清 LBP、HSP70、DcR3 水平

死亡组入院时、入院第 7 天血清 LBP、DcR3 水平高于生存组, HSP70 水平低于生存组 ( $P<0.05$ ), 且生存组入院时与入院第 7 天差值高于死亡组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 2。

表1 两组一般资料比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of 2 groups of general data [n(%)]

一般资料	生存组 (n=64)	死亡组 (n=28)	t/χ <sup>2</sup> 值	P值
性别(男/女)	35/29	16/12	0.048	0.827
年龄(岁)	60.70±7.09	60.28±7.27	0.260	0.796
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	20.92±1.86	21.14±2.05	0.506	0.614
原发病				
肺部感染	53(82.81)	23(82.14)	0.049	0.825
创伤	5(7.81)	2(7.14)	0.100	0.752
外科手术	3(4.69)	2(7.14)	0.001	0.983
胰腺炎	3(4.69)	1(3.57)	0.097	0.754
降钙素原(ng/mL)	7.40±1.08	6.83±1.86	1.847	0.068
有无吸烟史	40/24	16/12	3.058	0.080

表2 两组血清LBP、HSP70、DcR3水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum LBP, HSP70 and DcR3 levels between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LBP (μg/mL)	HSP70 (μg/L)	DcR3 (ng/mL)
入院时	死亡组	28 121.90±32.27	1.02±0.31	3.16±0.62
	生存组	64 93.37±29.06	1.33±0.34	2.59±0.58
	t值	4.189	4.130	4.247
	P值	<0.001	<0.001	<0.001
入院第7天	死亡组	28 102.05±34.00	1.17±0.42	3.04±1.01
	生存组	64 67.44±22.46	1.85±0.69	1.83±0.60
	t值	5.774	4.829	7.149
	P值	<0.001	<0.001	<0.001
入院时与入院第7天差值	死亡组	28 19.85±3.23	0.15±0.06	0.12±0.04
	生存组	64 25.93±5.10	0.52±0.21	0.76±0.25
	t值	5.809	9.136	13.431
	P值	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 两组SOFA、APACHE II评分

死亡组入院时、入院第7天SOFA、APACHE II评分高于生存组(P<0.05),且生存组入院时与入院第7天差值高于死亡组,差异具有统计学意义(P<0.05),见表3。

表3 两组SOFA、APACHE II评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of sofa and Apache II scores between 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	SOFA评分(分)			APACHE II评分(分)		
		入院时	入院第7天	差值	入院时	入院第7天	差值
死亡组	28	8.69±1.41	8.03±2.67	0.66±0.23	18.10±1.73	17.06±4.75	1.04±0.96
生存组	64	7.37±1.35	5.39±1.80	1.98±0.30	16.96±1.40	12.34±3.22	4.62±1.13
t值		4.258	5.550	20.744	3.340	5.562	14.605
P值		<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 血清LBP、HSP70、DcR3水平与SOFA、APACHE II评分的相关性

Pearson线性相关性分析,血清LBP、DcR3水平与SOFA、APACHE II评分呈正相关,HSP70与SOFA、APACHE II评分呈负相关(P<0.05),见表4。

表4 血清LBP、HSP70、DcR3水平与SOFA、APACHE II评分的相关性

Table 4 Correlation of serum LBP, HSP70, DcR3 levels with sofa and Apache II scores

评分	LBP		HSP70		DcR3	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
SOFA评分						
入院时	0.471	<0.001	0.446	<0.001	0.486	<0.001
入院第7天	0.583	<0.001	-0.529	<0.001	0.537	<0.001
APACHE II评分						
入院时	0.503	<0.001	-0.512	<0.001	0.611	<0.001
入院第7天	0.621	<0.001	-0.635	<0.001	0.702	<0.001

### 2.5 ARDS患者预后的影响因素

以ARDS患者预后作为因变量,以入院时合并MODS、入院时并发休克、血清LBP、HSP70、DcR3、SOFA、APACHE II评分作为自变量,纳入Logistic回归分析模型,结果显示,入院时合并MODS、入院时并发休克、血清LBP、HSP70、DcR3、SOFA、APACHE II评分是ARDS患者预后的重要影响因素(P<0.05),见表5。

### 2.6 血清LBP、HSP70、DcR3对ARDS预后的预测价值

ROC曲线分析显示,入院时、入院第7天血清LBP、HSP70、DcR3对ARDS预后均具有一定预测价值,入院第7天HSP70 AUC(0.830)>入院第7天LBP(0.806)>入院第7天DcR3(0.766)。见表6、图1。

表5 ARDS患者预后的影响因素

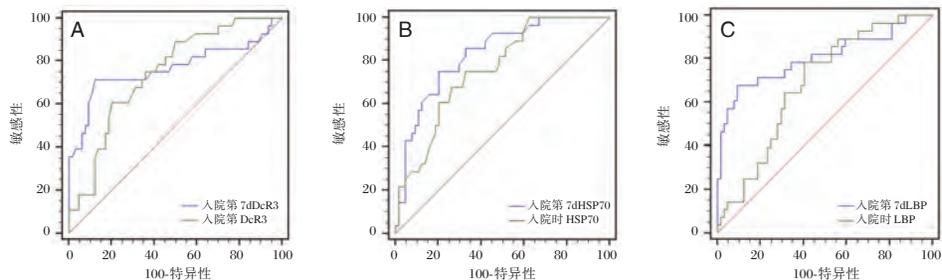
Table 5 Prognostic factors of death in patients with ARDS

变量	$\beta$ 值	SE值	Wald/ $\chi^2$ 值	OR值	95%CI值	P值
入院时合并MODS	1.553	0.420	13.670	4.725	2.711~8.235	<0.001
入院时并发休克	1.426	0.517	7.605	7.105	2.437~7.105	<0.001
LBP	0.990	0.381	6.749	5.063	1.430~5.063	<0.001
HSP70	-0.615	0.273	5.082	0.907	0.322~0.907	0.013
DcR3	1.282	0.409	9.831	6.004	2.165~6.004	<0.001
SOFA评分	1.180	0.426	7.666	5.179	2.043~5.179	<0.001
APACHE II评分	0.973	0.312	9.723	4.081	1.715~4.081	<0.001

表6 ROC分析结果

Table 6 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI值	Z统计	截断值	截断值敏感度(%)	截断值特异度(%)	P值
入院时LBP	0.686	0.581~0.779	3.281	>100.30	78.57	59.38	0.001
入院时HSP70	0.760	0.659~0.843	0.843	$\leq$ 1.29	75.00	67.19	<0.001
入院时DcR3	0.744	0.643~0.830	4.616	>3.02	60.71	79.69	<0.001
入院第7天LBP	0.806	0.710~0.881	5.379	>92.28	67.86	90.62	<0.001
入院第7天HSP70	0.830	0.737~0.900	7.413	$\leq$ 1.45	75.00	79.69	<0.001
入院第7天DcR3	0.766	0.667~0.848	4.095	>2.46	71.43	87.50	<0.001



注:A为DcR3预测ARDS预后的ROC曲线;B为HSP70预测ARDS预后的曲线;C为LBP预测ARDS的ROC曲线

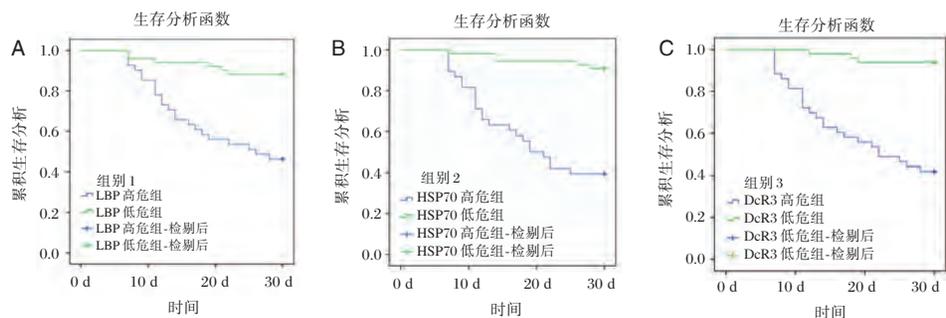
图1 ROC曲线

Figure 1 ROC curve

2.7 生存分析

赋值生存="0"、死亡="1"。以ROC曲线最佳截断值分为低危组、高危组,KM曲线分析显示血

清LBP、HSP70、DcR3高危组、低危组生存曲线对比,差异有统计学意义( $\chi^2_1=19.438$ ;  $\chi^2_2=31.134$ ;  $\chi^2_3=30.894$ ,  $P<0.001$ ),见图2。



注:A为LBP生存曲线;B为HSP70生存曲线;C为DcR3生存曲线

图2 LBP、HSP70、DcR3生存曲线

Figure 2 Survival curve(LBP、HSP70、DcR3)

### 3 讨论

ARDS 主要发病机制在于肺内及全身过度活化的炎症反应及大量活性氧所致氧化应激,可爆发级联性炎症反应,损伤肺微血管内皮细胞及屏障,进一步引发通透性肺损伤,危及患者生命安全<sup>[6-7]</sup>。LBP 属 I 型急性期反应蛋白,正常人 LBP 血浆浓度为 5~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,急性反应期 24 h 内可迅速增至 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,当 LBP 致炎位点与内毒素(LPS)的类脂 A 结合时,表现为信号的跨膜转导,能促进炎症介质生成<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示,ARDS 死亡患者入院时、入院第 7d 血清 LBP 水平均呈高表达状态。研究也证实,ARDS 发生时,可显著放大 LPS 致炎作用,激活核转录因子(NF- $\kappa\text{B}$ ),释放大量的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素 6、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等促炎性因子及一氧化氮<sup>[10-11]</sup>,形成恶性循环,诱发过度炎症反应,加重机体损伤。

HSP70 是生物细胞在应激状态下产生的高度保守蛋白质,具有抵御外界刺激、维持细胞稳定性等作用,可通过多途径参与免疫反应、抑制炎症反应<sup>[12-13]</sup>。同时,曹征等<sup>[14]</sup>通过小鼠实验发现,HSP70 水平显著升高,有助于降低支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等细胞因子含量,避免肺损伤加重。本研究通过对比两组入院时、入院第 7 天血清 HSP70 水平可知,ARDS 生存患者血清 HSP70 水平明显高于死亡患者,与上述研究相似。ARDS 可诱发严重氧化应激反应,进而促进 HSP70 表达增加,帮助免疫系统清除毒性细胞,协助抗原提呈细胞浆抗原提呈至 T 细胞,参与细胞免疫调控,抑制 TNF- $\alpha$  等促炎因子的表达,发挥抗炎、肺保护作用<sup>[15]</sup>。且入院时、入院第 7 天血清 HSP70 均超出基线值,说明血清 HSP70 对 ARDS 预后具有一定预测价值。

DcR3 是一种 33 kD 可溶性分子,可竞争性结合 FasL,抑制细胞凋亡,调节过激炎症免疫应答,而 FasL/DcR3 水平紊乱,一定程度会迅速降低肺炎球菌清除功能,诱导病情进展,增加病死率<sup>[16]</sup>。谢姿等<sup>[17]</sup>采用前瞻性巢式病例对照研究 21 例 ARDS 存活者、20 例 ARDS 病死者 DcR3 浓度发现,ARDS 病死者 DcR3 浓度呈明显高表达状态,推测血清 DcR3 水平可能与 ARDS 发生、进展有关,同时经 Cox 回归分析显示 DcR3 $\geq 2.7$  ng/mL 是 ARDS 患者 30 d 死亡的独立危险因素,与本研究观点一致。

ARDS 发生可诱发抗炎反应与促炎反应平衡失调,促进血清 DcR3 过度表达,使巨噬细胞趋向具有抗炎特性的 M2 表型,抑制抗炎细胞因子分泌,增加 ICAM-1、IL-8 等炎症因子含量,加重肺损伤,影响预后转归。经 Pearson 线性相关性分析发现,DcR3 与 SOFA、APACHE II 评分存在正相关关系,提示血清 DcR3 水平越高,ARDS 病情严重程度越高,可见血清 DcR3 在 ARDS 预后评估中具有一定预测价值。

综上所述,血清 LBP、HSP70、DcR3 水平与 ARDS 患者病情严重程度密切相关,是 ARDS 患者预后的重要影响因素,可成为评估 ARDS 患者预后的重要预测因子。

### 参考文献

- [1] Li H, Zhou X, Tan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS[J]. *Oncotarget*, 2017,9(2):1772-1784.
- [2] 凌涛,黄聃,孙大勇.应用适应性支持通气与同步间歇指令通气模式机械通气治疗重症医学科呼吸衰竭患者的疗效比较[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2016,22(6):487-491.
- [3] 江浪,李流连.乳酸杆菌水平与糖尿病患者糖脂及炎症指标相关性分析[J]. *检验医学与临床*, 2016,13(20):2916-2918.
- [4] 张文熠,林伟,余乐杰. DcR3 在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中华胰腺病杂志*, 2016,16(6):409-411.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会呼吸危重症医学学组.急性呼吸窘迫综合征患者机械通气指南(试行)[J]. *中华医学杂志*, 2016,96(6):404-424.
- [6] Peretti M, Hervochon R, Loi M, et al. Predictors of post-pneumonectomy respiratory failure and ARDS: usefulness of normalized pulmonary artery diameter [J]. *Intensive Care Med*, 2018,44(8):1357-1359.
- [7] 宋邵华,田惠玉,杨秀芬,等.气道压力释放通气应用于急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征患者的临床研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2016,21(1):15-21.
- [8] 郭进强,覃旻,罗炳德. 黄芪多糖对脂多糖诱导人 THP21 单核细胞 MCP-1 与 IL-6 表达的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2012,4(4):258-261.
- [9] 邱泽成. 内毒素及杀菌/通透性增加蛋白水平变化规律与外科感染的程度及预后的关联性[J]. *河北医学*, 2015,21(12):1943-1946.
- [10] 刘志宏,张庆锋,王瑶,等.氧化钬致大鼠肺氧化损伤与枸杞多糖的保护作用[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2015,33(7):512-516.
- [11] 李乐辉,罗凌青,饶平,等.急性呼吸窘迫综合征患者血清可溶性 CD14、LBP 水平与预后的关系研究[J]. *临床肺科杂志*, 2019,24(6):1030-1033.

(下转第 496 页)

# 小儿重症肺炎不同病原抗原及抗体 IgM 抗体检测特点及流行趋势分析

陶珊\*

**[摘要]** 目的 探析小儿重症肺炎不同病原抗原及抗体 IgM 抗体检测特点及流行趋势。方法 收集本院 2017 年 1 月至 2019 年 12 月收治的重症肺炎患儿 308 例,以免疫荧光法进行肺炎支原体(MP)、肺炎衣原体(CP)、呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒(ADV)、副流感病毒 1 型(PIV1)、副流感病毒 2 型(PIV2)、副流感病毒 3 型(PIV3)、甲型流感病毒(FA)、乙型流感病毒(FB)、柯萨奇病毒 B 型(COXB)等多种病原抗原及 IgM 抗体检测。按照厦门地区气候特点,采用平均气温分类法划分春(公历 3~4 月),夏(公历 5~9 月),秋(公历 10~11 月),冬(公历 12~2 月),观察不同季节 MP、ADV、RSV 感染分布特点,调查重症肺炎患儿并发症情况。**结果** ①308 例重症肺炎患儿中病原 IgM 抗体阳性率 58.77%(181/308),其中 MP 感染占比最高,ADV 与 RSV 感染次之,其他包括 PIV3、FA、COXB、FB、PIV1、等。单项感染率为 41.56%(128/308),双重感染率为 13.96%(43/308),多重感染率 3.25%(10/308)。②MP 感染中 3~7 岁(学龄前期)感染率最高,明显高于<1 岁(婴儿期)与 1~3 岁(幼儿期),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),RSV 感染中婴儿期与幼儿期明显高于学龄前期,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),ADV 感染中学龄前期、幼儿期明显高于婴儿期,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。③男、女患儿 MP、ADV 感染率比较无统计学意义( $P>0.05$ ),男性患儿 RSV 感染率明显高于女性,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。④MP 感染夏季最高,ADV 感染春、夏季节较高,RSV 感染夏季最高。⑤MP 感染患儿呼吸衰竭、心肌损害并发症率较高,ADV、RSV 感染患儿各类并发症亦频发,且多重感染患儿呼吸衰竭、胸腔积液、心肌损害、肝功能异常等并发症明显高于单一病原体,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 本院重症肺炎患儿病原体主要以 MP、ADV、RSV 感染为主,且双重感染风险高;夏季为 MP、ADV、RSV 感染高危季节;MP、ADV、RSV 感染与重症肺炎患儿年龄有关,其中学龄前期 MP 感染风险最高,而 RSV 易发于婴儿期,ADV 则幼儿期与学龄前期均有较高感染风险。

**[关键词]** 重症肺炎;儿童;病原学;肺炎支原体;呼吸道合胞病毒;腺病毒

## Detection characteristics and epidemiological trend analysis of different pathogenic antigens and IgM antibodies in children with severe pneumonia

TAO Shan\*

(Department of Special Needs, Xiamen Children's Hospital, Xiamen, Fujian, China, 361006)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the detection characteristics and epidemic trend of IgM antibody anti-different pathogens in children with severe pneumonia. **Methods** A total of 308 children with severe pneumonia admitted to Xiamen Children's Hospital from January 2017 to December 2019 were collected. Mycoplasma pneumoniae (MP), Chlamydia pneumoniae (CP), respiratory syncytial virus (RSV), and Virus (ADV), parainfluenza virus type 1 (PIV1), parainfluenza virus type 2 (PIV2), parainfluenza virus type 3 (PIV3), influenza A virus (FA), influenza B virus (FB), Kosa Detection of multiple pathogenic

基金项目:厦门市教育科技基金(3502Z20174016)

作者单位:厦门市儿童医院特需病房,福建,厦门 361006

\*通信作者:陶珊, E-mail: mubanpe27204@163.com

antigens such as parvovirus B (COXB), antigens and IgM antibodies were detected by immunofluorescence. According to the climatic characteristics of Xiamen, the average temperature classification method is used to divide spring (March to April), summer (May to September), autumn (10 to November), and winter (12 to February), seasonal distribution characteristics of MP, ADV and RSV infections were observed. The children with severe pneumonia and their complications were investigated. **Results** ① The positive rate of pathogenic IgM antibodies in 308 children with severe pneumonia was 58.77% (181/308), among which MP infection accounted for the highest proportion, followed by ADV and RSV infection, and others included PIV3, FA, COXB, FB, PIV1. The single infection rate was 41.56% (128/308), the double infection rate was 13.96% (43/308), and the multiple infection rate was 3.25% (10/308). ② Among MP infections, the infection rate is the highest between 3 and 7 years old (preschool age), which is significantly higher than <1 year (infancy) and 1 to 3 years (infancy), the difference is statistically significant ( $P < 0.05$ ), infants with RSV infection Period and early childhood are significantly higher than preschool age, the difference is statistically significant ( $P < 0.05$ ). ADV infection in middle school and early childhood is significantly higher than infancy, the difference is statistically significant ( $P < 0.05$ ). ③ The infection rates of MP and ADV in male and female children were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The RSV infection rates in male children were significantly higher than that in females, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). ④ MP infection is the highest in summer, ADV infection is higher in spring and summer, and RSV infection is the highest in summer. ⑤ Children with MP infection have higher rates of respiratory failure and myocardial damage complications. Various complications of children with ADV and RSV infection are also frequent. Children with multiple infections have complications such as respiratory failure, pleural effusion, myocardial damage, and abnormal liver function, significantly higher than that of a single pathogen ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The pathogens detected in children with severe pneumonia in our hospital are mainly MP, ADV and RSV infections, and the risk of double infection is high. Summer is the high-risk season for MP, ADV and RSV infection. MP, ADV, RSV infection is related to the age of children with severe pneumonia. Among them, the risk of MP infection is the highest in preschool age, while RSV is easy to occur in infancy, while ADV has a higher risk of infection in early childhood and preschool age.

[KEY WORDS] Severe pneumonia; Children; Pathogen; Mycoplasma pneumoniae; Respiratory syncytial virus; Adenovirus

据调查<sup>[1]</sup>,肺炎为国内幼儿常见感染性疾病,亦为≤7岁龄幼儿死亡主要病因,且超过10%的小儿肺炎可进展为重症肺炎。研究发现<sup>[2]</sup>,重症肺炎病原体复杂多样,40%~65%是由非细菌性病原体感染所致。攸小瑾等<sup>[3]</sup>认为,病毒所致重症肺炎感染趋势不断上升,且导致患儿病情症状复杂,临床鉴别诊断困难。对此加强重症肺炎病原体早期检测及针对不同病原体致病特点,感染季节、年限变化趋势,患儿年龄、性别分部特征情况进行调查,对重症肺炎预防有积极意义。本研究收集厦门市儿童医院2017年1月至2019年12月收治的308例重症肺炎患儿资料,探析重症肺炎病原体感染特点,分析重症肺炎感染流行趋势变化。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择本院2017年1月至2019年12月收治

的重症肺炎患儿为研究对象,收集308例22天至7岁小儿重症肺炎,结合体征、症状、病原学检测、痰培养确诊,符合“儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019年版)”制定的重症肺炎诊断标准<sup>[4]</sup>。纳入标准:①符合重症肺炎诊断标准<sup>[4]</sup>;②病历资料完善;③患儿家属知情同意。排除标准:①合并肺结核;②伴皮肤黏膜淋巴结综合征;③支气管哮喘;④过敏性鼻炎;⑤EB病毒感染。本研究经医院医学伦理委员会讨论同意。

### 1.2 方法

全部患儿入院1d,取肘静脉血3mL,2000 r/min离心(10 min),选用欧蒙(杭州)医学实验诊断股份公司生产呼吸道病原体谱抗体IgM试剂盒,按照检查标准章程操作,以免疫荧光法进行肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae, Mp)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae, CP)、呼吸道合胞病毒

(Respiratory syncytial virus pneumonia, RSV)、腺病毒(Adenovirus, ADV)、副流感病毒1型(Parainfluenza virus type 1, PIV1)、副流感病毒2型(Parainfluenza virus type 2, PIV2)、副流感病毒3型(Parainfluenza virus type 3, PIV3)、甲型流感病毒(influenza A, FA)、乙型流感病毒(influenza B, FB)、柯萨奇病毒B型(Coxsackie b virus, COXB)等多种病原抗原及IgM抗体检测。采用欧蒙EUROStar III Plus 荧光显微镜,汞灯100 W,滤镜450~515 nm,物镜:细胞观察20倍,物镜:细胞基质观察40倍,呈特异性荧光可定性判断为抗体阳性。

### 1.3 并发症评定标准

呼吸衰竭:伴有呼吸困难症状,呼吸频率增快( $RR>28/\text{min}$ ), $\text{PaCO}_2>6.67\text{ kPa}$ (50 mmHg)。肝功能损害:谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)异常增高。心肌损伤:磷酸肌酸激酶同工酶(Creatine kinase-MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)异常升高。胸腔积液:X线可见低密度阴影,积液达胸壁,多普勒超声明确积液位置、体积。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件分析,计数资料以%表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,若理论频数小于5,采用Fisher确切概率法检验, $P<0.05$ 则表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病原体检出情况

308例重症肺炎患儿中病原IgM抗体阳性率58.77%(181/308),其中MP感染占比最高,ADV与RSV感染次之,其他包括PIV3、FA、COXB、FB、PIV1(见表1)。单项感染率为41.56%(128/308),双重感染率为13.96%(43/308),其中MP+ADV双重病原感染最为常见27例(占62.79%),另有9例为MP+RSV感染(占20.93%)。多重感染率3.25%(10/308),MP+ADV+RSV最为常见6例(占60.0%)。

### 2.2 不同年龄病原体感染特点分析

MP感染中3~7岁(学龄前期)感染率最高,明显高于<1岁(婴儿期)与1~3岁(幼儿期),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),RSV感染中婴儿期与幼儿

期明显高于学龄前期,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),ADV感染中学龄前期、幼儿期明显高于婴儿期,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表1。

表1 不同年龄MP、ADV、RSV感染特点分析[n(%)]  
Table 1 Characteristics of MP, ADV and RSV infection at different ages [n(%)]

年龄分层(岁)	n	MP	ADV	RSV
<1(婴儿期)	144	17(11.81)	13(9.03)	34(23.61)
1~3(幼儿期)	87	37(42.53)	22(25.29)	18(20.69)
3~7(学龄前期)	77	49(63.64)	27(35.06)	3(3.90)
$\chi^2$ 值		65.0529	23.1615	13.9577
P值		0.0000	0.0000	0.0009

### 2.3 不同性别病原体感染特点分析

男、女患儿MP、ADV感染率比较无统计学意义( $P>0.05$ ),男性患儿RSV感染率明显高于女性,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表2。

表2 不同性别MP、ADV、RSV感染特点分析[n(%)]  
Table 2 Characteristics of MP, ADV and RSV infection by sex [n(%)]

性别	例数	MP	ADV	RSV
男	189	57(30.16)	37(19.58)	42(22.22)
女	119	46(38.66)	25(21.01)	13(10.92)
$\chi^2$ 值		2.3685	0.0931	6.3543
P值		0.1238	0.7603	0.0117

### 2.4 重症肺炎病原体感染不同季节分布特点分析

MP感染夏季最高,明显高于春季、秋季、冬季,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),ADV感染春、夏季节较高,明显高于秋、冬两季,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。RSV感染夏季最高,明显高于春季、秋季、冬季,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表3、图1~3。

表3 不同季节重症肺炎MP、ADV、RSV感染情况  
Table 3 Severe MP, ADV, RSV infection in different years, seasons

季节	MP(例)	ADV(例)	RSV(例)
春	16	14	13
夏	63	34	31
秋	13	7	5
冬	11	7	6
$\chi^2$ 值	78.9395	33.2202	33.0957
P值	0.0000	0.0000	0.0000



图1 不同季节重症肺炎MP感染情况

Figure 1 Severe pneumonia MP infection in different seasons



图2 不同季节重症肺炎ADV感染情况

Figure 2 Severe Pneumonia ADV Infection in Different Season



图3 不同季节重症肺炎RSV感染情况

Figure 3 Severe pneumonia RSV infection in different seasons

### 2.5 不同病原体感染重症肺炎患儿并发症情况分析

经统计,重症肺炎患儿呼吸衰竭、胸腔积液、心肌损害、肝功能异常等并发症较高,其中MP感染患儿呼吸衰竭、心肌损害并发症率较高,ADV、RSV感染患儿各类并发症亦频发,且多重感染患儿呼吸衰竭、胸腔积液、心肌损害、肝功能异常等并发症明显高于单一病原体,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表4。

### 3 讨论

研究指出<sup>[5-6]</sup>,幼儿肺炎病原体感染与地区、季节、年龄等因素变化而发生改变,儿童重症肺炎病原体阳性检出率可达到68%~89%。本研究可知厦门地区小儿重症肺炎病原抗原及抗体IgM抗体阳性检出率为58%,与陈玉等<sup>[7]</sup>研究相似。其中MP感染占比最高,ADV与RSV感染次之。与关珂等<sup>[8]</sup>研究重症肺炎病原学特征一致。但本研究中,双重及多重感染较魏洁等<sup>[9]</sup>研究中多病原体协同感染率略高。分析发现,重症肺炎患儿主要以MP感染为主,受MP感染可致蛋白酶、过氧化氢、代谢产物氨、神经毒素过度释放,引起呼吸道黏膜损伤,加重机体免疫负荷,增加其他病原体入侵风险所致。Jayaweera等<sup>[10]</sup>研究,MP与ADV或RSV病原双重感染最为常见,为重症肺炎病情进展高危因素。

本研究发现儿童重症肺炎病原体阳性检出率与季节变化相关,MP感染一年四季均可发病,但感染高峰为夏季,分析可能与厦门气候温度影响有关。刘青等<sup>[11]</sup>通过MP流行病学统计,MP感染好发于夏秋。本研究5~9月MP感染率最高,病原微生物受高温气候影响形成气溶胶现象,增加MP活性反应,导致幼儿MP感染风险增加。本研究中ADV感染高峰为春、夏季节,与厦门呼吸道感染流行趋势相符,且与孙灵利等<sup>[12]</sup>ADV感染集中于9~10月有所差异,表明ADV感染高峰季节存在地域性。春夏季为RSV感染高峰,与张蕾等<sup>[13]</sup>研究RSV感染流行季节一致,受厦门亚热带季风气候影响,雨季长,易于RSV繁殖,易导致儿童RSV感染流行。

本研究中,不同性别患儿MP、ADV病原体阳性率比较无明显差异,与黄辉等<sup>[14]</sup>研究相符,重症肺炎病原体感染与性别并无明显关联。男性患儿RSV感染率较女性更高,可能与男性患儿呼

表4 不同病原体感染重症肺炎患儿并发症情况 [n(%)]

Table 4 Complications of Severe Pneumonia in Children with Different Pathogens [n(%)]

病原体	n	呼吸衰竭	胸腔积液	心肌损害	肝功能异常
MP	103	48(46.60)	51(49.51)	54(52.43)	31(30.10)
ADV	62	20(32.26)	30(48.39)	21(33.87)	17(27.42)
RSV	55	14(25.45)	15(27.27)	11(20.00)	12(21.82)
多重感染	10	8(80.00)	7(70.00)	5(50.00)	7(70.00)
$\chi^2$ 值		14.9749	10.6495	17.2273	9.6499
P值		0.0018	0.0138	0.0006	0.0218

吸道较女性更为狭窄有关,RSV感染易引起呼吸道炎症性堵塞,加重肺炎症状,与张亚丽等<sup>[15]</sup>调查结果一致。

本研究MP、ADV、RSV感染与重症肺炎患儿年龄有关,学龄前期MP感染风险最高,而RSV易发于婴儿期,ADV则幼儿期与学龄前期均有较高感染率。经分析可能与小儿机体免疫功能尚未发育健全,病原体抵抗能力不足等因素有关。

不同病原体感染患儿并发症统计可知,MP感染患儿易发生呼吸衰竭、心肌损害等症状。吴喜蓉等<sup>[16]</sup>研究,MP感染可致机体免疫紊乱,自身抗体与MP抗原免疫复合物致心肌受限,加之重症肺炎缺氧、病毒血症等因素加重心肌损伤。

综上,厦门地区重症肺炎患儿病原体主要以MP、ADV、RSV感染为主,且双重感染风险高;夏季为MP感染高峰,春、夏季节为ADV感染高峰,春夏季为RSV感染高峰;MP、ADV、RSV感染与重症肺炎患儿年龄有关,学龄前期MP感染风险最高,而RSV易发于婴儿期,ADV则幼儿期与学龄前期均有较高感染风险。

## 参考文献

- [1] 陈静宜,廖飞,冯磊等. 2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3): 148-152, 173.
- [2] 祁红梅,刘继凯,路娟. 125例儿童肺炎支原体肺炎临床分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(3): 302-304.
- [3] 攸小瑾,曹蓝,陈艺韵,等. 2017年广州市6种常见非流感呼吸道病毒感染监测分析[J]. 华南预防医学, 2019, 45(01): 48-51.
- [4] 中华人民共和国国家健康委员会, 国家中医药局. 儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(1): 6-13.
- [5] 卢建强,黄纪. 2631例呼吸道感染患者肺炎支原体及合并病毒感染分析[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(6): 746-749.
- [6] 孙志豪,张荣华,钟超珍. 东莞市2017-2018年儿童下呼吸道感染病例监测结果[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4): 329-337.
- [7] 陈玉,李青,代玥,等. 儿童重症监护病房急性重症肺炎常见病原菌分析[J]. 中国小儿急救医学, 2017, 24(6): 455-458.
- [8] 关珂. 河南省栾川县2007-2017年法定传染病流行特征分析[J]. 华南预防医学, 2019, 45(01): 37-40.
- [9] 魏洁,和鹏,吴晓瑛等. 1629例7种呼吸道病毒检测结果分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(3): 337-340.
- [10] Jayaweera JAAS, Noordeen F, Kothalaweala S, et al. A case series on common cold to severe bronchiolitis and pneumonia in children following human metapneumovirus infection in Sri Lanka[J]. BMC Research Notes, 2018, 11(1): 127.
- [11] 刘青,李虎,万俊,等. 儿童重症肺炎支原体肺炎流行病学及临床特点分析[J]. 安徽医学, 2017, 38(12): 1553-1556.
- [12] 孙灵利,焦洋,高艳,等. 北京市朝阳区2011-2017年5岁以下腹泻患儿腺病毒分子流行病学特征[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(5): 492-495.
- [13] 张蕾,史伟,许晶等. 西安地区呼吸道合胞病毒流行情况及季节性分析[J]. 现代预防医学, 2018, 45(4): 712-714, 724.
- [14] 黄辉,邓莉,肖飞,等. 儿童百日咳发病特点及诊断中联合呼吸道病毒检测的临床意义分析[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(8): 580-585.
- [15] 张亚丽,林海玲,兰菊红,等. 急性下呼吸道感染住院患儿呼吸道合胞病毒感染分析[J]. 中国小儿急救医学, 2014, 21(3): 143-144.
- [16] 吴喜蓉,刘钢,钱素云,等. 住院儿童社区获得性流感病毒肺炎临床特点分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(2): 129-133.
- [12] Roufayel R, Kadry S. Molecular Chaperone HSP70 and Key Regulators of Apoptosis - A Review[J]. Curr Mol Med, 2019, 19(5): 315-325.
- [13] 康秋香. 脓毒症急性肺损伤时HSPA12B对肺血管通透性的影响及其机制[D]. 第二军医大学, 2015: 1-71.
- [14] 曹征,朱健,陆平,等. HSP70与TLR-NF-κB信号途径在急性肺损伤发病机制中作用的实验研究[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(3): 406-411.
- [15] 刘荣,李新建,桂新星,等. 肝缺血/再灌注对肺组织RAGE、SP-A、CC16表达的影响及丙氨酰谷氨酰胺的干预作用研究[J]. 中国医师杂志, 2016, 18(11): 1714-1716.
- [16] Zhao T, Xu Y, Ren S, et al. The siRNA silencing of DcR3 expression induces Fas ligand-mediated apoptosis in HepG2 cells[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4370-4378.
- [17] 谢姿,胡明冬,王长征,等. 血清DcR3在急性呼吸窘迫综合征预后评估中的价值[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(12): 1644-1648.

(上接第491页)

## SAA、sTREM-1、CRP/PAB 在 SP 患者全麻术后肺部感染的意义

孙媛 王欣 王莉\*

**[摘要]** 目的 探讨血清淀粉样蛋白 A(SAA)、可溶性髓系细胞触发受体-1(sTREM-1)、C反应蛋白(CRP)/前清蛋白(PAB)比值在精神分裂症(SP)患者全麻术后肺部感染的意义。方法 选取本院全麻下行上腹部手术的 SP 患者 82 例作为研究组,另选择同期健康体检者 80 例作为健康对照组,根据术后是否发生肺部感染分为感染组(21 例)、未感染组(61 例)。比较健康对照组、研究组术后 1、3、5、7 d 血清 SAA、sTREM-1 水平,并对比感染组与未感染组术后 1、3、5、7 d 血清 SAA、sTREM-1 水平、CRP/PAB 比值,分析各指标间相关性,采用受试者工作特征(ROC)曲线评价 3 者对肺部感染的诊断价值,并比较重度感染、轻度感染患者血清 SAA、sTREM-1 水平、CRP/PAB 比值,分析 3 者与感染程度的关系。结果 感染组术后 3 d 血清 SAA、sTREM-1、CRP/PAB 比值达到高峰,且术后 3、5、7 d 高于未感染组( $P<0.05$ );术后 3 d 血清 SAA 与 sTREM-1、CRP/PAB 比值呈正相关,sTREM-1 与 CRP/PAB 比值呈正相关( $P<0.01$ );血清 SAA、sTREM-1、CRP/PAB 联合诊断术后肺部感染的 ROC 曲线下面积为 0.876;术后 3 d 重度感染患者血清 SAA、sTREM-1、CRP/PAB 比值高于轻度感染患者( $P<0.05$ );血清 SAA、sTREM-1、CRP/PAB 比值与感染程度呈正相关( $P<0.05$ )。结论 SP 患者上腹部全身麻醉手术后肺部感染存在血清 SAA、sTREM-1 水平、CRP/PAB 比值升高现象,且与感染严重程度关系密切,在术后肺部感染中具有较高诊断价值,可为临床诊断、病情评估提供理论依据。

**[关键词]** 淀粉样蛋白 A; C 反应蛋白; 前清蛋白; 精神分裂症; 肺部感染

## Significance of SAA, sTREM - 1, CRP/PAB in pulmonary infection after general anesthesia in SP patients

SUN Yuan, WANG Xin, WANG Li\*

(Anesthesia, The first hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China, 050031)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the significance of serum amyloid A (SAA), soluble myeloid triggering receptor-1 (sTREM-1), C-reactive protein (CRP)/prealbumin (PAB) ratio in pulmonary infection after general anesthesia in patients with schizophrenia (SP). Methods A total of 82 SP patients undergoing upper abdominal surgery under general anesthesia in our hospital were selected as the research group, and 80 healthy medical examinees in the same period were selected as the healthy control group. They were divided into infected group (21 cases) and uninfected group (61 cases) according to whether postoperative pulmonary infection occurred. The levels of serum SAA and sTREM-1 at 1, 3, 5, and 7 days after operation in the healthy control group and the research group were compared, and the levels of serum SAA, sTREM-1, CRP/PAB ratio in the infected group and the uninfected group 1, 3, 5, and 7 days after operation were compared, and the correlation between the indicators were analyzed, the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of the three for lung infections, the

基金项目:河北省卫生和计划委员会科研课题(20170521)

作者单位:河北医科大学第一医院麻醉科,河北,石家庄 050031

\*通信作者:王莉, E-mail: hnzzz200@yeah.net

levels of SAA, sTREM-1 and CRP/PAB in patients with severe infection and mild infection were compared, and the relationship between the three and the degree of infection was analyzed. **Results** The serum SAA, sTREM-1, CRP/PAB ratio reached a peak at 3 days postoperatively in the infected group, and was higher than the uninfected group at 3, 5, 7 days postoperatively ( $P<0.05$ ); serum SAA was positively correlated with sTREM-1 and CRP/PAB ratio at the third days after surgery, and sTREM-1 was positively correlated with CRP/PAB ratio ( $P<0.01$ ); the area under the ROC curve of serum SAA, sTREM-1, CRP/PAB combined diagnosis of pulmonary infection after surgery was 0.876; serum SAA, sTREM-1, and CRP/PAB ratios in patients with severe infection were higher than those in patients with mild infection at the third day after surgery ( $P<0.05$ ); serum SAA, sTREM-1, and CRP/PAB ratios were positively correlated with the degree of infection ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The level of serum SAA, sTREM-1 and the ratio of CRP/PAB were increased in SP patients with pulmonary infection after upper abdominal general anesthesia, and it is closely related to the severity of infection, and has a high diagnostic value in postoperative pulmonary infections, which can provide theoretical basis for clinical diagnosis and disease evaluation.

[KEY WORDS] Amyloid A; C-reactive protein; Prealbumin; Schizophrenia; Pulmonary infection

精神分裂症(Schizophrenia, SP)为精神科常见疾病,近年合并SP的手术患者逐年升高<sup>[1]</sup>。术后肺部感染、谵妄是上腹部全身麻醉手术术后常规并发症,研究显示,SP患者术后更易发生谵妄,极易并发其他疾病,而肺部感染是术后谵妄的主要危险因素之一,二者相互影响,形成恶性循环<sup>[2]</sup>。右美托咪定是高选择性 $\alpha_2$ 肾上腺素能受体激动剂,对降低SP患者术后谵妄发生风险、缓解肺组织炎性损伤具有积极作用,但目前仍缺乏术后肺部感染的早期预警机制<sup>[3]</sup>。血清淀粉样蛋白A(Serum amyloid A, SAA)、可溶性髓系细胞触发受体-1(Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1, sTREM-1)是评估急性相反应功能因子,在多种炎症疾病、病毒或细菌感染中异常表达<sup>[4-5]</sup>;相关研究显示,C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)与前清蛋白(Prealbumin, PAB)比值与细菌性感染关系密切<sup>[6]</sup>。基于SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值在感染性疾病中的特异性表现,本研究初次探究其在SP患者全麻术后肺部感染的变化及临床价值,旨在为临床完善预警机制提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院2016年7月至2019年7月全麻下行上腹部手术的SP患者82例作为研究对象,根据术后是否发生肺部感染分为感染组(21例)、未感染组(61例),另选择同期健康体检者80例作为健康对照组,其中男45例,女35例,年龄31~61岁,平

均(46.01±5.77)岁,体质量指数18~21 kg/m<sup>2</sup>,平均(20.96±0.91)kg/m<sup>2</sup>。符合SP诊断标准<sup>[7]</sup>;入选标准:①全麻下行上腹部手术;②明确长期服用抗精神病药史;③所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:①术前存在肺部感染者;②存在免疫系统疾病者;③伴严重心肝肾功能缺陷、肺纤维化、活动性结核者。本研究已通过医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 麻醉

入室建静脉通路,静输6~8 mL/kg乳酸钠林格液,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司BeneView T8多功能监测仪监测生命体征;美国Aspect公司A-2000xp监测仪监测脑电双频指数(Bispectral index, BIS)。麻醉诱导前10 min静输1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 右美托咪定(批号:H 12070534,江苏恒瑞医药股份有限公司),0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 持续输注至术毕;诱导麻醉静注0.05 mg/kg咪达唑仑、3~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼、1.5~2.5 mg/kg丙泊酚、0.15 mg/kg顺式阿曲库铵,气管插管机械通气,潮气量8~10 mL/kg,氧流量1~2 L/min,吸呼比1:2,通气频率10~15次/min,维持 $P_{\text{ET}}\text{CO}_2$  35~40 mmHg;麻醉维持静吸复合麻醉,静输2~6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 丙泊酚、0.1~0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 瑞芬太尼,吸入七氟醚,呼气末浓度1%~3%,静输0.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 顺式阿曲库铵维持肌松,适宜调整瑞芬太尼、七氟醚、丙泊酚浓度,维持BIS 40~55。

#### 1.2.2 检测

以非抗凝管取晨空腹静脉血2 mL,离心15 min,取血清,酶联免疫吸附法测SAA、PAB、

sTREM-1。试剂盒均为南京金斯瑞生物科技有限公司提供,资深专科医师参考试剂盒步骤规范完成。

### 1.3 观察指标

①对比两组术后1、3、5、7 d、血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值。②分析术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值相关性。③分析术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值诊断肺部感染的价值。④对比不同感染程度患者血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值。感染程度标准:存在感染性休克或需机械通气,符合一项或以上者为重度感染。⑤分析血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值与感染程度的关系。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 $\chi^2$ 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验;Pearson相关性系数分析术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值、感染程度的相关性; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组一般资料的比较

两组在年龄、性别、手术类型、体质量指数、手

术用时、通气时间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。见表1。

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

资料	感染组 ( $n=21$ )	未感染组 ( $n=61$ )	$\chi^2/t$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	40.31±5.33	41.10±5.16	0.600	0.550
性别(男/女)	12/9	34/27	0.013	0.911
手术类型			0.010	0.919
肝、胆	13(61.90)	37(60.66)		
胃部	8(38.10)	24(39.34)		
体质量指数 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	21.46±1.33	20.96±1.22	1.583	0.117
手术用时(h)	2.49±0.46	2.53±0.50	0.322	0.748
通气时间(min)	133.12±31.64	129.87±29.55	0.427	0.671

### 2.2 两组术后血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值

两组术后1 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );感染组术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值达到高峰,且术后3、5、7 d高于未感染组( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 两组术后血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Serum SAA, sTREM-1, and CRP/PAB ratios ( $\bar{x} \pm s$ )

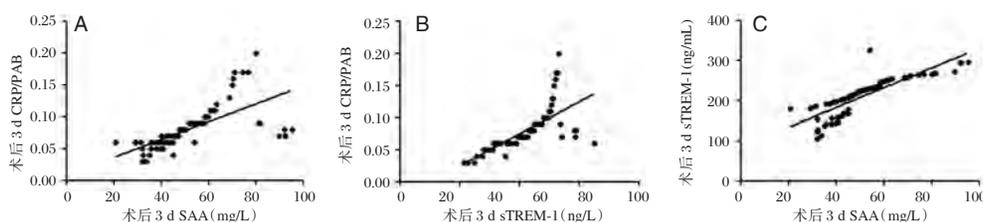
时间	组别	$n$	术后1 d	术后3 d	术后5 d	术后7 d
SAA( $\text{mg}/\text{L}$ )	感染组	21	35.42±6.28	64.11±21.37	51.04±15.24	40.78±10.07
	未感染组	61	37.27±8.41	40.06±13.30	24.07±7.69	13.71±4.10
	$t$ 值		0.922	5.899	10.533	17.366
	$P$ 值		0.359	<0.001	<0.001	<0.001
sTREM-1( $\text{ng}/\text{mL}$ )	感染组	21	206.29±57.41	267.53±60.04	218.49±50.71	170.56±41.25
	未感染组	61	202.44±52.09	210.14±53.30	174.06±38.46	132.02±29.14
	$t$ 值		0.285	4.120	4.195	4.674
	$P$ 值		0.777	<0.001	<0.001	<0.001
CRP/PAB比值	感染组	21	0.10±0.04	0.30±0.10	0.23±0.07	0.15±0.04
	未感染组	61	0.09±0.03	0.12±0.04	0.07±0.02	0.04±0.01
	$t$ 值		1.206	11.696	16.194	19.949
	$P$ 值		0.232	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值相关性

Pearson相关性,术后3 d血清SAA( $r_1=0.845$ ;  $r_2=0.671$ )与sTREM-1、CRP/PAB比值呈正相关,sTREM-1( $r=0.784$ )与CRP/PAB比值呈正相关( $P < 0.01$ ),见图1。

### 2.4 术后3 d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值诊断价值

血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB联合诊断术后肺部感染的AUC值为0.876,大于SAA 0.768、sTREM-1 0.701、CRP/PAB 0.786( $P < 0.01$ ),见表3、图2。



注:A为SAA与CRP/PAB相关性;B为sTREM-1与CRP/PAB相关性;C为SAA与sTREM-1相关性

图1 术后3d血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值相关性

Figure 1 Correlation between serum SAA, sTREM-1, and CRP/PAB ratios at 3 days after surgery

表3 诊断价值

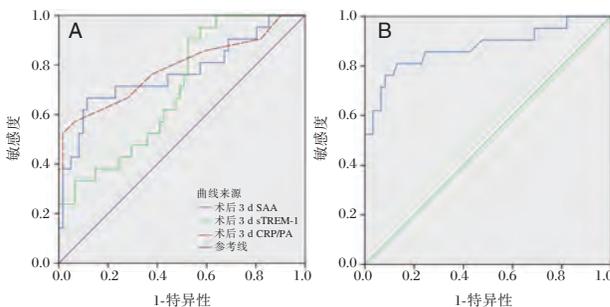
Table 3 Diagnostic value

指标	AUC	95%CI	截断值	敏感度 (%)	特异度 (%)
SAA	0.768	0.662~0.854	>58.4	66.67	88.52
sTREM-1	0.701	0.590~0.797	>210.3	90.48	47.54
CRP/PAB 比值	0.786	0.682~0.869	>0.1	52.38	98.36
三者联合	0.876	0.785~0.939	-	76.19	91.80

表4 不同感染程度患者血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB 比值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of serum SAA, sTREM-1, CRP/PAB ratios in patients with different infection ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	重度感染患者 (n=8)	轻度感染患者 (n=13)	t值	P值
SAA(mg/L)	73.96±17.03	58.05±13.29	2.396	0.027
sTREM-1 (ng/mL)	288.85±40.16	254.41±31.22	2.204	0.040
CRP/PAB 比值	0.35±0.07	0.27±0.04	3.355	0.003



注:A为SAA、sTREM-1、CRP/PAB诊断肺部感染的ROC曲线; B为SAA、sTREM-1、CRP/PAB联合诊断肺部感染的ROC曲线

图2 ROC曲线

Figure 2 ROC curve

### 2.5 不同感染程度患者血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值

术后3d,其中在重度感染(8例),轻度感染(13例)中,重度感染患者血清SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值高于轻度感染患者,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表4。

### 2.6 SAA、sTREM-1、CRP/PAB比值与感染程度的关系

Spearman秩相关分析,血清SAA( $r=0.512$ )、sTREM-1( $r=0.0473$ )、CRP/PAB( $r=0.608$ )比值与感染程度呈正相关,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

药物、通气时间、手术用时等均为全身麻醉手术术后肺部感染、谵妄常见可逆性诱因<sup>[8-9]</sup>。本研究在排除上述影响因素后发现,超过20% SP患者行上腹部全身麻醉手术后发生肺部感染,与相关报道<sup>[10]</sup>一致。因此,临床需积极完善相关预警机制。

SAA是炎症介质刺激肝脏生成的一种急性时相反应功能因子<sup>[11]</sup>。学者丁红辉等<sup>[12]</sup>研究显示,SAA可直接抑制革兰氏阴性菌活性,具有内源性免疫调节因子作用,可增强机体对病原体清除能力,认为SAA是有益炎症因子。本研究结果显示,术后1d感染患者、未感染患者血清SAA均较正常值显著升高,表明手术创伤可能增加机体炎症刺激,诱发SAA mRNA转录表达。研究指出,SAA也可通过激活单核细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞释放IL-17、IL-23等炎症介质强化机体炎症反应<sup>[13]</sup>。推测SAA不仅是炎症标志物,同时还是炎症信号触发剂,可能参与、介导机体炎症反应发生、发展过程。本研究显示,术后3d血清SAA表达达到峰值,随时间延长其表达逐渐降低,但感染组高于未感染组。炎症反

应时 SAA 经 N 端结合高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein, HDL) 可置换已与 HDL 结合的载脂蛋白 A2I (ApoA2I) 形成急性时相 SAA/ HDL 复合体, 对巨噬细胞亲和力可提高 2~3 倍, 与此同时, 巨噬细胞吞噬外周血 SAA<sup>[14]</sup>。此生理机制可能是术后血清 SAA 表达逐渐降低的主要原因, 但感染组患者受病原体侵害, 机体炎症反应强烈, 故降低缓慢<sup>[15]</sup>。本研究还发现, 血清 SAA 与术后肺部感染程度密切相关, 可为临床评估病情提供数据支持。

sTREM-1 是 TREM-1 的可溶性形式, 其具有促炎症反应、激发、放大炎症反应作用<sup>[16-17]</sup>。目前有关 sTREM-1 在感染性疾病中的诊断价值一直存有争议。分析可能与二者病例来源及检测方法不同有关。

PAB 是肝细胞生成快速转运蛋白之一, 作为非特异性防御物质, 可在清除有害代谢产物的同时被逐渐消耗, 与炎症反应呈负相关; CRP 由肝脏生成, 机体存在细菌感染、急性炎症、组织损害时, 外周血表达迅速升高, 治愈后可快速恢复至正常水平。本研究结果表明血清 SAA、sTREM-1、CRP/PAB 联合诊断术后肺部感染, 可为临床早期诊断、评估病情提供数据支持。

综上, SP 患者上腹部全身麻醉手术术后肺部感染存在血清 SAA、sTREM-1 水平、CRP/PAB 比值升高现象, 且与感染严重程度关系密切, 在术后肺部感染中具有较高诊断价值, 可为临床诊断、病情评估提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Cloutier M, Aigbogun MS, Guerin A, et al. The Economic Burden of Schizophrenia in the United States in 2013 [J]. *J Clin Psychiatry*, 2016, 77(6): 764-771.
- [2] 白延智, 辛学东. 加深麻醉对改善 MECT 后谵妄的作用 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2019, 41(2): 118-120.
- [3] 孙媛, 王莉, 陈欢, 等. 右美托咪定对精神分裂症患者术后谵妄的预防效果 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(3): 268-271.
- [4] 熊石龙, 王治伟, 迟琼, 等. 急性胰腺炎患者血清瘦素、血清淀粉样蛋白 A 及降钙素原的动态变化及临床意义 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2019, 25(4): 466-470.
- [5] Brynjolfsson SF, Magnusson MK, Kong PL, et al. An Antibody Against Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) Dampens Proinflammatory Cytokine Secretion by Lamina Propria Cells from Patients with IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(8): 1803-1811.
- [6] 段莉莉. 感染性休克患者 CRP/ALB 比值对预测急性呼吸窘迫综合征的临床价值 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(6): 630-632.
- [7] Korean Neuropsychiatric Association. Korean Guidelines for the Pharmacological Treatment of Social Anxiety Disorder: Initial Treatment Strategies [J]. *Psychiatry Investig*, 2018, 15(2): 147-155.
- [8] Aslaner MA, Boz M, Çelik A, et al. Etiologies and Delirium Rates of Elderly ED Patients with Acutely Altered Mental Status: A Multicenter Prospective Study [J]. *Am J Emerg Med*, 2017, 35(1): 71-76.
- [9] Miu DK, Chan CW, Kok C. Delirium among elderly patients admitted to a post-acute care facility and 3-months outcome [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2016, 16(5): 586-592.
- [10] 潘伟盟. 老年精神分裂症患者肺部感染的临床特征及应对措施探讨 [J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(21): 3305-3307.
- [11] Siegmund SV, Schlosser M, Schildberg FA, et al. Serum Amyloid A Induces Inflammation, Proliferation and Cell Death in Activated Hepatic Stellate Cells [J]. *Plos One*, 2016, 11(3): e0150893.
- [12] 丁红辉, 王成刚. 血清淀粉样蛋白 A 与 C-反应蛋白比值在鉴别诊断儿童病毒与细菌感染性疾病中的价值 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(21): 3165-3166, 3169.
- [13] 吴玉芹, 奎莉越, 赵晓芬, 等. C-反应蛋白、血清淀粉酶 A 蛋白及中性粒细胞表面抗原 CD64 对新生儿感染性疾病的早期诊断价值 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(5): 327-331.
- [14] Zhu S, Wang Y, Chen W, et al. High-density lipoprotein (HDL) counter-regulates serum amyloid A (SAA)-induced sPLA2-IIe and sPLA2-V expression in macrophages [J]. *Plos One*, 2016, 11(11): e0167468.
- [15] De Buck M, Gouw M, Berghmans N, et al. COOH-terminal SAA1 peptides fail to induce chemokines but synergize with CXCL8 and CCL3 to recruit leukocytes via FPR2 [J]. *Blood*, 2018, 131(4): 439-449.
- [16] Dai D, Xiong W, Fan Q, et al. Association of decreased serum sTREM-1 level with the severity of coronary artery disease: Inhibitory effect of sTREM-1 on TNF- $\alpha$ - and oxLDL-induced inflammatory reactions in endothelial cells [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(37): e4693.
- [17] Ketelut-Carneiro N, Ghosh S, Levitz SM, et al. A Dectin-1-caspase-8 pathway licenses canonical caspase-1 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  release in response to a pathogenic fungus [J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(2): 329-339.

## 血清 TSP-1、PDGF 预测脑出血短期预后的临床价值

高阳阳<sup>1\*</sup> 李骥腾<sup>2</sup>

**【摘要】目的** 研究血清血小板反应蛋白1(TSP-1)、血小板源性生长因子(PDGF)预测脑出血短期预后的临床价值。**方法** 选取2017年3月至2019年2月期间本院收治的65例ICH患者,随访90 d,5例患者因自身因素退出研究,根据改良版Rankin量表评分将患者分成预后良好组( $n=37$ )和预后不良组( $n=23$ )。单因素分析两组患者基线资料,并对差异有统计学意义的指标行非条件Logistic回归分析,探究脑出血预后不良独立影响因素并建立预测模型。**结果** 两组患者在体质量指数、高血压、血肿体积、NIHSS评分、肺部感染、破入脑室及空腹血糖等指标比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); Logistic回归分析表明高血压( $OR=1.275$ , 95% $CI$ : 1.052~1.545)、空腹血糖( $OR=1.551$ , 95% $CI$ : 1.219~1.974)、血肿体积( $OR=1.368$ , 95% $CI$ : 1.124~1.664)、NIHSS评分( $OR=2.537$ , 95% $CI$ : 1.109~5.802)、TSP-1( $OR=2.659$ , 95% $CI$ : 1.202~5.881)及PDGF( $OR=3.086$ , 95% $CI$ : 1.324~7.197)等6项指标是脑出血短期预后独立影响因素( $P<0.05$ );根据ROC曲线可得,TSP-1诊断的临界值为121.23 ng/mL,其对应的灵敏度为78.26%,特异度为78.38%,AUC为0.877(95% $CI$ : 0.782~0.971);PDGF诊断的临界值为369.34 ng/L,其对应的灵敏度为73.91%,特异度为70.27%,AUC为0.778(95% $CI$ : 0.638~0.918);在最佳临界切点时,联合检测方法为平行检测,其灵敏度为86.96%,特异度为67.57%,AUC为0.943(95% $CI$ : 0.881~1.000),有评估价值。**结论** 高血压、空腹血糖、血肿体积、NIHSS评分、血清TSP-1和PDGF等指标是脑出血短期预后不良的独立危险因素,且血清TSP-1和PDGF单独或联合诊断可应用于预测其短期预后不良。

**【关键词】** 血小板源性生长因子;血小板反应蛋白1;脑出血;短期预后;临床价值

### Clinical value of serum TSP-1 and PDGF in evaluating short-term prognosis in patients with intracerebral hemorrhage

GAO Yangyang<sup>1\*</sup>, LI Jieng<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology, Bayannaer Hospital, Bayannaer, Inner Mongolia, China, 015000;

2. Department of Neurology, Bayannaer Hospital, Bayannaer, Inner Mongolia, 015000)

**【ABSTRACT】Objective** To study the clinical value of serum TSP-1 and PDGF in evaluating short-term prognosis in patients with intracerebral hemorrhage. **Methods** 65 cases of patients with intracerebral hemorrhage (ICH) from March 2017 to February 2019 in our hospital were retrospectively analyzed. After 90 days of follow-up, 5 patients withdrew from the study because of their personal reasons. The patients were divided into favorable outcome group ( $n=37$ ) and unfavorable outcome group ( $n=23$ ) depending on modified Rankin scale scores. The basic information and treatment of patients in the two groups were compared using single factor analysis, and the significantly different single factors were analyzed by non-conditional logistic regression analysis. Finally, the dangerous factors for poor prognosis were established. **Results** There were significant differences in body mass index, hypertension, hematoma volume, NIHSS score, pulmonary

基金项目:巴彦淖尔市科学技术项目(201608A036)

作者单位:1. 巴彦淖尔市医院神经内二科,内蒙古,巴彦淖尔 015000

2. 巴彦淖尔市医院神经外科,内蒙古,巴彦淖尔 015000

\*通信作者:高阳阳, E-mail: laxiong954@163.com

infection, broken ventricle and fasting blood glucose between the two groups. Logistic regression analysis show that hypertension ( $OR=1.275$ ,  $95\%CI: 1.052\sim 1.545$ ), fasting blood glucose ( $OR=1.551$ ,  $95\%CI: 1.219\sim 1.974$ ), hematoma volume ( $OR=1.368$ ,  $95\%CI: 1.124\sim 1.664$ ), NIHSS score ( $OR=2.537$ ,  $95\%CI: 1.109\sim 5.802$ ), TSP-1 ( $OR=2.659$ ,  $95\%CI: 1.202\sim 5.881$ ) and PDGF ( $OR=3.086$ ,  $95\%CI: 1.324\sim 7.197$ ) are independent poor prognostic factors of intracerebral hemorrhage ( $P<0.05$ ). According to the ROC curve, the diagnostic criterion of TSP-1 was 121.23 ng/mL, the corresponding sensitivity, specificity and AUC were 78.26%, 78.38% and 0.877 ( $95\%CI: 0.782\sim 0.971$ ), respectively. The diagnostic criterion of PDGF was 369.34 ng/L, the corresponding sensitivity, specificity and AUC were 73.91%, 70.27%, 0.778 ( $95\%CI: 0.638\sim 0.918$ ), respectively. At the optimal critical cut-off point, the joint detection method is parallel detection, with a sensitivity of 86.96%, a specificity of 67.57%, and an AUC of 0.943 ( $95\%CI: 0.881\sim 1.000$ ), which has evaluation value. **Conclusion** Hypertension, fasting blood glucose, hematoma volume, NIHSS score, serum TSP-1 and PDGF are independent risk factors for poor short-term prognosis of cerebral hemorrhage and serum TSP-1 and PDGF alone or in combination can be used to predict their short-term poor prognosis.

[KEY WORDS] Platelet-derived growth factor; Thrombospondin-1; Intracerebral hemorrhage; Short-term prognosis; Clinical value

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是指机体在非外伤的基础上发生脑实质内血管破坏的脑部疾病,可致患者昏迷、意识模糊、肢体瘫痪及失语等症状。ICH具有发病迅速、病情严重及高死亡率等特点,严重威胁患者生命安全<sup>[1-2]</sup>。研究发现<sup>[3]</sup>,ICH病生理机制影响,病情进展过程机体将引起生物化学标志物异常改变。血小板反应蛋白1(thrombospondin-1, TSP-1)归属于调节性基质糖蛋白,其在刺激血小板、内皮细胞等的合成和分泌方面具有一定的作用,且其在ICH患者体内呈异常表达状态<sup>[4]</sup>。而血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)在成纤维、平滑肌及神经胶质等细胞或组织中合成、生长并分泌,主要应用于表征机体神经功能,ICH会伴随意识不清、失语等神经功能损伤,因而推测其可能与ICH的发生、发展及预后有一定的关系<sup>[5]</sup>。因此本研究观察ICH不同预后结局患者TSP-1、PDGF表达水平,探讨血清TSP-1和PDGF对预测ICH预后的临床价值,旨在为临床改善ICH患者预后和生活质量提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2017年3月至2019年2月期间本院收治的65例ICH患者,所有患者均参照ICH治疗指南行相应的治疗方法<sup>[6]</sup>,随访90d,5例患者因自身因素退出研究,根据改良版Rankin量表<sup>[7]</sup>评分将患者分成预后良好组(0~2分,  $n=37$ )和预后不良组(3~6分,  $n=23$ )。实验经本院伦理委员会审核并批准。

纳入标准:①所有患者均符合脑出血临床诊断标准<sup>[3]</sup>,且为首次发作;②发病至入院时间不超过24h;③年龄范围18~75岁;④临床病例资料齐全、完整;⑤患者及其家属知情同意本研究。排除标准:①动脉瘤或手术等引发的继发性出血;②近三个月内使用抗血小板或抗凝药物;③合并肿瘤、自身免疫疾病或全身炎症者;④近3个月有重大手术者;⑤合并重要脏器官损伤者;⑥不配合者。

### 1.2 血清TSP-1和PDGF检测

分别于患者入院治疗前采集患者空腹肘静脉血约10mL,采用德国Hettich ROTOFIX32A离心机以2500r/min的速度,温度0℃条件下离心15min,获得上清液,即为目标血清。应用美国BIOTEK全自动酶标仪酶联免疫吸附法测定血清TSP-1和PDGF水平,本研究使用的试剂盒来自上海机纯实业有限公司。

### 1.4 基线资料收集

研究人员自行设计调查问卷收集患者基线资料,内容包括性别、年龄、民族、居住地体质量指数( $<18.5\text{ kg/m}^2$ 为体重过轻; $18.5\sim 24.0\text{ kg/m}^2$ 为正常; $>24.0\text{ kg/m}^2$ 为肥胖)、高血压、高血脂及烟酒史等人口学资料;水肿位置、水肿体积、入院时美国国立卫生院卒中量表NIHSS评分<sup>[8]</sup>(0~15分,正常、轻度或中度中风;16~20分,中重度中风;21~42分,重度中风)、手术治疗、破入脑室及肺部感染等疾病资料;空腹血糖( $<7.0\text{ mmol/L}$ ,正常血糖; $>7.0\text{ mmol/L}$ ,高血糖)、脂代谢指标等入院时血液指标等。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 行  $t$  检验; 计数资料以  $n(\%)$  表示, 比较采用  $\chi^2$  检验, Logistic 回归分析影响因素, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基线资料比较

两组患者在体质量指数、高血压、血肿体积、NIHSS 评分、肺部感染、破入脑室及空腹血糖等指标比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 血清 TSP-1 和 PDGF 比较

预后不良组患者血清 TSP-1、PDGF 明显高于预后良好组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.3 Logistic 回归分析

以单因素分析中差异有统计学意义的指标为自变量, 以 90 d 治疗预后是否良好为因变量, 行非条件 Logistic 回归分析。Logistic 回归分析表明高血压、空腹血糖、血肿体积、NIHSS 评分、TSP-1 及 PDGF 等 6 项指标是脑出血短期预后独立影响因素, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.4 单独检测及联合检测诊断效能

以血清 TSP-1 和 PDGF 作为检验变量, 以预后是否良好作为状态标量, 以敏感度为 X 轴, 以“1-特异性”为 Y 轴绘制得 ROC 曲线 (见图 1)。根据 ROC 曲线可得, TSP-1 诊断的临界值为 121.23 ng/mL; PDGF 诊断的临界值为 369.34 ng/L; 在最佳临界切点时, 联合检测方法为平行检测, 具有评估价值。

3 讨论

ICH 是指因高血压、血管畸形或情绪激动等因素诱发脑实质血管破裂的危重症疾病, 具有高致死率和高致残率等特点<sup>[9]</sup>。针对 ICH, 临床根据患者病情程度选择保守治疗或手术治疗等形式, 以降低颅内压和恢复神经功能<sup>[10]</sup>。ICH 疾病预后与病情严重程度、意识及基础疾病等有关, 而临床尚无有效的预测指标<sup>[11]</sup>。血清 TSP-1 在 ICH 患者体内异常表达, 而血清 PDGF 与神经功能的变化存在一定的相关性<sup>[12-13]</sup>, 因而推测其与 ICH 预后存在关联, 但其具体应用于 ICH 短期预后研究较少。

表 1 两组患者基线资料对比 [ $n(\%)$ ]

Table 1 Comparison of baseline data between the two groups [ $n(\%)$ ]

因素	预后良好组 ( $n=37$ )	预后不良组 ( $n=23$ )	$t/\chi^2$ 值	P 值
人口学资料				
男性	24(64.86)	18(78.26)	1.212	0.271
年龄			0.519	0.471
$\geq 60$ 岁	19(51.35)	14(60.87)		
$< 60$ 岁	18(48.65)	9(39.13)		
民族			0.159	0.690
汉族	29(78.38)	19(82.61)		
其他	8(21.62)	4(17.39)		
居住地			0.071	0.791
农村	19(51.35)	11(47.83)		
城镇	18(48.65)	12(52.17)		
体质量指数			6.348	0.042
$< 18.5$ kg/m <sup>2</sup>	3(8.11)	4(17.39)		
18.5~24.0 kg/m <sup>2</sup>	28(75.68)	10(43.48)		
$> 24.0$ kg/m <sup>2</sup>	6(16.21)	9(39.13)		
高血压	7(18.92)	10(43.48)	4.213	0.040
高血脂	13(35.14)	7(30.43)	0.141	0.707
吸烟史	11(29.73)	5(21.74)	0.463	0.496
饮酒史	10(27.03)	4(17.39)	0.736	0.391
疾病资料				
血肿位置			0.306	0.858
深部	11(29.73)	7(30.43)		
脑叶	14(37.84)	10(43.48)		
幕下	12(32.43)	6(26.09)		
血肿体积			5.157	0.023
$< 30$ mL	24(64.86)	8(34.78)		
$\geq 30$ mL	13(35.14)	15(65.22)		
入院时 NIHSS 评分			6.155	0.046
0~15 分	13(35.14)	4(17.39)		
16~20 分	16(43.24)	7(30.43)		
21~42 分	8(21.62)	12(52.18)		
手术治疗	16(43.24)	8(34.78)	0.423	0.515
破入脑室	13(35.14)	15(65.22)	5.157	0.023
肺部感染	12(32.43)	14(60.87)	4.671	0.031
入院时血液指标				
总胆固醇			0.227	0.893
$< 5.18$ mmol/L	14(37.84)	9(39.13)		
5.18~6.22 mmol/L	13(35.13)	9(39.13)		
$> 6.22$ mmol/L	10(27.03)	5(21.74)		
甘油三酯			1.045	0.593
$< 1.70$ mmol/L	13(35.14)	8(34.78)		
1.70~2.26 mmol/L	12(32.43)	10(43.48)		
$> 2.26$ mmol/L	12(32.43)	5(21.74)		
低密度脂蛋白			2.488	0.288
$< 3.37$ mmol/L	15(40.54)	10(43.48)		
3.37~4.14 mmol/L	11(29.73)	10(43.48)		
$> 4.14$ mmol/L	11(29.73)	3(13.04)		
高密度脂蛋白			1.227	0.542
$< 1.04$ mmol/L	14(37.84)	11(47.83)		
1.04~1.55 mmol/L	12(32.43)	8(34.78)		
$> 1.55$ mmol/L	11(29.73)	4(17.39)		
空腹血糖			4.671	0.031
$< 7.0$ mmol/L	25(67.57)	9(39.13)		
$\geq 7.0$ mmol/L	12(32.43)	14(60.87)		

表2 两组患者血清TSP-1和PDGF水平对比( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum TSP-1 and PDGF value between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TSP-1 (ng/mL)	PDGF (ng/L)
预后良好组	37	102.47±18.65	341.34±32.59
预后不良组	23	165.34±10.76	421.32±52.60
t值		16.548	8.205
P值		<0.001	<0.001

表3 Logistic回归分析结果

Table 3 Result of logistic regression

自变量	B值	S.E值	Wald值	P值	OR值	95%CI
高血压	0.243	0.098	6.148	0.013	1.275	1.052~1.545
空腹血糖	0.439	0.123	12.739	<0.001	1.551	1.219~1.974
血肿体积	0.313	0.100	9.797	0.002	1.368	1.124~1.664
NIHSS评分	0.931	0.422	4.867	0.027	2.537	1.109~5.802
TSP-1	0.978	0.405	5.831	0.016	2.659	1.202~5.881
PDGF	1.127	0.432	6.806	0.009	3.086	1.324~7.197
常数项	-0.564	0.121	21.726	<0.001	-	-

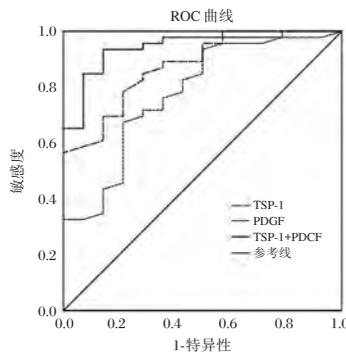


图1 Logistic回归预测模型ROC曲线图

Figure 1 ROC curve of the prediction model based on Logistic regression analysis

Logistics回归分析显示,高血压、空腹血糖、血肿体积和NIHSS评分等指标是ICH患者短期预后不良的独立影响因素。分析认为,持续高血压会使小动脉管壁发生玻璃样病变,扩张局部血管,形成微小动脉瘤,进而发生血肿等脑部并发症<sup>[14]</sup>。高血糖与脑出血的发生、发展有关,持续高血糖增强机体脑细胞无氧代谢,增加乳酸等毒性物质;同时高血糖增加过剩氧自由基生成,诱发炎症反应,加重神经损伤,引发脑出血<sup>[15]</sup>。血肿不仅压迫脑组织结构,损伤机体神经功能,而且还会诱发占位效应,增加脑疝的发生几率,且血肿体积愈大,ICH患者预后越差<sup>[16]</sup>。NIHSS评分是临床公认的评估脑部疾病的指标,可判断ICH患者神经功能损伤程度,而ICH患者均会出现一定程度的神经功能

损伤或意识模糊,影响预后恢复<sup>[17]</sup>。

血清TSP-1是基质糖蛋白,其可与多种功能区域的相应受体结合,具有聚集血小板、促进平滑肌组织增殖和拮抗内皮细胞生长等生理学功能<sup>[18]</sup>。当ICH发生时,TSP-1浓度异常增高,其可促进基因金属蛋白酶的表达,进而降解细胞外基质组成,破坏血管通透性而引发血肿<sup>[19]</sup>。PDGF是一类碱性蛋白质,正常情况下其存在于血小板α颗粒;而脑出血发生后,凝血过程会激活沉寂的PDGF,诱导巨噬细胞、血管平滑肌细胞等大量合成并分泌PDGF,进而发挥促进分裂、收缩血管及趋化细胞等生理功能<sup>[20]</sup>。针对上述诸指标,临床需制定适宜的方案,首先需提高患者血糖和血压管理意识,降低其对ICH患者的继发损伤;针对神经功能损伤严重者,临床需对症治疗,改善患者意识不清;针对血肿体积严重者,在开颅清除术等治疗方式后应住院观察,密切观察血肿清除情况;血清TSP-1和PDGF均可表征ICH病情程度,临床需密切关注其变化规律,适当降低其表达,以改善ICH患者短期预后。

综上所述,高血压、空腹血糖、血肿体积、NIHSS评分、血清TSP-1和PDGF等指标是脑出血短期预后不良的独立危险因素,且血清TSP-1和PDGF单独或联合诊断可应用于预测其短期预后不良,临床应根据其指标水平积极制定干预措施,以降低短期预后发生率,改善患者生活质量。

### 参考文献

- [1] Li W, Jin C, Vaidya A, et al. Blood pressure trajectories and the risk of intracerebral hemorrhage and cerebral infarction[J]. Hypertension, 2017, 70(3):508-514.
- [2] Hung LC, Sung SF, Hsieh CY, et al. Erratum to "Validation of a novel claims-based stroke severity index in patients with intracerebral hemorrhage" [J Epidemiol 27 (1) (2017) 24-29] [J]. J Epidemiol, 2017, 27(9): 451-453.
- [3] 王瑞彤,秦雪颖,李继来.急性脑出血患者血浆MMP-9、TIMP-1动态变化及与脑出血水肿的相关性[J].热带医学杂志, 2017, 17(3):373-375.
- [4] Kim DH, Lim H, Lee D, et al. Thrombospondin-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells rescues neurons from synaptic dysfunction in Alzheimer's disease model[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):354.
- [5] Roswall P, Bocci M, Bartoschek M, et al. Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling[J]. Nature Medicine, 2018, 24(4):463-473.
- [6] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血

- 管病学组. 中国脑出血诊治指南(2014)[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(6): 435-444.
- [7] Georgievski-Brkic B, Savic M, Nikolic D, et al. Evaluation of functional outcome measured by modified Rankin scale in rtPA treated patients with acute ischemic stroke[J]. Arch Ital Biol, 2016, 154(4): 125-132.
- [8] Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)[J]. J Physiother, 2014, 60(1):61.
- [9] 李萍, 赵树明, 胡亚男, 等. 脑出血发病机制研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(2): 214-215.
- [10] Giakoumettis D, Alexiou GA, Vrachatis DA, et al. Anti-thrombotic treatment management in patients with intracerebral hemorrhage: reversal and restart [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(9):1392-14-5.
- [11] Spina S, Marzorati C, Vargiolu A, et al. Intracerebral hemorrhage in Intensive Care Unit: early prognostication fallacies. A single center retrospective study [J]. Minerva Anestesiol, 2018, 84(5):572-581.
- [12] 彭彤, 罗超, 肖刚, 等. 高血压脑出血患者急性期血清 TSP1/2、MMP2/9 与脑血肿量及脑水肿量的关系研究[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(12): 1649-1652.
- [13] Cates CC, Arias AD, Wong LSN, et al. Regression/Eradication of gliomas in mice by a systemically-deliverable ATF5 dominant-negative peptide [J]. Oncotarget, 2016, 7(11): 12718-12730.
- [14] Roh D, Sun CH, Schmidt JM, et al. Primary intracerebral hemorrhage: a closer look at hypertension and cerebral amyloid angiopathy[J]. Neurocrit Care, 2018, 29(1):77-83.
- [15] 韩莉莎, 王琼, 李丹, 等. 普伐他汀联合美托洛尔对糖尿病合并冠心病患者心功能、糖脂代谢等相关指标的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3):224-228.
- [16] 张安娜, 肖娟, 张媛, 等. 基底节区脑出血患者水肿周围相对水肿体积与预后的相关性[J]. 临床神经病学杂志, 2018, 31(5):328-331.
- [17] 冯屹, 李斌, 谭卫, 等. 内镜辅助下经外侧裂手术对基底节区高血压性脑出血的效果及患者 NIHSS 评分的影响[J]. 河北医学, 2019, 25(5): 755-759.
- [18] Zhang J, Li CL, Zheng YN, et al. Inhibition of angiogenesis by arsenic trioxide via TSP-1-TGF- $\beta$ 1-CTGF-VEGF functional module in rheumatoid arthritis[J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 73529-73546.
- [19] Yang AL, Zhou HJ, Lin Y, et al. Thrombin promotes the expression of thrombospondin-1 and -2 in a rat model of intracerebral hemorrhage[J]. J Neurol Sci, 2012, 323(1):141-146.
- [20] Burchell SR, Tang J, Zhang JH. Hematoma expansion following intracerebral hemorrhage: mechanisms targeting the coagulation cascade and platelet activation [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(12): 1329-1344.

(上接第 486 页)

综上所述, LP(a)、OPN 及 *IRF-4* mRNA 在 DHVD 患者血清中存在异常表达, 与 DHVD 的发生发展密切相关, 在 DHVD 诊断方面具有较高应用价值, 且与患者治疗后心功能密切相关, 可应用于 DHVD 的诊断、病情及疗效评估。

## 参考文献

- [1] Chandrasekhar J, Dargas G, Mehran R. Valvular Heart Disease in Women, Differential Remodeling, and Response to New Therapies [J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2017, 19(9): 74.
- [2] Xu ZJ, Pan J, Zhou Q, et al. Analysis of the prevalence and risk factors of preoperative angiography confirmed coronary artery stenosis in patients with degenerative valvular heart disease [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2017, 45(4): 837-842.
- [3] 唐兰. 彩色多普勒超声在老年退行性心脏瓣膜病中的诊断价值分析[J]. 影像研究与医学应用, 2018, 2(1): 129-130.
- [4] 徐贞俊, 潘俊, 周庆, 等. 退行性心脏瓣膜病患者外科手术前冠状动脉造影阳性率及其相关因素分析[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(10): 837-842.
- [5] Caldeira D, David C, Costa J, et al. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease systematic review and meta-analysis [J]. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother, 2018, 4(2): 111-118.
- [6] 李春芝, 李素彦, 刘琼, 等. 退行性心脏瓣膜病患者血清骨桥蛋白水平、血浆 B 型利钠肽水平与心功能的关系[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(5): 459-462.
- [7] 郭文波, 徐会圃, 刘长梅. 脂蛋白相关磷脂酶 A2、脂蛋白(a)活性水平与退行性心脏瓣膜病的相关性[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(4): 46-50.
- [8] 胡程舟, 张卓, 陈文龙, 等. 干扰素调节因子 4 在风湿性心脏病中去泛素化作用的研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(4): 646-650.
- [9] 任崇雷, 姜胜利. 2014 年美国心脏瓣膜病指南解读[J]. 心血管外科杂志(电子版), 2015, 4(3): 8-11.
- [10] 胡法国, 杨麦广. 坎地沙坦酯联合氢氯噻嗪治疗老年退行性心脏瓣膜病心力衰竭的临床疗效及对预后的影响[J]. 中国合理用药探索, 2017, 14(11): 4-7.
- [11] 姚心琪, 张秀兰. 血浆脂蛋白 a 与冠状动脉粥样硬化病变程度相关性研究[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(5): 698-701.
- [12] Danny T. M. Leung, Pak-Leong Lim, Tak-Hong Cheung, et al. Osteopontin Fragments with Intact Thrombin - Sensitive Site Circulate in Cervical Cancer Patients [J]. Plos One, 2016, 11(8): e0160412.
- [13] 陈媛, 庞楠楠, 赵骁, 等. 囊型包虫病患者 Th9 细胞相关因子 mRNA 表达特点研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(8): 18-22.
- [14] 刘倩, 林羿, 张珺, 等. 干扰素调节因子 4 在母胎界面的表达特点及作用[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(5): 392-397.

# 剖宫产产妇术后感染患者血清 TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平的变化及其意义

仵晓峰<sup>1\*</sup> 王冉<sup>2</sup> 李宛玲<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 探讨剖宫产术后并发感染产妇血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、降钙素原(PCT)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的动态变化及其意义。方法 选取2015年1月至2017年12月本院产科确诊的80例剖宫产后并发感染的产妇作为病例组,同期实施剖宫产但未发生感染的160例产妇作为对照组,对比两组的血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平动态变化,采用受试者工作曲线分析3项指标鉴别诊断产后感染的价值。结果 在产后第1天,病例组和对照组的血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),病例组在产后第1、3、5天,血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平呈显著升高的趋势,在产后第3、5天高于对应时间点的对照组( $P<0.05$ );依据产后第3天血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平绘制ROC曲线,结果显示血清PCT、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平鉴别诊断产后感染的AUC值分别为0.888、0.766、0.751,对应的诊断临界值分别为1.26  $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 ng/mL、2.51 pg/mL( $P<0.05$ )。结论 剖宫产产妇术后感染患者血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平在早期呈明显的上升趋势,对其进行监测有利于病情诊断及指导临床治疗。

**[关键词]** 剖宫产;感染;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;降钙素原;白细胞介素-1 $\beta$ ;动态变化

## Changes and Significance of Serum TNF-alpha, PCT and IL-1beta Levels in Patients with Postoperative Infection after Cesarean Section

WU Xiaofeng<sup>1\*</sup>, WANG Ran<sup>2</sup>, LI Wanling<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Wolong District Maternal and child health hospital, Nanyang, Henan, China, 473000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang first people's Hospital, Nanyang, Henan, China, 473000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the dynamic changes of serum TNF- $\alpha$ , procalcitonin (PCT) and interleukin - 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ) in parturients with infection after cesarean section and their significance. **Methods** 80 cases of postpartum infection after cesarean section were selected as case group (January 2015 to December 2017) and 160 cases of postpartum infection without cesarean section were selected as control group. The dynamic changes of serum TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1beta levels were compared between the two groups. The value of three indicators in differential diagnosis of postpartum infection was analyzed by using the working curve of subjects. **Results** On the 1st day after delivery, there was no significant difference in serum TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1beta levels between the case group and the control group ( $P>0.05$ ). On the 1st, 3rd and 5th day after delivery, the levels of serum TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1beta in the case group increased significantly, and were higher than those in the control group on the 3rd and 5th day after delivery ( $P<0.05$ ).

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201806115)

作者单位:1. 南阳市卧龙区妇幼保健院妇产科,河南,南阳 473000

2. 南阳市第一人民医院妇产科,河南,南阳 473000

\*通信作者:仵晓峰, E-mail:545089160@qq.com

ROC was drawn according to the levels of serum TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1 $\beta$  on the 3rd day after delivery. The AUC values of serum PCT, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were 0.888, 0.766 and 0.751 respectively, and the corresponding diagnostic thresholds were 1.26  $\mu\text{g/mL}$ , 2.00  $\text{ng/mL}$  and 2.51  $\text{pg/mL}$  respectively ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Serum levels of TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1 $\beta$  in patients with infection after cesarean section showed an obvious upward trend in the early stage. Monitoring of the levels of TNF- $\alpha$ , PCT and IL-1 $\beta$  are conducive to the diagnosis and guidance of clinical treatment.

**[KEY WORDS]** Cesarean section; Infection; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Procalcitonin; Interleukin-1 $\beta$ ; Dynamic changes

临床上剖宫产术后感染的发生,能够导致孕产妇致残率的上升,增加了远期不能妊娠结局的发生风险<sup>[1-2]</sup>。对于剖宫产术后感染的早期诊断具有重要的意义,其能够在指导疾病的早期抗感染治疗方面发挥作用。血清学细胞因子的检测,可以为临床上相关感染性基本的诊疗提供参考。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是炎症性相关因子,其能够通过诱导下游白细胞介素家族因子的激活,进而促进相关细胞因子对于子宫内膜的损伤<sup>[3]</sup>;降钙素原(procalcitonin, PCT)是病原体感染的指标,在细菌或者混合感染的患者中,脂多糖的释放能够显著促进PCT的上升<sup>[4]</sup>;白细胞介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )是白细胞介素家族成员,其能够通过提高下游炎症性信号通路的激活,最终促进剖宫产术后感染的发生<sup>[5]</sup>。为了揭示TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的表达及其与剖宫产术后感染的关系,从而为临床上剖宫产术后感染的诊断提供参考,本次研究选取本院产科确诊剖宫产后并发感染的产妇作为病例组,探讨了TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的表达及其诊断学价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取2015年1月至2017年12月本院产科确诊的80例剖宫产后并发感染的产妇作为病例组,同期实施剖宫产但未发生感染的160例产妇作为对照组。年龄22~38岁,平均(28.4 $\pm$ 2.6)岁,分娩孕周(38.2 $\pm$ 1.0)周;其中初产妇62例、经产妇18例;其中41例患者经细菌学培养阳性(铜绿假单胞菌12例、鲍氏不动杆菌8例、肺炎克雷伯杆菌4例、大肠埃希菌4例、金葡菌6例、表皮葡萄球菌3例、其他4例)。年龄22~39岁,平均(28.7 $\pm$ 2.3)岁,分娩孕周(38.4 $\pm$ 1.3)周;其中初产

妇117例、经产妇43例。入选标准:①所有产妇均具有典型的临床剖宫产指征,在本院实施剖宫产手术;②经血清学、细菌培养等实验室检查结合患者的临床表现等确诊为产后感染;③本研究符合《赫尔透辛基宣言》相关伦理及保密原则。④所有患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:①剖宫产术前伴有感染性疾病;②伴有免疫功能障碍、HIV感染的产妇;③合并其他系统的重大疾病。

### 1.2 检测方法

采用一次性静脉血采集器进行肘部静脉血采集,采集5 mL静脉血后自然放置,取上清液体进行检测。采用贝克曼库尔特公司UniCel DxI 800免疫发光仪器进行PCT的检测,配套试剂盒购自北京九强生物公司;采用ELISA法进行TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的检测,采用交叉交叉的方法进行抗原浓度的测定,采用碳酸盐缓冲液进行抗原稀释,加入96孔的酶标板中,盖好酶标板盖后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,蒸馏水冲洗3次,每次5 min,轻轻叩击酶标板甩干。每孔中加入5%的脱脂牛奶200  $\mu\text{L}$ ,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,蒸馏水冲洗3次,每次5 min,加入稀释好的抗体(购自abcum公司批号:20083845浓度1:800),蒸馏水冲洗3次,每次5 min,每孔中加入100  $\mu\text{L}$ 的底物,显色后在酶标仪上进行吸光度的检测。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计学处理,采用( $\bar{x} \pm s$ )表示符合正态分布的计量资料,两组间分析采用 $t$ 检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组产妇的血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 动态变化趋势比较

实验结果显示,病例组和对照组的血清

TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平在产后第1天至第5天的结果整体上存在差异,其中在产后第1天,病例组和对照组的血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平差异均不具有统计学意义( $P>0.05$ ),病例组在

产后第1、3、5天,血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平呈显著升高的趋势,在产后第3、5天局高于对应时间点的对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );见表1。

表1 两组产妇的血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 动态变化趋势比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of dynamic trends of serum TNF- $\alpha$ , PCT, IL-1 $\beta$  in two groups of women ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ (ng/mL)			PCT( $\mu$ g/mL)			IL-1 $\beta$ (pg/mL)		
	产后第1天	产后第3天	产后第5天	产后第1天	产后第3d	产后第5天	产后第1天	产后第3天	产后第5天
病例组	1.55 $\pm$ 0.32	2.67 $\pm$ 0.69	3.04 $\pm$ 0.55	0.81 $\pm$ 0.27	2.23 $\pm$ 0.69	2.52 $\pm$ 0.77	0.81 $\pm$ 0.27	2.23 $\pm$ 0.69	2.52 $\pm$ 0.77
对照组	1.48 $\pm$ 0.29	1.50 $\pm$ 0.31	1.44 $\pm$ 0.38	0.78 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.20	0.47 $\pm$ 0.15	0.78 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.20	0.47 $\pm$ 0.15
t值	1.702	18.125	26.334	0.875	27.184	32.528	0.875	27.184	32.528
P值	0.090	0.000	0.000	0.382	0.000	0.000	0.382	0.000	0.000

## 2.2 产后第3天血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平监测鉴别诊断产后感染的临床价值

依据产后第3天血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平绘制ROC曲线,结果显示血清PCT、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平鉴别诊断产后感染的AUC值分别为0.888、0.766、0.751,对应的诊断临界值分别为1.26  $\mu$ g/mL、2.00 ng/mL、2.51 pg/mL( $P<0.05$ );见图1。

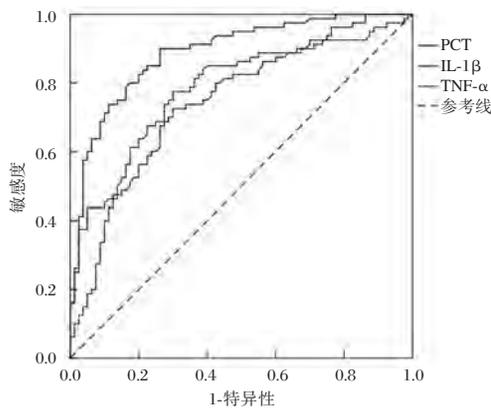


图1 产后第3天血清TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 水平诊断产后感染的ROC曲线

Figure 1 ROC curve of serum TNF- $\alpha$ , PCT, IL-1 $\beta$  on the third day of postpartum diagnosis of postpartum infection

## 3 讨论

流行病学研究表明,剖宫产术后感染的发病率可超过859/1万孕产妇左右<sup>[6]</sup>,在合并有基础性糖尿病或者妊娠期并发症的孕产妇中,剖宫产术

后感染的发病率可进一步的上升<sup>[7]</sup>。长期的临床随访观察研究发现,剖宫产术后感染孕产妇发生晚期产后出血的风险可超过5%以上,同时孕产妇的病死率也明显的上升<sup>[8]</sup>。血清学指标的检测,能够具有简便和经济的特点,在感染性疾病的诊断和预后评估过程中均具有一定的价值。现阶段主要通过超敏C反应蛋白或者白细胞介素6进而辅助早期诊断剖宫产术后感染,但依靠超敏C反应蛋白等评估剖宫产术后感染发病风险的灵敏度不足40%,其诊断剖宫产术后感染发病的假阳性率较高<sup>[9]</sup>。

肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)是一种能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性的细胞因子,分为TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 两种,TNF- $\alpha$ 是炎症性相关因子,其不仅能够通过诱导下游单核细胞的激活,同时还能够增加其对于子宫内膜或者宫颈组织的浸润程度,加剧盆腔脏器的炎症性损害,TNF- $\alpha$ 还能够通过激活体内的金属基质蛋白酶因子,提高其对于细胞间质成分的分解,从而提高了炎症因子的扩散风险;PCT是一种蛋白质,当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时它在血浆中的水平升高。自身免疫、过敏和病毒感染时PCT不会升高,上升的PCT能够提高其对于中性粒细胞的激活能力,加剧病原体的入侵风险;IL-1(interleukin-1, IL-1)又名淋巴细胞刺激因子,主要由活化的单核-巨噬细胞产生,有IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 两种存在形式,IL-1 $\beta$ 是白细胞介素家族因子,其对于子宫剖宫产

术后切口部位的浸润,能够影响到局部剖宫产切口的感染微环境,部分研究者探讨了PCT的表达与剖宫产术后感染的关系,认为PCT的表达上升与剖宫产术后感染密切相关<sup>[10]</sup>,但缺乏对于IL-1 $\beta$ 等的分析研究。

本次研究结果提示了TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的表达浓度的逐渐上升与剖宫产术后感染密切相关,这可以从下列几个方面进行理解<sup>[11-14]</sup>:①剖宫产术后感染的孕产妇,其体内的炎症反应的激活具有显著的正反馈作用,从而逐渐放大了炎症性因子的激活和释放程度,促进了TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的逐渐上升;②剖宫产术后感染的孕产妇,其子宫内膜或者宫颈局部创面的损伤,能够进一步提高病原体的入侵风险,从而进一步提高了病原体扩增诱导的炎症因子的释放。陈怡等<sup>[15]</sup>研究者也发现,在剖宫产术后感染的孕产妇中,TNF- $\alpha$ 的表达浓度可平均上升40%以上,同时在合并有明显的产褥期感染或者子宫复旧不良的孕产妇中,TNF- $\alpha$ 的表达浓度的上升更为显著。本实验结果提示了临床上对于高度怀疑术后感染的孕产妇,在在术后第三天开始早期进行TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的检测,进而提高剖宫产术后感染的检出能力。诊断学价值分析可见,相关指标分别超过2.00 ng/mL、1.26  $\mu$ g/mL、2.51 pg/mL时,其在诊断剖宫产术后感染的过程中具有重要的参考价值,但本次研究并未分析不同指标诊断的灵敏度或者特异度的具体差异,存在一定的局限性。

综上所述,在剖宫产术后感染的孕产妇中,TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 的表达浓度明显上升,同时TNF- $\alpha$ 、PCT、IL-1 $\beta$ 超过2.00 ng/mL、1.26  $\mu$ g/mL、2.51 pg/mL时,相关指标能够在辅助诊断剖宫产术后感染中发挥作用。

## 参考文献

[1] Birtay T, Genctoy G, Saba T. Low baseline proBNP associated with increased risk of intraoperative hypotension during spinal anaesthesia for cesarean delivery [J]. *Ann Saudi Med*,

2015, 35(3):248-253.

- [2] Lee HR, Kim M, You JY, et al. Risk of cesarean section after induced versus spontaneous labor at term gestation [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2015, 58(5):346-349.
- [3] 祝莹,张紫娟,王丹阳,等.自然分娩产后产褥感染病原菌分布及血清CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10水平的研究[J]. *中华全科医学*, 2018, 16(11):1854-1856.
- [4] 丘峻朝,陈萍,陈添翠,等.围剖宫产期监测血清降钙素原和C-反应蛋白的临床意义[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(32):5543-5545.
- [5] 曾榛,张援,王力先,等.叶酸干预对运动人群血浆炎症因子的影响[J]. *华南预防医学*, 2017, 7(2):11-14.
- [6] Cho GJ, Kim LY, Min K, et al. Prior cesarean section is associated with increased preeclampsia risk in a subsequent pregnancy [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2015, 15(1):90-93.
- [7] Ismail S, Chughtai S, Hussain A. Incidence of cesarean section and analysis of risk factors for failed conversion of labor epidural to surgical anesthesia: A prospective, observational study in a tertiary care center [J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2015, 31(4):535-537.
- [8] Huesch M, Doctor JN. Factors Associated With Increased Cesarean Risk Among African American Women: Evidence From California, 2010 [J]. *Am J Public Health*, 2015, 105(5):956-962.
- [9] 李莉,刘媛媛,邹佑军.抗生素不同用药时间预防选择性剖宫产术后感染效果比较[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(6):107-110.
- [10] 魏三舟,胡汉国.动态监测产褥感染产妇血清细胞因子及抗氧化能力指标的临床价值[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2016, 8(3):62-65.
- [11] 陶红英,王旭.29例剖宫产手术切口感染的回顾性分析及预防策略[J]. *重庆医学*, 2015, 44(33):4663-4664.
- [12] 胡万芹,杜玲,吴灿,等.剖宫产产妇术后感染相关因素及炎症因子和T淋巴细胞亚群指标的研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(4):590-593.
- [13] 蔡林芳,李春香,何叶.产妇产褥期感染的相关影响因素与临床预防控制[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(10):2364-2366.
- [14] 古岭梅,万晓英,刘彩红,等.剖宫产产妇围手术期炎症因子变化[J]. *中国医药科学*, 2018, 8(6):49-52.
- [15] 陈怡,李丹军,杨幼林,等.产妇产褥感染早期血清炎症相关因子筛选研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(10):2342-2344.

## 血清 $\beta$ -hCG 和孕酮表达与妊娠剧吐患者甲状腺功能 和胃动素相关性

李凤\* 鲁海峰 崔冰漪 秦春怡

**[摘要]** **目的** 探究妊娠剧吐患者血清  $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -hCG)、孕酮(P)表达及与甲状腺功能、胃动素(MOT)的相关性。**方法** 选取2018年1月至2019年10月本院收治的81例妊娠剧吐孕妇作为研究组,选取79例正常孕妇作为对照组。检测比较两组血清  $\beta$ -hCG、P、MOT水平、妊娠剧吐程度(VAS评分)、甲状腺功能[游离甲状腺素(FT4)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、促甲状腺素(TSH)],分析血清  $\beta$ -hCG、P水平与VAS评分、甲状腺功能、MOT的相关性,探讨血清  $\beta$ -hCG、P与妊娠剧吐的关系。**结果** 研究组血清  $\beta$ -hCG水平高于对照组,血清P水平低于对照组( $P<0.05$ );研究组血清FT3、FT4水平及VAS评分高于对照组,血清TSH及MOT水平低于对照组( $P<0.05$ );血清  $\beta$ -hCG水平与血清TSH、MOT水平存在显著负相关,与血清FT3、FT4水平及VAS评分存在显著正相关( $P<0.05$ );血清P水平与血清TSH、MOT水平存在正相关,与血清FT3、FT4水平及VAS评分存在显著负相关( $P<0.05$ );血清  $\beta$ -hCG、P与妊娠剧吐高度相关( $P<0.05$ )。**结论** 妊娠剧吐患者血清  $\beta$ -hCG表达异常升高,P表达较低,与患者甲状腺功能、MOT水平及妊娠剧吐程度关系密切,监测其变化情况可为临床合理制定干预措施提供指导性参考。

**[关键词]** 妊娠剧吐;  $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素; 孕酮; 甲状腺素; 三碘甲状腺原氨酸; 促甲状腺素; 胃动素

### Correlation of serum $\beta$ - hCG and progesterone expression with thyroid function and motilin in patients with hyperemesis gravidarum

LI Feng\*, LU Haifeng, CUI Bingyi, QIN Chunyi

(Clinical laboratory, Tangshan hospital of traditional Chinese medicine, Tangshan, Hebei, China, 063000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression of serum  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) and progesterone (P) in patients with hyperemesis gravidarum and the correlation with thyroid function and motilin (MOT). **Methods** From January 2018 to October 2019, 81 pregnant women with severe vomiting in hospital were selected as the study group and 79 normal pregnant women were selected as the control group. The serum  $\beta$ -hCG, P, MOT levels, hyperemesis gravidarum (VAS score), thyroid function [free thyroxine (FT4), free triiodothyronine (FT3), and thyroid stimulating hormone (TSH)] were measured and compared between the two groups. The correlations of serum  $\beta$ -hCG and P levels with VAS score and thyroid function and MOT were analyzed. **Results** The serum  $\beta$ -hCG level in the study group was higher than that in the control group, and the serum P level was lower than that in the control group ( $P<0.05$ ). Serum FT3 and FT4 levels and VAS scores in the study group were higher than those in the control group, and serum TSH and MOT levels were lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). There was a significant negative correlation between serum  $\beta$ -hCG levels and serum TSH and MOT levels, and a significant positive correlation with se-

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2018322)

作者单位:唐山市中医医院检验科,河北,唐山 063000

\*通信作者:李凤, E-mail: hblf147258@163.com

rum FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub> levels, and VAS scores ( $P < 0.05$ ). Serum P level was positively correlated with serum TSH and MOT levels, and negatively correlated with serum FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub> levels and VAS scores ( $P < 0.05$ ). Serum  $\beta$ -hCG and P were highly related to hyperemesis gravidarum ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum  $\beta$ -hCG expression is abnormally increased in patients with hyperemesis gravidarum, and the expression of P is low, which is closely related to the patients' thyroid function, MOT level and the degree of hyperemesis gravidarum. Monitoring the changes can provide a guidance for the clinical rational intervention.

**[KEY WORDS]** Hyperemesis gravidarum;  $\beta$ -human chorionic gonadotropin; Progesterone; Thyroxine; Triiodothyronine; Thyrotropin; Motilin

妊娠剧吐为妊娠期特有疾病,可对患者饮食、工作、生活等带来严重影响,同时影响胎儿营养摄入,不利于母婴健康,常需住院治疗,以往临床多采用尿酮体检查诊断妊娠剧吐,近年来研究发现,血清 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -human chorionic gonadotropin,  $\beta$ -hCG)在鉴别诊断妊娠剧吐方面较尿酮体检查更为有效、准确<sup>[1-2]</sup>。孕酮(P)伴随全妊娠过程,已有大量研究证实,P水平变化与妊娠结局密切相关<sup>[3-4]</sup>,但其与妊娠剧吐的关系尚缺乏大量循证支持。此外,相关文献显示,妊娠剧吐患者存在甲状腺激素升高降低现象,随着时间推移,可导致流产等不良妊娠结局,故检测妊娠剧吐患者甲状腺激素水平变化意义重大<sup>[5]</sup>。胃动素(Motilin, MOT)是刺激胃肠蠕动,增加胃肠动力的主要激素之一,是反映妊娠剧吐孕妇胃肠道蠕动情况的重要指标<sup>[6]</sup>。本研究通过检测妊娠剧吐孕妇血清 $\beta$ -hCG、P表达,分析其与甲状腺功能、MOT的相关性,以期为临床诊治妊娠剧吐提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年10月本院收治的81例妊娠剧吐孕妇作为研究组,于妊娠早期频繁恶心呕吐,每日呕吐 $\geq 3$ 次,不能进食。选取79例正常孕妇作为对照组。对比两组体质量、孕周、妊娠情况、年龄、户口所在地、孕次,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审批通过。

纳入标准:①年龄 $< 35$ 岁;②自然受孕;③无妊娠期糖尿病、高血压等疾病;④认知功能良好;⑤患者知晓本研究,已签署同意书。排除:①严重肝肾功能障碍者;②合并甲状腺疾病者;③葡萄胎等引起的呕吐;④合并消化系统疾病者;⑤恶

性肿瘤患者;⑥血液系统疾病患者。

### 1.3 方法及检测指标

材料和仪器:LXJ-802型医用离心机购自金坛市恒丰仪器制造有限公司,化学发光免疫分析试剂盒购自罗氏产品上海有限公司,化学发光微粒子免疫检测试剂盒购自美国Bio-RAD公司。

血清指标检测方法:入组第2天早晨,采集所有研究对象静脉血3 mL,采用医用离心机,以3 000 rpm转速离心10 min,取血清置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用,用化学发光免疫分析法测定血清 $\beta$ -hCG、P、MOT水平。采用化学发光微粒子免疫检测法测定血清游离甲状腺素(Free thyroxine, FT<sub>4</sub>)、游离三碘甲状腺原氨酸(Free triiodothyronine, FT<sub>3</sub>)、促甲状腺素(Thyroid stimulating hormone, TSH)水平。

妊娠剧吐程度评估方法:采用视觉模拟评分法(Visual analogue scales, VAS)<sup>[7]</sup>评估,使用正面有0和10之间游动的标尺,将标有“1-10”刻度的一面背向病人,让病人在直尺上标出能代表自己妊娠剧吐程度的相应位置,医师根据病人标出的位置为其评出分数,分值范围0~10分,0分表示无恶心呕吐症状,10分为最剧烈恶心呕吐,无法耐受。

观察指标:①两组血清 $\beta$ -hCG、P、MOT、TSH、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平及VAS评分。②分析血清 $\beta$ -hCG、P水平与血清MOT、TSH、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平、VAS评分的相关性。③分析血清 $\beta$ -hCG、P与妊娠剧吐的关系。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 $t$ 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 $\chi^2$ 检验,采用Pearson分析血清 $\beta$ -hCG、P水平与血清TSH、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平、VAS评分的相关性,通过logistic分析血清 $\beta$ -hCG、P与妊娠剧吐关系, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组基本资料的比较

两组资料中体质量,年龄要周孕次、妊娠情况等比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表1 研究组与对照组一般资料情况 [ $n(\%)$ , ( $\bar{x}\pm s$ )]

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

项目	研究组 ( $n=81$ )	对照组 ( $n=79$ )	$t/\chi^2$ 值	$P$ 值
体质量(kg)	54.19±2.97	55.24±4.11	1.856	0.065
年龄(岁)	26.19±3.09	27.01±2.50	1.843	0.067
孕周(周)	7.31±1.15	6.92±1.45	1.887	0.061
孕次(次)	1.96±0.45	2.01±0.49	0.673	0.502
妊娠情况				
单胎妊娠	76(93.83)	72(91.14)	0.417	0.519
多胎妊娠	5(6.17)	7(8.86)		
户口所在地(例)				
农村	35(43.21)	30(37.97)	0.454	0.500
城市	46(56.79)	49(62.03)		

### 2.2 两组血清β-hCG、P水平

研究组血清β-hCG水平较对照组高,血清P水平较对照组低( $P<0.05$ )(表2)。

表2 研究组和对照组血清β-hCG、P水平 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Serum β-hCG and P levels in the two groups

组别	$n$	β-hCG(IU/L)	P(nmol/L)
研究组	81	15 6291.33±46 887.33	23.42±6.89
对照组	79	10 9403.65±32 820.89	32.78±9.66
$t$ 值		7.311	7.070
$P$ 值		<0.001	<0.001

### 2.2 两组甲状腺功能、MOT及VAS评分

研究组血清FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平及VAS评分较对照组高,血清TSH及MOT水平较对照组低( $P<0.05$ )(表3)。

### 2.3 血清β-hCG、P水平与甲状腺功能、VAS评分相关性

血清β-hCG水平与VAS评分、血清FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平呈正相关,与血清TSH、MOT水平呈负相关( $r_1=0.615, P_1<0.001; r_2=0.397, P_2<0.001; r_3=0.493, P_3<0.001; r_4=-0.492, P_4<0.001; r_5=-0.558, P_5<0.001$ ),血清P水平与VAS评分、血清FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>水平呈负相关,与血清TSH、MOT水平呈正相关( $r_1=-0.511, P_1<0.001; r_2=-0.678, P_2<0.001; r_3=-0.486, P_3<0.001; r_4=0.451, P_4<0.001; r_5=0.321, P_5<0.001$ )(图1)。

表3 两组甲状腺功能、MOT及VAS评分 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Thyroid function, MOT and VAS scores of the 2 groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	$n$	FT <sub>3</sub> (pmol/L)	FT <sub>4</sub> (pmol/L)	TSH(mU/L)	VAS评分(分)	MOT(ng/L)
研究组	81	7.24±1.01	661.11±198.34	1.68±0.33	7.64±1.41	67.14±15.92
对照组	79	6.49±2.04	232.64±69.42	1.86±0.12	2.35±1.34	144.36±30.08
$t$ 值		2.958	18.146	4.563	24.315	20.365
$P$ 值		0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 血清β-hCG、P与妊娠剧吐关系

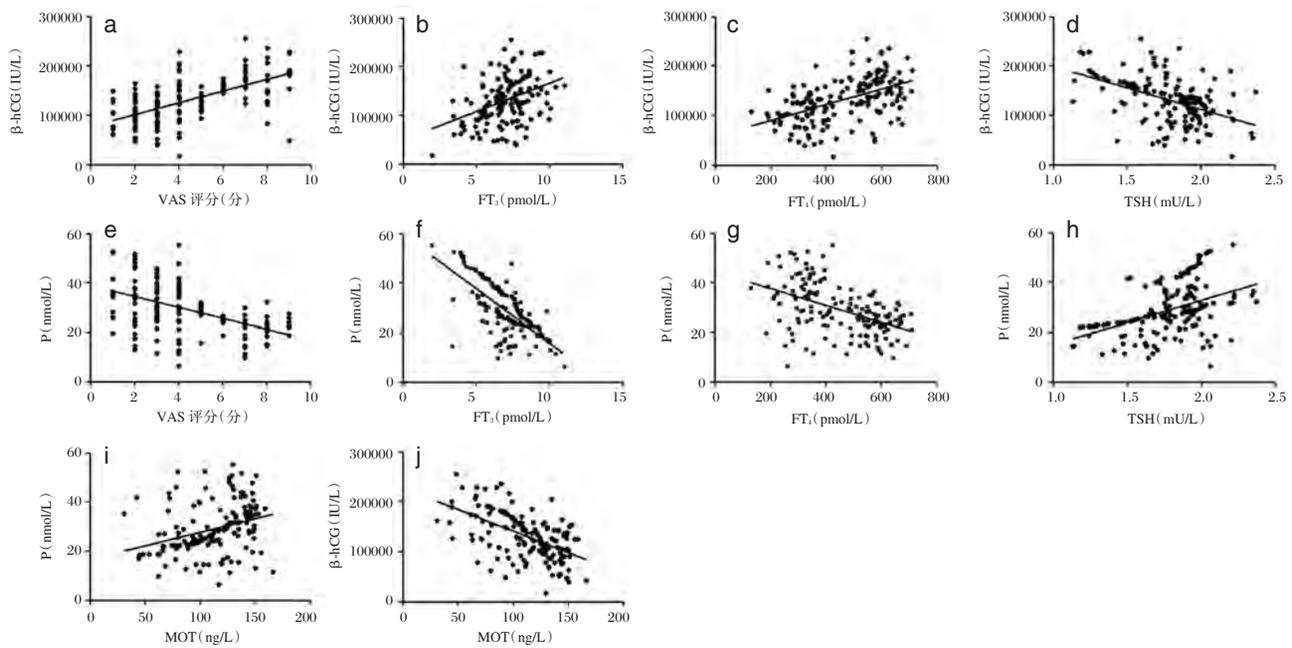
经logistic分析,血清β-hCG、P与妊娠剧吐密切相关( $P<0.05$ )(表4)。

## 3 讨论

恶心呕吐为妊娠早期常见反应,一般不影响孕妇生活和工作,但少部分妊娠剧吐孕妇,恶心呕吐症状频繁,影响进食,对身体健康造成严重影响,更甚者可引发酸中毒、肝功能衰竭等致死性并发症<sup>[8-9]</sup>。因此,及时明确妊娠剧吐患者病情,积极开展相关治疗,对保障母婴安全至关重要。

本研究发现,妊娠剧吐患者血清β-hCG水平显著高于正常孕妇,表明血清β-hCG的异常高表

达参与妊娠剧吐的发生发展。相关研究指出,妊娠剧吐是一种多因素导致的疾病,雌激素分泌异常、维生素B缺乏、血浆蛋白A不足等均可能加重孕吐反应<sup>[10]</sup>。β-hCG是由胎盘的滋养层细胞分泌的一种糖蛋白,在受精后分泌开始增加,并进入母血,一直到妊娠第8周左右达到峰值,与胎盘功能关系密切<sup>[11-12]</sup>。报道指出,妊娠早期β-hCG达到峰值时,恶心呕吐症状最严重,一般认为妊娠剧吐与β-hCG的过度表达密切相关<sup>[13]</sup>。黄诗蔚<sup>[14]</sup>针对76例妊娠剧吐患者开展的一项研究发现,妊娠剧吐患者的血清β-hCG水平随着病情缓解逐渐降低,治疗效果越好降低越明显。上述研究均证实了本研究结果的可靠性。β-hCG促进妊娠剧吐的机制



注 : a: 血清  $\beta$ -hCG 水平与 VAS 评分相关性; b: 血清  $\beta$ -hCG 水平与 FT<sub>3</sub> 水平相关性; c: 血清  $\beta$ -hCG 水平与 FT<sub>4</sub> 水平相关性; d: 血清  $\beta$ -hCG 水平与 TSH 水平相关性; e: 血清 P 水平与 VAS 评分相关性; f: 血清 P 水平与 FT<sub>3</sub> 水平相关性; g: 血清 P 水平与 FT<sub>4</sub> 水平相关性; h: 血清 P 水平与 TSH 水平相关性; i: 血清 P 水平与 MOT 相关性; j: 血清  $\beta$ -hCG 水平与 MOT 相关性

图 1 血清  $\beta$ -hCG、P 水平与甲状腺功能、VAS 评分相关性

Figure 1 Correlation of serum  $\beta$ -hCG, P levels with thyroid function and VAS score

表 4 血清  $\beta$ -hCG、P 与妊娠剧吐关系

Table 4 Relationship between serum  $\beta$ -hCG, P and hyperemesis gravidarum

因素	$\beta$ 值	S.E. 值	Wald $\chi^2$ 值	OR 值	95%CI	P 值
$\beta$ -hCG	1.291	0.462	7.807	3.636	1.278~10.344	<0.001
P	1.169	0.454	6.633	3.220	1.071~9.679	<0.001

为:  $\beta$ -hCG 水平升高, 可刺激消化系统发生一系列变化, 如平滑肌松弛、张力减弱, 胃肠道蠕动减缓等, 导致胃排空和食物在胃肠道停留时间延长, 加之孕早期消化液、消化酶分泌减少, 易引起消化不良, 增加恶心、呕吐症状。

本研究结果还显示, 妊娠剧吐患者血清 P 水平明显低于正常孕妇, 笔者推断 P 水平变化可能与妊娠剧吐存在间接性关系。P 是卵巢分泌的具有生物活性的主要孕激素, 具有保护女性子宫内膜的作用, 在妊娠期间给胎儿早期生长及发育提供支持 and 保障, 同时对子宫起到一定镇定作用<sup>[15-16]</sup>。近年来研究发现, P 水平变化是临床判断胎盘功能重要指标, 其水平降低提示胎盘功能出现异常<sup>[17]</sup>。上述分析及本研究结果, 均证实了笔者推断的准确性, 但 P 促进妊娠剧吐的具体作用机制尚不明确, 有待日后深入探究。本研究进一步经相关性分析发现, 血清  $\beta$ -hCG、P 与妊娠剧吐具有

密切相关性, 充分表明血清  $\beta$ -hCG、P 的异常表达与妊娠剧吐的发生发展关系密切。

最新研究显示, 妊娠期甲状腺功能异常对孕妇妊娠结局及新生儿预后均可造成不良影响, 妊娠早期加强甲状腺功能筛查和干预, 可明显改善母婴预后<sup>[18-19]</sup>。而在妊娠剧吐患者中, 约 50% 的患者存在甲状腺功能异常, 主要表现为甲状腺激素水平的变化<sup>[20]</sup>。FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub> 及 TSH 均为反映甲状腺功能的重要生物学指标<sup>[21]</sup>。MOT 是刺激胃肠蠕动的重要因子, 其生理功能是促进消化道运动, 加速胃排空, MOT 表达水平与胃排空时间呈正相关。而妊娠剧吐患者胃排空时间较长, 是引起剧吐的主要因素之一<sup>[22]</sup>。本研究结果中, 妊娠剧吐患者血清 FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub> 水平高于正常孕妇, 而血清 TSH、MOT 水平低于正常孕妇, 表明妊娠剧吐患者存在甲状腺激素及 MOT 分泌异常。 $\beta$ -hCG 结构与 TSH 较为相似, 类似一种弱甲状腺激素刺激物, 可与 TSH 受体结合,

刺激甲状腺激素合成细胞碘的摄取量增加,增加 $FT_4$ 分泌,刺激环化腺核昔一磷酸合成、分泌增加<sup>[22-23]</sup>。妊娠剧吐患者妊娠早期 $\beta$ -hCG表达不断增加,呈过度表达状态,可引起 $FT_3$ 、 $FT_4$ 水平增高,同时通过负反馈机制抑制TSH与MOT的合成及分泌,从而引起甲状腺激素水平紊乱、胃肠道功能降低<sup>[24-25]</sup>。此外,本研究还显示,血清 $\beta$ -hCG、P水平与血清MOT、TSH、 $FT_3$ 、 $FT_4$ 水平均存在密切相关性,表明血清 $\beta$ -hCG、P异常表达不仅能反映妊娠剧吐患者病情,同时可为临床评估患者甲状腺功能、胃肠道功能提供参考,有助于改善患者预后。

综上所述,血清 $\beta$ -hCG、P的异常表达与妊娠剧吐患者甲状腺激素水平、血清MOT水平、妊娠剧吐程度具有密切相关性,可作为反映患者甲状腺功能、胃肠道功能及妊娠剧吐病情的生物学指标,指导临床治疗妊娠剧吐,有助于改善患者预后。

## 参考文献

- [1] Fejzo MS, Myhre R, Colodro-Conde L, et al. Hyperemesis gravidarum associated with RYR2 genetic analysis of hyperemesis gravidarum reveals association with intracellular calcium release channel (RYR2)[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 439(1):308-316.
- [2] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠剧吐的诊断及临床处理专家共识(2015)[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(11):801-804.
- [3] Patel BG, Rudnicki M, Yu J, et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(6):623-632.
- [4] 吉家安,符英萍. 联合检测血清孕酮、绒毛膜促性腺激素和胎盘生乳素对早期不良妊娠结局的预测价值[J]. *中国计划生育学杂志*, 2018, 26(6):67-69.
- [5] Boelig RC, Barton S, Saccone G, et al. Interventions for treating hyperemesis gravidarum [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 5(5):CD010607.
- [6] 吴小华,胡丽莎,陈晓勇,等. 耳穴贴压疗法对妊娠剧吐患者胃动素水平的影响[J]. *中西医结合研究*, 2015, 7(2):57-59.
- [7] Kos D, Raeymaekers J, Remoortel AV. Electronic visual analogue scales for pain, fatigue, anxiety and quality of life in people with multiple sclerosis using smartphone and tablet a reliability and feasibility study [J]. *Clin Rehabil*, 2017, 31(9):1215-1225.
- [8] 李艳凤. 血清 $\beta$ -羟丁酸测定在妊娠剧吐中的诊断价值[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2018, 39(17):2021-2023.
- [9] Günaydın B, Özek A, Özterlemez NT, et al. Unique Liver Disease of Pregnancy Requiring Anaesthesia Support: A Case with Severe Hyperemesis Gravidarum [J]. *Turk J Anaesthesiol Reanim*, 2017, 45(4):234-236.
- [10] O'Donnell A, Mcparlin C, Robson SC, et al. Treatments for hyperemesis gravidarum and nausea and vomiting in pregnancy: a systematic review and economic assessment [J]. *Health Technol Assess*, 2016, 20(74):13-268.
- [11] 徐伟文,伍华颖,王小艳,等. 游离 $\beta$ 人绒毛膜促性腺激素定量测定化学发光免疫分析法的建立与性能评价[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(5):307-314, 346.
- [12] 柴守辉,魏桢楠,徐行丽. 薄型子宫内膜患者冻融胚胎移植周期中应用他莫昔芬与来曲唑的疗效比较[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2017, 23(2):126-129.
- [13] Beyazit F1, Öztürk FH, Pek E, et al. Evaluation of the hematologic system as a marker of subclinical inflammation in hyperemesis gravidarum: A case control study [J]. *Ginekol Pol*, 2017, 88(6):315-319.
- [14] 黄诗蔚. 揸针配合穴位按压为主治疗妊娠剧吐疗效观察 [J]. *上海针灸杂志*, 2018, 37(1):51-55.
- [15] 陈国强,朱圣娇,桂瑞丰,等. 血清HCG、E<sub>2</sub>、P、CA125水平对早期异位妊娠与先兆流产诊断价值[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(8):1051-1054.
- [16] 黄欢,张庆华. 血清 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素、孕酮、CA199及子宫内膜厚度对早期异位妊娠的诊断价值分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(14):1553-1556.
- [17] Oktem O, Akin N, Bildik G, et al. FSH Stimulation promotes progesterone synthesis and output from human granulosa cells without luteinization [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(3):643-652.
- [18] 李嫔. 孕期甲状腺疾病对胎儿发育及新生儿健康的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2019, 34(8):574-577.
- [19] Stagnaro-Green A. Second trimester levothyroxine treatment for subclinical hypothyroidism or hypothyroxinaemia of pregnancy does not improve cognitive outcomes of children [J]. *Evid Based Med*, 2017, 22(4):149.
- [20] 陈瑜. 妊娠剧吐孕妇甲状腺功能变化的观察研究 [J]. *中外医学研究*, 2018, 16(18):37-39.
- [21] 吕筱筠,朱丽丽,柏怡,等. 妊娠一过性甲状腺功能亢进与妊娠剧吐相关性研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(6):411-414.
- [22] 许洁,李海燕,施磊,等. 内关穴位按压配合生姜敷贴法对妊娠剧吐患者胃动素的影响 [J]. *中外医疗*, 2019, 38(9):170-173.
- [23] 李晓玲. 妊娠剧吐妇女hCG与一过性甲亢的关系及临床治疗效果分析 [J]. *中国实用医药*, 2017, 12(19):65-66.
- [24] O'Donnell A, Mcparlin C, Robson SC, et al. Treatments for hyperemesis gravidarum and nausea and vomiting in pregnancy: a systematic review and economic assessment [J]. *Health Technol Assess*, 2016, 20(74):1392-1401.
- [25] 王君龙,王立杰,高丹丹,等. 妊娠剧吐与甲状腺功能异常的临床研究 [J]. 2016, 26(24):17-17.

## CysC、 $\alpha$ 1-MG 及 $\beta$ 2-MG 在慢性阻塞性肺疾病患者的检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性

李海燕\*

**【摘要】**目的 探讨血清胱抑素 C(CysC)、 $\alpha$ 1 微球蛋白( $\alpha$ 1-MG)及  $\beta$ 2 微球蛋白( $\beta$ 2-MG)在慢性阻塞性肺疾病(COPD)中的检测价值及与缺氧所致早期肾损伤的相关性。**方法** 选择2013年1月至2016年8月本院就诊的206例 COPD 患者,依据氧分压(SPO<sub>2</sub>)分为轻度缺氧组64例、中度缺氧组86例、重度缺氧组56例三组,另选取50例健康者作为对照组,检测4组 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG、肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,并利用 ROC 曲线分析 CysC、 $\alpha$ 1-MG 及  $\beta$ 2-MG 对 COPD 及 COPD 合并肾损伤的诊断价值,通过 Pearson 检验分析 CysC、BUN、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 与 Scr 的相关性。**结果** ①对照组比较,COPD 组 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 水平均明显升高,COPD 组 Scr、BUN 水平与对照组差异无统计学意义( $P>0.05$ );②Cys-C 水平在轻度组、中度组、重度组均显著高于对照组( $P<0.05$ ); $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 水平在中度组、重度组均显著高于对照组( $P<0.05$ );与轻度组比较,重度组 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 水平较高( $P<0.05$ );与中度组比较,重度组 CysC 水平较高( $P<0.05$ );③ $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 及 Cys C 均与 Scr 呈正相关(均  $P<0.05$ )。④ROC 曲线示,CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 及联合检测预测 COPD 的曲线下面积为 0.810、0.743、0.812、0.915、0.936,最佳阈值为 1.74 mg/L、12.22 mg/L、2.34 mg/L,敏感度分别为 0.806、0.726、0.794、0.903,特异度为 0.795、0.705、0.782、0.903;CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 及联合检测的曲线下面积分别为 0.864、0.832、0.812,最佳阈值分别为 1.62 mg/L、12.08 mg/L、2.58 mg/L,敏感度分别为 0.824、0.816、0.808、0.914,特异度分别为 0.786、0.774、0.762、0.903。**结论** 联合检测 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 对于预测 COPD 患者疾病程度和预防缺氧所致肾损伤并发症的发生具有良好价值。

**【关键词】** 胱抑素 C;  $\alpha$ 1 微球蛋白;  $\beta$ 2 微球蛋白; 慢性阻塞性肺疾病; 肾损伤; 诊断价值

### The detection and significance of CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG of early kidney injure in patients with chronic obstructive pulmonary disease

LI Haiyan\*

(Dongying New District Hospital, Dongying, Shandong, China, 257000)

**【ABSTRACT】** Objective To investigate the detection value of serum cystatin C (CysC),  $\alpha$ 1 microglobulin ( $\alpha$ 1-MG) and  $\beta$ 2 microglobulin ( $\beta$ 2-MG) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and correlation of the early stage of hypoxia kidney injury. **Methods** A total of 206 elderly patients with COPD from January 2013 to August 2016 in our hospital were selected as the study object. Based on the blood gas analysis, they were divided into COPD with mild, moderate and severe hypoxia groups. A total of 50 healthy people were selected as control group. The CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG, Scr levels were detected and compared for analysis. The ROC curve was used to analyze the diagnostic value of CysC,  $\alpha$ 1-MG and  $\beta$ 2-MG on COPD and COPD combined with renal injury. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between CysC, BUN,  $\alpha$ 1-MG and  $\beta$ 2-MG and Scr. **Results** ①Compared with control group, CysC,  $\alpha$ 1-

基金项目:东营市科学技术项目(JB2017-GY-叁-22-2)

作者单位:东营市东营区新区医院检验科 山东,东营 257000

\*通信作者:李海燕, E-mail:chabiananpw16284@163.com

MG,  $\beta$ 2-MG levels in COPD group significantly increased, and the Scr levels had no statistical significance on the difference with the control group ( $P>0.05$ ). ②CysC level in mild, moderate and severe hypoxia group were significantly higher than that in control group, and the differences had no statistical significance ( $P<0.05$ );  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG levels in moderate and severe hypoxia group were significantly higher than that in control group ( $P<0.05$ ). Compared with group mild hypoxia group, CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG levels in severe hypoxia group were higher ( $P<0.05$ ); compared with moderate hypoxia group, CysC level in severe hypoxia group were higher ( $P<0.05$ ); ③ $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG and CysC were negatively correlated with Scr (all  $P<0.05$ ). ④The ROC curve shows that the area under the curve for predicting COPD by CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG, and combined detection were 0.810, 0.743, 0.812, 0.915, 0.936 respectively; and the optimal thresholds were 1.74 mg/L, 12.22 mg/L, 2.34 mg/L respectively; sensitivity were 0.806, 0.726, 0.794, 0.903 respectively; specificity were 0.795, 0.705, 0.782, 0.903 respectively. The AUC of CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG and the combined detection were 0.864, 0.832, and 0.812 respectively; and the optimal thresholds were 1.62 mg/L, 12.08 mg/L, and 2.58 mg/L respectively; and the sensitivity were 0.824, 0.816, 0.808, and 0.914 respectively; with specificities were 0.786, 0.774, 0.762, and 0.903 respectively. **Conclusions** The combined detection of CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG is of great value in predicting the degree of disease in patients with COPD and preventing the occurrence of renal injury complications caused by hypoxia.

**[KEY WORDS]** Cystatin C;  $\alpha$ 1-microglobulin;  $\beta$ 2-microglobulin; chronic obstructive pulmonary disease; kidney injure; diagnostic value

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是以呼吸气流不完全可逆受限的肺部疾病<sup>[1-2]</sup>,严重威胁患者生命健康,预计未来5年将成为全世界第3位导致死亡的病因<sup>[3]</sup>。随着COPD病情发展,最终可出现多器官功能衰竭,其中COPD早期肾损伤是近年来研究的热点<sup>[4]</sup>。由于COPD患者长期缺血缺氧,肾有效循环血量锐减,肾实质灌注不足,肾小球滤过率降低,最终形成肾功能损伤<sup>[5]</sup>。而长期慢性缺氧所致的肾实质损伤近年来得到广泛关注。因此,早期识别肾功能改变情况是评估COPD并发肾损伤的关键所在。目前对于早期反映肾损伤的指标已有相关报道,本实验将探讨血清胱抑素C(Cystatin C, CysC)、 $\alpha$ 1微球蛋白( $\alpha$ 1-microglobulin,  $\alpha$ 1-MG)及 $\beta$ 2微球蛋白( $\beta$ 2-microglobulin,  $\beta$ 2-MG)在COPD检测价值及与缺氧所致肾损伤的相关性。现将研究过程及结果汇报如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2013年1月至2016年8月在本院呼吸内科救治的206例COPD患者。其中男性121例,女性85例。年龄55~75岁,平均年龄为(61.76 $\pm$ 8.45)岁。所有患者按照氧分压分度<sup>[6]</sup>分为3组,即轻度缺氧组64例( $80\text{ mmHg}\geq\text{SPO}_2>60\text{ mmHg}$ )、中度缺氧组86例( $60\text{ mmHg}\geq\text{SPO}_2>40\text{ mmHg}$ )及重度缺氧组56例( $\text{SPO}_2\leq 40\text{ mmHg}$ );另外同期选择门诊

健康体检者50例作为正常对照组。其中男性28例,女性22例,平均年龄在(58.44 $\pm$ 6.98)岁;以上四组患者在年龄、性别、体重等方面差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。所纳入206例COPD患者入组标准:①所有患者均符合中华医学会呼吸病学关于COPD诊治指南的诊断标准<sup>[7]</sup>;②未曾行COPD规范化治疗;③患者或家属知情同意。排除标准:继发性肾病如高血压性肾病、原发性肾病、尿路感染等、糖尿病肾病或使用肾毒性药物等;合并有多器官功能衰竭者;患者神志及精神异常等。

### 1.2 方法

对入院第二天清晨空腹静脉抽血3 mL行CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG、Scr、BUN等相关生化指标检测,其中CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG均采用免疫比浊法,CysC试剂盒购自北京利德曼生化有限公司, $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG试剂盒购自德国西门子公司;同时Scr、BUN采用苦味酸尿素法测定,试剂盒由天津医学生物工程有限公司提供,以上相关指标均由我院引进的日立7600型全自动生化分析仪进行检测,严格按照相关说明进行操作。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析;符合正态分布的计量资料采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用单独样本 $t$ 检验,多组均数间比较用单因素方差分析;两变量间的相关关系采用Pearson相关分析;运用ROC曲线下面积(area under ROC curve,

AUC)评价相关指标对 COPD 早期肾损伤的预测价值。均行双侧检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 COPD 组与对照组 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG、Scr、BUN 的比较

COPD 组 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 水平均高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ),而两组间 Scr、BUN 水平差异

无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 4 组间 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG、Scr、BUN 的比较

与对照组比较,轻、中及重度组 CysC 水平以及中、重度组  $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 水平均明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与轻度组比较,中、重度组 CysC 水平及重度组  $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 水平均升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与中度组比较,重度组 CysC 水平明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 1 两组相关指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

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

组别	n	Scr( $\mu\text{mol/L}$ )	BUN(mmol/L)	CysC(mg/L)	$\alpha 1$ -MG(mg/L)	$\beta 2$ -MG(mg/L)
对照组	50	76.01 $\pm$ 15.76	5.84 $\pm$ 1.43	1.14 $\pm$ 0.22	8.84 $\pm$ 1.56	1.64 $\pm$ 0.26
COPD 组	206	83.36 $\pm$ 34.39	6.43 $\pm$ 3.12	1.69 $\pm$ 0.53	13.63 $\pm$ 4.35	2.63 $\pm$ 1.15
t 值		1.318	1.562	4.472	5.124	4.115
P 值		0.231	0.128	0.013	0.004	0.021

表 2 4 组间相关指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of related indicators between the 4 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Scr( $\mu\text{mol/L}$ )	BUN(mmol/L)	CysC(mg/L)	$\alpha 1$ -MG(mg/L)	$\beta 2$ -MG(mg/L)
对照组	50	76.01 $\pm$ 15.76	5.84 $\pm$ 1.43	1.14 $\pm$ 0.22	8.84 $\pm$ 1.56	1.64 $\pm$ 0.26
轻度缺氧组	64	80.58 $\pm$ 17.43	6.36 $\pm$ 1.61	1.37 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	9.54 $\pm$ 1.85	1.93 $\pm$ 1.35
中度缺氧组	86	86.56 $\pm$ 19.23	6.73 $\pm$ 1.98	1.64 $\pm$ 0.72 <sup>ab</sup>	12.24 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>	2.64 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>
重度缺氧组	86	93.38 $\pm$ 21.73	7.04 $\pm$ 2.09	1.98 $\pm$ 1.23 <sup>abc</sup>	17.42 $\pm$ 2.79 <sup>ab</sup>	3.72 $\pm$ 2.79 <sup>ab</sup>
F 值		9.677	6.379	7.240	8.660	9.275
P 值		0.000	0.001	0.000	0.000	0.000

### 2.3 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 预测 COPD 的 ROC 曲线

ROC 曲线分析显示:CysC 预测 COPD 的曲线下面积为 0.810,最佳阈值为 1.74 mg/L 时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为 0.806,特异度为 0.795; $\alpha 1$ -MG 曲线下面积为 0.743,最佳阈值为 12.22 mg/L 时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为 0.726,特异度为 0.705; $\beta 2$ -MG 曲线下面积为 0.812,最佳阈值为 2.34 mg/L 时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为 0.794,特异度为 0.782,3 者联合检测的曲线下面积为 0.915,敏感度为 0.903,特异度为 0.897,见图 1。

### 2.4 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG、BUN 与 Scr 的相关性分析

Pearson 分析显示,CysC( $r=0.672, P=0.011$ )、 $\alpha 1$ -MG( $r=0.415, P=0.031$ )、 $\beta 2$ -MG( $r=0.550, P=0.029$ ) BUN( $r=0.023, P=0.436$ ) 均与 COPD 患者 Scr 水平成显著正相关,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

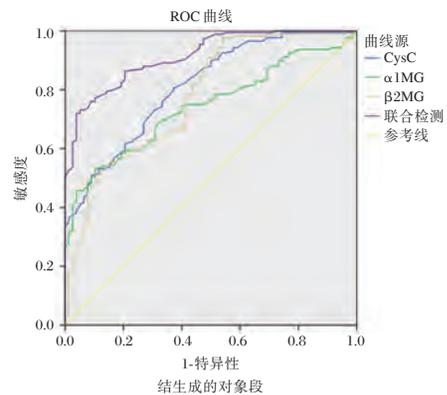


图 1 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 预测 COPD 的 ROC 曲线  
Figure 1 ROC curves of CysC,  $\alpha 1$ -MG,  $\beta 2$ -MG for COPD prediction

### 2.5 CysC、 $\alpha 1$ -MG、 $\beta 2$ -MG 预测 COPD 早期肾损伤的 ROC 曲线

ROC 曲线分析显示:CysC 曲线下面积为 0.856,最佳阈值为 1.62 mg/L 时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为 0.824,特异度为 0.786; $\alpha 1$ -MG

曲线下面积为0.722,最佳阈值为12.08 mg/L时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为0.816,特异度为0.774;  $\beta$ 2-MG 曲线下面积为0.812,最佳阈值为2.58 mg/L时,其预测 COPD 早期肾损伤的敏感度为0.808,特异度为0.762,三者联合检测的曲线下面积为0.936,敏感度为0.914,特异度为0.903,见图2。

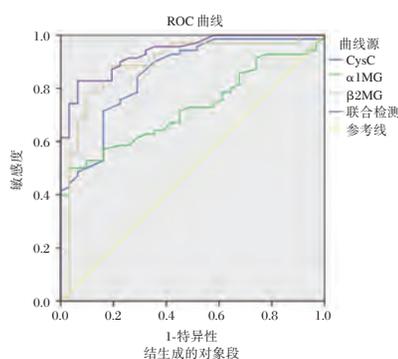


图2 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG预测COPD早期肾损伤的ROC曲线  
Figure 2 ROC curves of CysC,  $\alpha$ 1-MG,  $\beta$ 2-MG predicting early renal injury in COPD

### 3 讨论

COPD 作为一种慢性缺氧性疾病,最终可使全身器官受累,但是 COPD 合并肾损伤的研究较少<sup>[8]</sup>。因长期缺氧致肾毛细血管内皮功能障碍,肾有效灌注不足,最终使肾功能受损<sup>[9-10]</sup>。故早期检测能反映肾功能敏感及特异性指标,对减少肾功能进一步恶化及制定治疗方案至关重要。CysC 为半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族 2 中的成员之一,其浓度不受肌肉组织、年龄、性别等的影响,研究认为 CysC 与 COPD 的发生发展及 COPD 并发心血管疾病、肾损伤等密切相关。 $\alpha$ 1-MG 为肾小管功能损伤的敏感标志物、 $\beta$ 2-MG 反映了肾小球的滤过功能。本研究结合 COPD 患者肾功能损伤结果推测,COPD 患者病情越严重,肺功能逐渐恶化,气流受限程度呈进行性加重,机体缺氧也越重,导致各器官累及明显,引发肾损伤逐步加重。

近年来通常以 Scr 用于反映肾功能变化情况,但易受患者性别、年龄、饮食习惯及身体状况等诸多方面影响,故在早期反映肾功能变化不够灵敏。CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 属于小分子物质,在体内水平较稳定,不受外界环境影响,主要在肾小管上皮细胞吸收并降解随尿液排出,当肾小管受损时,三者重吸收减少,而在损伤早期患者血液中含量即上升<sup>[11]</sup>,与王会卿等<sup>[12]</sup>研究结果相符。本实

验发现,随着 COPD 病情加重,CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 随之升高,而 Scr 升高不明显,因 Scr 在早期反映肾功能方面上升较为延迟,仅当肾功能明显受损时 Scr 才发生变化。而 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 对肾功能的变化较 Scr 敏感,早期可出现升高,与赵素芝等<sup>[13]</sup>研究结论相一致。

本研究结果表明,可以用 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 来替代 Scr 用于反映早期肾功能改变情况。另外本研究通过 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 预测 COPD 早期肾损伤的 ROC 曲线发现三者联合检测对检出 COPD 早期肾损伤具有较好的诊断价值。

综上所述,联合检测 CysC、 $\alpha$ 1-MG、 $\beta$ 2-MG 对于预测 COPD 患者疾病程度和预防缺氧所致肾损伤并发症的发生具有良好价值。

### 参考文献

- [1] 李世红,张黎明,庞宝森,等. 肾损伤对慢性阻塞性肺疾病急性加重及住院的影响[J]. 重庆医学, 2017,46(21):2934-2936.
- [2] 关英,阿选德. 西宁市 40 岁及以上居民慢性阻塞性肺病流行病学调查[J]. 华南预防医学, 2019,45(5):478-480.
- [3] Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4):347-365.
- [4] 刁鑫,兀威,张进召. 吸烟对慢性阻塞性肺疾病患者 CD8<sup>+</sup>T 细胞的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6):395-399.
- [5] Incalzi RA, Corsonello A. Chronic renal failure: a neglected comorbidity of COPD[J]. Chest, 2010, 137(4):831-837.
- [6] 杨柯君. 缺氧程度的判断[J]. 上海医药, 2012(15):40-40.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013,36(4):255-264.
- [8] Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, et al. Relationship between bone resorption, oxidative stress and inflammation in severe COPD exacerbation [J]. Clin Biochem, 2013, 46(16):1678-1682.
- [9] 肖亚军,王宋平. 慢性阻塞性肺疾病相关性肾损伤机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2015,31(21):3618-3620.
- [10] 王修石,冷小艳. 尿酸、 $\beta$ 2 微球蛋白、脂蛋白(a)和 C 反应蛋白在老年高血压患者早期肾损伤的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014,35(16):2166-2167,2170.
- [11] 陈红,高正兰. Cys C 在慢性肾脏病患者早期肾功能损害中的临床价值[J]. 热带医学杂志, 2017,17(8):1047-1050.
- [12] 王会卿,尹刚,刘军霞,等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清胱抑素 C 水平变化及其临床意义[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015,23(9):33-36.
- [13] 赵素芝,栾兴伟,张花蕾. 老年 COPD 患者早期肾损伤检测的临床价值及意义[J]. 中国老年保健医学, 2016,14(3):29-31.

## 老年 AML 患者在经地西他滨治疗中 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白的表达及与预后关系

王战芳\* 张芳芳 杨海 陈超华

**[摘要]** **目的** 探究老年急性髓细胞白血病(AML)在经地西他滨治疗中血清环氧化酶2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)、p53蛋白的表达及对预后的预测价值。**方法** 选取本院2014年1月至2019年1月收治的80例AML患者作为研究组,并选取同期于本院健康体检者40例作为对照组,对比研究组治疗前后及对照组COX-2、VEGF、p53蛋白、体液免疫和细胞免疫水平,分析各指标的相关性;根据患者治疗后分为完全缓解组( $n=48$ )和未完全缓解组( $n=32$ ),对比两组COX-2、VEGF、p53蛋白水平,并比较两组中枢神经系统白血病(CNSL)的发生率;受试者工作特征曲线(ROC)分析COX-2、VEGF、p53蛋白在AML患儿预后中的预测价值。**结果** 研究组患者COX-2、VEGF及p53蛋白水平均显著高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );研究组患者COX-2、VEGF及p53蛋白水平治疗后均较治疗前明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。研究组患者治疗后体液免疫指标IgA、IgG、IgM水平均较治疗前明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );研究组患者治疗后细胞免疫指标CD3+、CD4+、CD8+、CD4+/CD8+均较治疗前明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性分析结果显示,COX-2、VEGF及p53蛋白之间存在明显正相关性( $P<0.05$ )。完全缓解组和未完全缓解组AML患者COX-2、VEGF及p53蛋白水平比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。完全缓解组和未完全缓解组AML患者中位生存期比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。ROC曲线结果显示,COX-2、VEGF、p53蛋白及联合检测在CNSL诊断中的曲线下面积(AUC)分别为0.836(95% CI: 0.776~0.896)、0.802(95% CI: 0.730~0.873)、0.716(95% CI: 0.639~0.793)及0.905(95% CI: 0.863~0.947)。**结论** COX-2、VEGF及p53蛋白水平检测对于老年AML患者临床治疗效果观测及预后评估具有显著价值。

**[关键词]** 急性髓细胞白血病;老年;环氧化酶2;血管内皮生长因子;p53蛋白

### Expressions of COX-2, VEGF and p53 in elderly AML patients treated with decitabine and their prognosis

WANG Zhanfang\*, ZHANG Fangfang, YANG Hai, CHEN Chaohua

(Department of Hematology, the First People's Hospital of Pingdingshan, Pingdingshan, Henan, China, 467000)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression of serum cyclooxygenase 2 (COX-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 protein in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) treated with decitabine and their prognostic value. **Methods** 80 patients with AML admitted to our hospital from January 2014 to January 2019 were selected as the study group, and 40 healthy people who underwent physical examination in our hospital were selected as the control group. The levels of COX-2, VEGF, p53 protein, humoral immunity and cellular immunity in the study group before and after treatment and the control group were compared and the correlation of indexes were also analyzed. According to the patients

基金项目:平顶山市教育科技基金 HGF-20165021358

作者单位:平顶山市第一人民医院血液科,河南,平顶山 467000

\*通信作者:王战芳, E-mail: musijiu2535898@163.com

after treatment, they were divided into complete remission group ( $n=48$ ) and incomplete remission group ( $n=32$ ). The levels of COX-2, VEGF, p53 protein in the two groups were analyzed. The incidence of central nervous system leukemia (CNSL) between the two groups was compared. The predictive value of COX-2, VEGF, and p53 protein in the prognosis of AML was analyzed using the receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** The levels of COX-2, VEGF, and p53 proteins in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). However, after treatment, the levels of COX-2, VEGF, and p53 protein in the study group were significantly lower than those before treatment. The difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After treatment, the levels of humoral immune indicators IgA, IgG, and IgM in the study group were significantly lower than before treatment ( $P<0.05$ ). After treatment, the cell immune indicators of CD3+, CD4+, CD8+, and CD4+/CD8+ in the study group were significant lower than before treatment ( $P<0.05$ ). Correlation analysis indicates that there is a significant positive correlation between COX-2, VEGF and p53 proteins ( $P<0.05$ ). The difference in COX-2, VEGF and p53 protein levels between AML patients in complete remission group and incomplete remission group was statistically significant ( $P<0.05$ ). The difference in median survival between AML patients in complete remission group and incomplete remission group was statistically significant ( $P<0.05$ ). ROC curve results showed that the area under the curve (AUC) of COX-2, VEGF, p53 protein and combined detection in CNSL diagnosis were 0.836 (95% CI: 0.776-0.896), 0.802 (95% CI: 0.730-0.873), 0.716 (95% CI: 0.639-0.793) and 0.905 (95% CI: 0.863-0.947). **Conclusion** The levels of serum COX-2, VEGF and p53 are of great significance for the clinical treatment effect and prognosis evaluation of elderly AML patients.

[KEY WORDS] Acute myeloid leukemia; Old age; Cyclooxygenase 2; Vascular endothelial growth factor; p53 protein

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是髓系造血干/祖细胞恶性疾病, 是以外周血和骨髓中原始和幼稚髓系细胞异常增生为特征的一类恶性肿瘤。研究显示<sup>[1]</sup>, 在 65 岁以上人群 AML 的发病率是其他人群的 10 倍, 这与老年人机体抵抗力差、身体机能衰退等有关。化疗是治疗 AML 的有效手段。但在老年患者中往往难以耐受标准剂量化疗, 所以阿糖胞苷+阿克拉霉素+粒细胞集落刺激因子 (Ara-c+ACR+G-CSF, CAG) 方案常成为老年 AML 患者治疗选择。地西他滨为一种 DNA 甲基化转移酶抑制剂, 其对于抑制肿瘤细胞增殖、分化和促进肿瘤细胞凋亡具有明显作用。陈冬等研究证实<sup>[2]</sup>, 地西他滨联合 CAG 化疗方案用于急性白血病的治疗取得了较好的效果, 改善患者预后。环氧酶 2 (Cyclooxygenase 2, COX-2) 可促进实体瘤的发生和发展, 其表达水平与肿瘤预后密切相关, 并在白血病患者中水平明显升高<sup>[3]</sup>。肿瘤的形成依赖于血管的异常增生, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 为机体重要的血管生成因子, 研究认为 VEGF 与血液系统疾病的发生发展和预后存在明显关系<sup>[4-5]</sup>。P53 基因是目前已知的与肿瘤相关的基因, 其编码的 p53 蛋白结构稳定, 半衰期长, 可作

为多种恶性肿瘤疾病诊断、治疗和预后的有效标志物<sup>[6]</sup>。因此, COX-2、VEGF、p53 蛋白可为地西他滨治疗老年急性 AML 患者中的效果观测及预后评估的有效指标, 本研究对此进行了探究, 取得了一定的进展, 具体总结如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取本院 2014 年 1 月至 2019 年 1 月收治的 80 例 AML 患者作为研究组, 其中男 49 例, 女 31 例, 年龄 60~76 岁, 平均 (68.8±2.4) 岁, M1 型 8 例, M2 型 14 例, M4 型 18 例, M5 型 31 例, M6 型 9 例。并选取同期于本院健康体检者 40 例作为对照组, 其中男 24 例, 女 16 例, 年龄 60~78 岁, 平均 (68.3±2.5) 岁。两组研究对象在性别、年龄等临床一般资料上比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。本研究内容获得院伦理委员会审核通过。

纳入标准: ①均符合《血液病诊断与疗效标准》中关于 AML 的诊断标准<sup>[7]</sup>; ②均行骨髓穿刺检查确诊; ③年龄≥60 岁; ④AML 的 MICM 分型为 M1、M2、M4、M5、M6 型; ⑤所有患者及家属均充分了解本研究并自愿签署知情同意书。排除标准: ①近期行化疗等相关治疗者; ②肝肾等重要脏

器严重功能障碍者;③合并内分泌系统疾病、免疫系统疾病者;④合并其他部位恶性肿瘤者;⑤不受本研究治疗方案或中途退出研究者。

## 1.2 方法

所有 AML 患者采用地西他滨联合 CAG 方案治疗:地西他滨 15 mg/m<sup>2</sup>·d, d1-d5, 静脉滴注;阿克拉霉素 20 mg/d, d1-d4, 静脉滴注;阿糖胞苷 10 mg/m<sup>2</sup>, q12 h, d1-d14, 皮下注射;粒细胞集落刺激因子 150 μg, q12 h, d1-d14, 皮下注射, 实验室检查患者血细胞计数, 白细胞>20×10<sup>9</sup>/L 时, 停止用药。所有患者在治疗结束后观察治疗效果, 并统计完全缓解和未完全缓解患者例数。

## 1.3 观测指标

### 1.3.1 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白水平检测

所有研究对象在入院后当日空腹抽取 5 mL 静脉血, 室温放置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min 分离上清, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白水平, 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。所有操作严格按照试剂盒说明下进行。所有 AML 患者在化疗 14 d 后再次抽取 5 mL 空腹静脉血并依照同种方法检测上述指标变化情况。

### 1.3.2 体液免疫及细胞免疫指标检测

所有患者在治疗前及治疗 14 d 后采用免疫速率比浊法检测体液免疫指标 IgA、IgG、IgM 水平, 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。采用 CyFlow 全自动流式细胞分析仪 (德国 Partec 公司)

及其配套试剂检测细胞免疫指标 T 淋巴细胞亚型 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 变化, 并计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>。

### 1.3.3 预后

所有患者化疗后随访 1~5 年, 观察患者生存状况, 并统计患者化疗缓解期发生中枢神经白血病 (central nervous system leukemia, CNSL) 的情况。CNSL 诊断标准依据《中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南 (2016 年版)》<sup>[8]</sup> 进行判断。

## 1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 计数资料以 % 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 计量数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。Spearman 相关性分析 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白之间的相关性及其与免疫指标的相关性; 采用受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC) 分析 COX-2、VEGF、p53 蛋白在 CNSL 中的预测价值。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组血清指标变化情况

研究组患者治疗前 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白水平均显著高于对照组, 但治疗后均较治疗前明显降低, 差异具有统计学意义 (*P*<0.05)。研究组患者治疗后体液免疫指标和细胞免疫指标均较治疗前明显降低, 差异具有统计学意义 (*P*<0.05)。见下表 1。

表 1 两组血清指标变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Changes of serum indicators in the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	研究组 (n=80)		对照组 (n=40)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	治疗前	治疗后			
COX-2 (ng/L)	53.2±6.1	31.0±3.1	30.3±3.2 <sup>a</sup>	29.019	0.000
VEGF (pg/mL)	158.8±35.7	72.2±7.5	70.7±6.9 <sup>a</sup>	21.233	0.000
p53 蛋白 (ng/L)	211.5±33.8	108.3±13.7	106.7±14.9 <sup>a</sup>	25.309	0.000
IgA (g/L)	2.3±0.9	1.5±0.7	-	4.276	0.000
IgG (g/L)	11.7±1.9	9.1±1.6	-	9.362	0.000
IgM (g/L)	1.0±0.2	0.7±0.2	-	9.487	0.000
CD3+ (%)	54.2±6.6	38.7±4.5	-	17.355	0.000
CD4+ (%)	34.2±4.3	28.8±3.2	-	9.011	0.000
CD8+ (%)	29.0±2.7	20.9±2.6	-	19.328	0.000
CD4+/CD8+	1.2±0.3	0.9±0.2	-	7.442	0.000

注: 对照组与研究组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05。

## 2.2 相关性分析

相关性分析结果显示, COX-2、VEGF 及

p53 蛋白之间存在明显正相关性 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白与各指标的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of COX-2, VEGF and p53 proteins with various indicators

项目	COX-2		VEGF		p53	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
COX-2	-	-	0.583	0.000	0.612	0.000
VEGF	0.501	0.000	-	-	-	0.000
p53 蛋白	0.559	0.000	0.537	0.000	-	-

## 2.3 不同治疗结果老年 AML 患者 COX-2、VEGF 及 p53 蛋白水平及总生存期(Overall Survival, OS) 比较

完全缓解组 AML 患者 COX-2、VEGF 及 p53

蛋白水平明显低于未完全缓解组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。完全缓解组老年 AML 患者 OS 明显大于未完全缓解组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 不同治疗结果老年 AML 患者各指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of various indicators in different treatment outcomes of elderly AML patients ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	COX-2 (ng/L)	VEGF (pg/mL)	p53 蛋白 (ng/L)	OS(月)
完全痊愈组	48	31.5±4.4	70.3±7.7	102.3±10.4	12.6±2.7
未痊愈组	32	44.1±5.3	166.9±20.8	198.7±10.8	5.9±1.6
t 值		11.555	25.148	39.997	13.914
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

## 2.4 COX-2、VEGF 及 p53 预测 CNSL 的 ROC 曲线

ROC 曲线结果显示, COX-2、VEGF、p53 蛋白及联合检测在 CNSL 诊断中的曲线下面积(AUC) 分别为 0.836(95% CI: 0.776~0.896)、0.802(95% CI: 0.730~0.873)、0.716(95% CI: 0.639~0.793) 及 0.905(95% CI: 0.863~0.947)。见图 1。

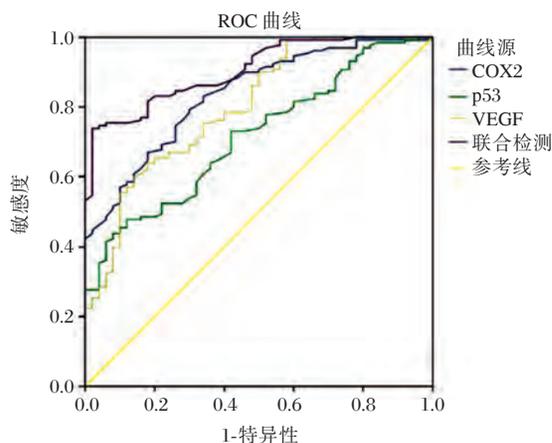


图 1 COX-2、VEGF 及 p53 预测 CNSL 的 ROC 曲线

Figure 1 COX-2, VEGF and p53 predict ROC curves of CNSL

## 3 讨论

随着化疗药物和治疗方案的不断改进完善, AML 患者的临床疗效得到了显著提升, 但仍有相当部分患者病情控制较差, 这在老年患者中更为常见。采用地西他滨进行去甲基化治疗联合 CAG 方案为老年 AML 的常用治疗方案。去甲基化治疗可促进白血病细胞由 G0 期进入细胞周期, 增加 S 期细胞数量, 从而提升化疗药物对于肿瘤细胞的杀伤效果<sup>[9]</sup>。地西他滨可以渗入 DNA 链, 抑制 DNA 甲基转移酶实现甲基化, 从而激活抑癌基因, 起到抗 AML 的效果<sup>[10]</sup>。在实体肿瘤的形成、生长、转移等过程中与新生血管存在密切相关性, 新生血管是肿瘤细胞生长、增殖的必要条件。研究发现<sup>[11]</sup>, 抑制肿瘤血管生成, 可切断肿瘤组织的氧气和营养物质供给, 从而使其丧失营养来源而萎缩凋亡。

研究表明<sup>[12]</sup>, COX-2 通过多个途径参与肿瘤的发生和发展, 其可直接参与肿瘤血管新生; COX-2 及其前列腺素产物可促进细胞 DNA 合成和细胞增殖; COX-2 还可抑制肿瘤下拨凋亡, 引发机体体液免疫和细胞免疫平衡失调。多项研究表

明<sup>[13-14]</sup>, COX-2在多种血液肿瘤疾病中存在明显高表达的情况。VEGF为血管通透因子,能够与血管内皮细胞特异性结合,从而加速血管内皮细胞形成,促进心血管形成,其还能调节造血干细胞和眼性细胞因子的发育和表达,增强血管通透性。研究发现<sup>[15]</sup>,在ALL、AML、CLL等患者的外周血和骨髓均存在VEGF及其受体高表达的情况。VEGF在白血病细胞中大量合成释放,VEGF在与其受体结合后促进白血病细胞增殖,减少白血病细胞凋亡。p53蛋白与肿瘤密切相关,p53基因突变可导致其丧失对DNA修复、细胞增殖、凋亡等的调控作用,因此血清p53蛋白水平提示了机体抗肿瘤能力<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示,经地西他滨联合CAG方案化疗后,老年AML患者的COX-2、VEGF及p53蛋白水平均显著降低。提示,地西他滨联合化疗可明显降低老年AML患者血清COX-2、VEGF及p53蛋白水平,缓解患者病情。

本研究结果提示AML患者在治疗后存在机体细胞免疫抑制状态。加上老年人群自身免疫功能较差、机体机能退化等,从而影响了老年AML患者的预后。本研究中未完全缓解患者较完全缓解患者COX-2、VEGF及p53蛋白较高,OS明显降低。提示,COX-2、VEGF、p53蛋白水平为评估AML患者治疗效果的有效指示指标。ROC曲线结果显示,COX-2、VEGF、p53联合检测在CNLSL诊断中的AUC明显高于3者单一检测。提示,COX-2、VEGF及p53蛋白联合应用在AML患者地西他滨治疗后的预后评估和预测患者CNLSL的发生中存在明显价值。综上所述,COX-2、VEGF及p53蛋白水平检测对于老年AML患者应用地西他滨化疗临床治疗效果观测及预后评估具有显著价值。

## 参考文献

- [1] 毛建平,薛连国,贾韬,等.老年急性髓系白血病诱导治疗的疗效及预后[J].中国老年学杂志,2019,39(22):5475-5480.
- [2] 陈冬,陆滢,裴仁治,等.地西他滨联合低剂量阿糖胞苷治疗老年复发/难治性急性髓系白血病患者的疗效、预后及安全性分析[J].中国实验血液学杂志,2019,27(2):390-395.
- [3] Carter BZ, Mak PY, Wang X, et al. An ARC-regulated IL1 $\beta$ /Cox-2/PGE2/ $\beta$ -catenin/ARC circuit controls leukemia-microenvironment interactions and confers drug resistance in AML[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6):1165-1177.
- [4] Jabari M, Allahbakhshian FM, Salari S, et al. Hypoxia-Inducible Factor1-A (HIF1 $\alpha$ ) and Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Expression in De Novo AML Patients [J]. *Asian Pac J Cancer P.*, 2019, 20(3): 705-710.
- [5] 杨海青,邱发麒.沙利度胺对老年急性髓系白血病患者血清碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子水平的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(24):5936-5938.
- [6] 杨春华,迟永生,沈志鸿,等.复方丹参注射液联合伊马替尼对急性淋巴细胞白血病患者P-糖蛋白、P53蛋白水平及心血管功能的影响[J].中华中医药学刊,2017,35(2):425-428.
- [7] 张之南,沈梯.血液病诊断与疗效标准[M].3版.北京:科学出版社,2007:110.
- [8] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会、中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组.中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016年版)[J].中华血液学杂志,2016,37(10):837-845.
- [9] 邱宏春,孔荣,吴鹏飞,等.地西他滨联合半程预激方案治疗老年急性髓系白血病患者疗效与安全性观察[J].中国实验血液学杂志,2019,27(5):1431-1435.
- [10] 郑转珍,马艳萍,姚晨旭,等.地西他滨及丙戊酸联合预激CAG方案治疗老年急性髓系白血病的临床疗效[J].中国老年学杂志,2019,39(20):4931-4934.
- [11] 杨海青,邱发麒.沙利度胺对老年急性髓系白血病患者血清碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子水平的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(24):5936-5938.
- [12] Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, et al. Prostaglandin E2-Induced Immune Exhaustion and Enhancement of Antiviral Effects by Anti-PD-L1 Antibody Combined with COX-2 Inhibitor in Bovine Leukemia Virus Infection [J]. *J Immunol*, 2019, 203(5):1313-1324.
- [13] Tugcu G, Sipahi Ha, Aydin A. Application of a Validated QSTR Model for Repurposing COX-2 Inhibitor Coumarin Derivatives as Potential Antitumor Agents [J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(13):1121-1128.
- [15] 颜敏超,曾惠.地西他滨联合半量HAG化疗方案对老年急性髓系白血病患者疗效、环氧合酶2、碱性成纤维细胞生长因子及血管内皮生长因子的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(23):5858-5860.
- [16] Levine AJ. The p53 protein plays a central role in the mechanism of action of epigenetic drugs that alter the methylation of cytosine residues in DNA [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5):7228-7230.
- [17] Pan R, Ruvolo V, Mu Hong, et al. Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and p53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy [J]. *Cancer cell*, 2017, 32(6):748-760.

## 外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平对 ITP 患者疗效的预测价值

尹凤雷<sup>1\*</sup> 尹娟<sup>2</sup> 赵芳<sup>1</sup> 张睿<sup>1</sup> 刘静<sup>1</sup> 张薇<sup>1</sup> 李淑晨<sup>1</sup> 王娟<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 探讨外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平对 ITP 患者疗效的预测价值。方法 选择本院接治的 ITP 患者 80 例(观察组)及同期健康体检患者 100 例(对照组)进行研究。两组均行外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平检测,根据疗效判断结果将观察组患者分为治疗反应组及治疗无反应组。对比 2 组外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平,并对不同疗效患者外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平进行对比。结果 观察组外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平均明显高于对照组( $P < 0.05$ )。治疗无反应组患者外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平均明显高于治疗反应组( $P < 0.05$ )。ITP 患者外周血 CD40、CD40L 表达及血清 BAFF 水平均与疗效呈显著负相关( $r < 0, P < 0.05$ )。ROC 曲线分析结果显示外周血 CD40、CD40L 及 BAFF 对 ITP 疗效预测价值较高(均  $AUC > 0.7, P < 0.05$ )。结论 ITP 患者外周血 CD40、CD40L 对 ITP 患者疗效具有较高的预测价值。

**[关键词]** 骨髓 CD40; CD40L; 血清 BAFF 水平; ITP; 疗效

### The predictive value of peripheral blood CD40, CD40L expression and serum BAFF level on the efficacy of patients with immune thrombocytopenic purpura

YIN Fenglei<sup>1\*</sup>, YIN Juan<sup>2</sup>, ZHAO Fang<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LI Shuchen<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>

(1. Department of Hematology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000; 2. Operating Room of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou, Hebei, China, 061000)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the predictive value of peripheral blood CD40, CD40L expression and serum BAFF level in the treatment of immune thrombocytopenic purpura (ITP) patients. Methods 80 patients with ITP admitted to our hospital were recruited as the observation group. 100 healthy people who underwent physical examination in our hospital were selected as the control group. Peripheral blood CD40, CD40L expression and serum BAFF level were observed in both groups. The patients were divided into two groups according to the results of efficacy judgment. The expression of CD40, CD40L and serum BAFF in peripheral blood from the two groups were compared. Results The expression of CD40, CD40L and serum BAFF in the peripheral blood in the observation group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of CD40, CD40L and serum BAFF in peripheral blood of patients with non-re-

基金项目:河北省沧州市重点研发计划指导项目(172302129)

作者单位:1. 沧州市中心医院血液内一科,河北,沧州 061000

2. 沧州市人民医院手术室,河北,沧州 061000

\*通信作者:王娟, E-mail: wang\_juan01@126.com

sponse group were significantly higher than those in response group ( $P<0.05$ ). The expression of CD40, CD40L and serum BAFF in peripheral blood of patients with ITP were negatively correlated with curative effect ( $r<0$ ,  $P<0.05$ ). ROC curve analysis results show that the peripheral blood CD40, CD40L and BAFF have high predictive value for ITP efficacy (all AUC $>0.7$ ,  $P<0.05$ ). Conclusion The peripheral blood CD40 and CD40L in patients with ITP have a high predictive value for the efficacy of ITP patients.

[KEY WORDS] Bone marrow CD40; CD40L; Serum BAFF level; ITP; Curative effect

原发免疫性血小板减少症(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)为临床上常见的获得性免疫介导出血性疾病,主要以血小板减少、骨髓巨核细胞正常或增多为其主要临床表现<sup>[1-2]</sup>。该病发病机制尚不明确,可能与血小板膜抗原产生抗血小板抗体而使血小板破坏,而影响淋巴细胞的活化及免疫反应<sup>[3]</sup>。B细胞激活因子水平过高可破坏自身B细胞的免疫耐受而出现免疫性疾病,但其水平过低又可导致免疫球蛋白成熟受阻而引起体液免疫缺陷,导致变异型免疫缺陷疾病的发生<sup>[4]</sup>。多项研究显示外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平在ITP发生发展中具有重要的意义,但对于上述指标对ITP患者疗效预测方面的研究较少,因此本研究旨在通过探讨外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对ITP患者疗效的预测价值以期为该病的疗效预测提供新的思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2017年12月至2019年3月在本院接受治疗的ITP患者80例(观察组)及同期健康体检患者100例(对照组)进行研究。其中对照组男44例,女36例;年龄23~58岁,平均(42.23±6.11)岁;BMI指数21~29 kg/m<sup>2</sup>,平均(26.58±3.05) kg/m<sup>2</sup>。观察组男55例,女45例;年龄21~59岁,平均(42.22±6.31)岁;身体质量指数(Body Mass Index, BMI)20~28 kg/m<sup>2</sup>,平均(26.33±2.88) kg/m<sup>2</sup>。纳入标准:①观察组患者符合《成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识》<sup>[5]</sup>中的相关诊断,对照组不符合相关诊断;②受试者无精神性疾病;③患者对本研究知情并签署知情同意书。排除标准:①病毒感染继发ITP的患者;②恶性肿瘤的患者;③药物致出血者。两组患者性别、年龄、BMI指数对比差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),具

有可比性。

### 1.2 方法

①外周血CD40、CD40L检测:抽取观察组治疗前及对照组空腹外周静脉血4 mL,加含单克隆荧光标记抗体的鼠抗人CD40-FITC及CD40L-PE各10 μL(试剂盒均购自于美国R&G公司),混匀后室温下孵育,以PBS缓冲液清洗后进行美国赛默飞世尔公司Attune NxT型流式细胞仪检测,每管收获10 000个细胞,以仪器配套软件分析。②血清BAFF检测:采集调查对象血氧2 mL,在3 000 r/min转速下离心15 min,吸取0.8 mL冷冻待测,以酶联免疫吸附法检测BAFF水平,试剂盒购于美国Sigma公司。③疗效判断标准:完全缓解:血小板计数在 $100\times 10^9/L$ 以上,出血症状消失;有效:血小板计数在 $30\times 10^9/L$ 以上且较治疗前增加2倍以上,无出血;无效血小板计数不足 $30\times 10^9/L$ ,与治疗前相比上升不足2倍或出现出血症状。根据上述标准将观察组分为2组,完全缓解及有效的患者划入治疗反应组,无效的患者划入治疗无反应组。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料用( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 $t$ 检验进行分析,相关性分析采用Perason相关系数法,以受试者工作曲线(ROC)分析外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水对ITP患者疗效预测价值,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2组受试者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对比

观察组外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平均明显高于对照组的,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 2组患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of CD40, CD40L expression and serum BAFF levels in peripheral blood of 2 groups of patients ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CD40	CD40L	BAFF(ng/L)
对照组	7.31±2.07	3.24±1.06	603.17±112.38
观察组	12.92±3.05	6.09±1.70	716.44±137.48
t值	6.721	5.947	2.936
P值	0.000	0.000	0.005

表2 观察组不同疗效患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of CD40, CD40L expression and serum BAFF levels in peripheral blood of patients with different curative effects in the observation groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD40	CD40L	BAFF(ng/L)
治疗反应组	56	11.63±3.73	5.61±1.14	683.08±111.88
治疗无反应组	24	15.92±5.09	6.88±1.25	804.07±117.65
t值		2.127	2.237	2.155
P值		0.045	0.034	0.040

### 2.4 ROC分析

ROC曲线分析结果显示骨髓CD40对ITP疗效预测的cutoff值为12.28%，AUC为0.892，灵敏度为83.16%，特异度为92.06%；外周血CD40L对ITP疗效预测的cutoff值为6.08%，AUC为0.784，灵敏度为81.75%，特异度为90.25%；BAFF对ITP疗效预测的cutoff值为745.02 ng/L，AUC为0.708，灵敏度为81.02%，特异度为90.14%。见图1。

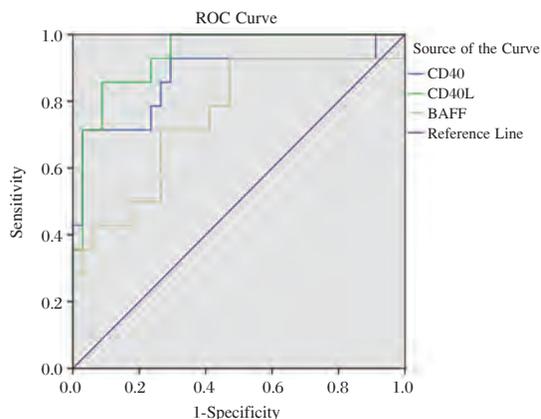


图1 ROC分析图

Figure 1 ROC analysis chart

### 2.2 观察组不同疗效患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平对比

治疗无反应组患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平均明显高于治疗反应组，差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

### 2.3 ITP患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平与疗效相关性分析

ITP患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平均与疗效呈显著负相关，( $r$ 值分别为-0.691、-0.713、-0.652)。差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

临床上出血性疾病中30%为ITP，该病与机体对自身抗原的免疫耐受密切相关，但对于免疫耐受的具体作用机制目前尚未被完全阐释<sup>[6-7]</sup>。ITP患者自身抗体的产生与血小板、抗原递呈细胞、T细胞及B细胞间的相互作用有关。该病的临床治疗难度大，部分患者常规治疗难以起效发展成为难治性ITP。因ITP发病机制较为复杂，目前尚未完全明确，对于该病的诊断仍以排除性诊断为主，目前尚缺乏特异性较强的实验室诊断依据，因而对于该病的疗效预测的研究进展较慢，而疗效预测对于ITP治疗方案的选择具有重大的影响，因此寻找合适的ITP患者疗效预测指标一直是研究的热点。

CD40、CD40L为特异性免疫系统中共刺激分子重要的一员，其在体液免疫及细胞免疫中均有着重要的作用，目前已有大量研究证实CD40、CD40L信号传导途径在肿瘤、艾滋病、移植物抗宿主病等多种自身免疫性疾病中发挥重要的作用<sup>[8-13]</sup>。本研究结果提示了ITP的发病与CD40、CD40L有密切的关系。在健康人体内CD40L仅在

激活的T淋巴细胞表面有暂时性的表达,CD40在正常情况下表达量也较大,仅在各种病理条件下才会出现明显的上调,CD40L长时间表达可抑制活化的自身反应性淋巴细胞凋亡而引起自身免疫性疾病,因此其表达水平的高低可对患者的预后情况具有预测作用,预后较好者表达水平相对较高。研究证实ITP患者的B淋巴细胞增殖、活化、凋亡等均与健康人群有明显的差异,ITP患者树突状细胞接受内毒素刺激后释放BAFF明显较多,对于B淋巴细胞的存活具有重要的意义<sup>[9]</sup>。研究显示:当采用大剂量激素进行治疗时,ITP患者可出现BAFF水平下调,提示BAFF可能为ITP潜在的治疗靶点<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,ITP患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平明显高于健康人群,无治疗反应患者外周血CD40、CD40L表达及血清BAFF水平明显更高,上述指标对ITP患者疗效具有较高的预测价值。因本研究为单中心研究,样本量较少,取得的结果可能有一定的偏差,下步将扩大样本量进行进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Iwasa T, Nakamura K, Ihara E, et al. The Effective Treatment with Cyclosporine of a Ulcerative Colitis Patient with Concurrent Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Who Subsequently Developed Spontaneous Pneumomediastinum [J]. Intern Med, 2017, 56(11):1331-1337.
- [2] Nakao H, Ishiguro A, Ikoma N, et al. Acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with intravenous immunoglobulin and glucocorticoid: A case report [J]. Medicine, 2017, 96(14):e6547.
- [3] Shimazu Y, Uchiyama T, Mizumoto C, et al. Concurrent Autoimmune Neutropenia and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Associated with IgG4-related Disease [J]. Intern Med, 2018, 57(13):1911-1916.
- [4] Khoury HJ, Collins RH, Blum W, et al. Immune responses and long-term disease recurrence status after telomerase-based dendritic cell immunotherapy in patients with acute myeloid leukemia [J]. Cancer, 2017, 123(16):3061-3072.
- [5] 中华医学会血液分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版) [J]. 中华血液学杂志, 2011(3):214-216.
- [6] Takase K, Kada A, Iwasaki H, et al. High-dose Dexamethasone Therapy as the Initial Treatment for Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Protocol for a Multicenter, Open-label, Single Arm Trial [J]. Acta Med Okayama, 2018, 72(2):197-201.
- [7] Ichimata S, Kobayashi M, Honda K, et al. Acquired amegakaryocytic thrombocytopenia previously diagnosed as idiopathic thrombocytopenic purpura in a patient with hepatitis C virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(35):6540-6545.
- [8] Segna D, Dufour JF. Other Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C Virus Infection (Pulmonary, Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, Nondiabetes Endocrine Disorders) [J]. Clin Liver Dis, 2017, 21(3):607-629.
- [9] Ackv DN, Annichinobizzacchi JM, Maximo CA, et al. Patterns of care and burden of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Brazil [J]. J Medical Econ, 2017, 20(8):1.
- [10] Aref S, Elghonemy MS, Elaziz SA, et al. Impact of serum immunoglobulins level and IL-18 promoter gene polymorphism among Egyptian patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Hematology, 2017, 22(2):99-104.
- [11] Chen J, Li JH, Zhao SJ, et al. Clinical significance of costimulatory molecules CD40/CD40L and CD134/CD134L in coronary heart disease: A case-control study [J]. Medicine, 2017, 96(32):e7634.
- [12] Chen JM, Guo J, Wei CD, et al. The association of CD40 polymorphisms with CD40 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus [J]. BMC Genetics, 2015, 16(1):121.
- [13] Petramala L, Iacobellis G, Carnevale R, et al. Enhanced Soluble Serum CD40L and Serum P-Selectin Levels in Primary Aldosteronism [J]. Horm Metab Res, 2016, 48(07):440-445.
- [14] Lin XF, Ten XL, Tang XB, et al. Serum soluble CD40 ligand levels after acute intracerebral hemorrhage [J]. Acta Neur Scand, 2016, 133(3):192-201.
- [15] Elizondo D, Andargie T, Kubhar D, et al. CD40-CD40L crosstalk drives fascin expression in dendritic cells for efficient antigen presentation to CD4+ T cells [J]. Int Immunol, 2017, 29(3):121-131.

## 乳头状肾细胞癌实性亚型1例报道并文献复习

王芳<sup>1</sup> 相龙全<sup>1</sup> 李倩<sup>1</sup> 王海庆<sup>2</sup> 程军<sup>3</sup> 林凡忠<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 探讨乳头状肾细胞癌实性亚型(SPRCC)1例的临床病理特征、免疫表型、鉴别诊断以及临床预后。**方法** 对1例SPRCC病例进行显微镜下HE切片观察组织学特征,采用EnVision法染色观察其免疫表型并与其它类型肾细胞肿瘤进行鉴别诊断。**结果** SPRCC组织学特点为肿瘤细胞排列呈实性片状、小管状、囊状,乳头状结构很少或几乎看不到,肿瘤细胞呈立方形,胞浆嗜酸性,细胞核大小较一致,核仁不明显,WHO/ISUP分级较低,大部分为1级,少部分为2级。免疫表型示CKpan、CK7、CK8/18、CK19、P504S、CD10、EMA、PAX-8以及Vimentin均表达,而RCC、WT-1、CK20、CD57、Syn、CD56、CgA、CD117、Desmin、SMA、Myogenin、S-100、E-cadherin均不表达,Ki-67阳性指数很低。**结论** SPRCC镜下特点不同于经典型乳头状肾细胞癌,具有独特的结构特点,而免疫表型又与经典型的乳头状肾细胞癌几乎表达一致,通过HE观察与免疫组化的鉴别诊断相结合,以帮助明确诊断。

**[关键词]** 乳头状肾细胞癌;组织学特点;免疫表型;鉴别诊断

### Solid variant of papillary renal cell carcinoma: a case report and literature review

WANG Fang<sup>1</sup>, XIANG Longquan<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WANG Haiqing<sup>2</sup>, CHENG Jun<sup>3</sup>, LIN Fanzhong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pathology, Jining NO.1 People's Hospital, Jining, Shandong, 272111; 2. Department of Vascular Surgery, NO.1 People's Hospital, Jining, Shandong, 272111; 3. Department of Radiology, Binzhou People's Hospital, Binzhou, Shandong, 256610)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the clinicopathological features, immunophenotype, differential diagnosis and clinical prognosis in one case of solid variant of papillary renal cell carcinoma (SPRCC). **Methods** Cancer tissues from one case of SPRCC were examined by HE staining under a microscope to observe the histological features. The immunophenotype was observed with EnVision staining. The differential diagnosis was performed with other types of renal cell tumors. **Results** The histologic feature of SPRCC is that the tumor cells were arranged in solid lamellae, small tubes and sacs, and the papillary structure was rare or almost invisible. The tumor cells are cubic, eosinophilic cytoplasm. The size of the nucleus is consistent, the nucleolus is not obvious. The WHO/ISUP grade is low. Most of them are grade 1, and a few of them are grade 2. Immunophenotypes show that CKpan, CK7, CK8/18, CK19, P504S, CD10, EMA, PAX-8 and Vimentin are all expressed, while RCC, WT-1, CK20, CD57, Syn, CD56, CgA, CD117, Desmin, SMA, Myogenin, S-100, E-cadherin are not expressed. Ki-67 positive index is very low. **Conclusion** The characteristics of SPRCC under the microscope are different from the classic papillary renal cell carcinoma, with unique structural characteristics. The immunophenotype is almost the same as the classic papillary renal cell carcinoma. To help determine the diagnosis, immunohistochemistry and HE staining should be applied simultaneously.

**[KEY WORDS]** Solid variant of papillary renal cell carcinoma; Histological characteristics; Immunophenotype; Differential diagnosis

作者单位:1. 济宁市第一人民医院病理科,山东,济宁 272111

2. 济宁市第一人民医院血管外科,山东,济宁 272111

3. 滨州市人民医院放射科,山东,滨州 256610

\*通信作者:林凡忠, E-mail:461940072@qq.com

乳头状肾细胞癌(papillary renal cell carcinoma, PRCC)作为肾细胞癌的一种类型,具有典型的乳头状结构,乳头具有纤细的血管轴心,典型的乳头结构至少50%以上。乳头状肾细胞癌实性亚型(solid variant of papillary renal cell carcinoma, SPRCC)作为乳头状肾细胞癌的一个亚型,镜下有实性片状、小管状、囊状结构,几乎看不到乳头结构,细胞呈中等大小,核分级较低,免疫表型与PRCC较一致,该亚型肿瘤较为少见<sup>[1]</sup>。

### 1 材料和方法

标本以10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,常规切片,分别进行HE染色及免疫组织化学标记。免疫组织化学采用罗氏全自动免疫组织化学染色仪进行染色。所用一抗CKpan、CK7、CK8/18、CK19、P504S、CD10、EMA、PAX-8、Vimentin、RCC、WT-1、CK20、CD57、Syn、CD56、CgA、CD117、Desmin、SMA、Myogenin、S-100、E-cadherin、Ki-67均为迈新公司产品。

### 2 结果

#### 2.1 临床资料

患者,男,73岁,因腹泻到医院就诊,行CT检

查提示右肾占位,于2016年12月5日住院,患者无明显腰痛、肉眼血尿等不适症状。磁共振显示右肾乏脂肪、少血供占位性病变,考虑肾癌,大小约3.7×3.6×2.1 cm。随行腹腔镜下右肾部分切除,术中见肿瘤位于右肾背外侧肾门水平,完整游离肾周脂肪暴露肿瘤,零缺血状态下完整切除肿瘤。

#### 2.2 病理检查

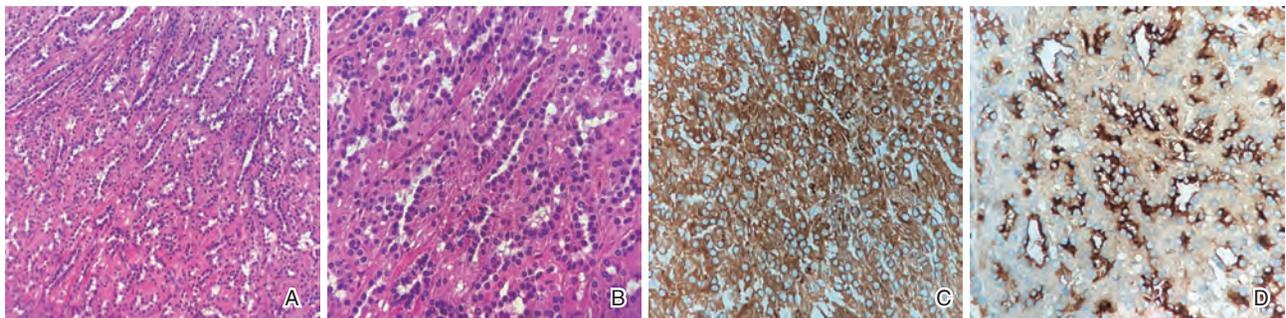
大体观察:肿瘤大小约4×3×2 cm,灰白色,类圆形,边界较清,无包膜,切面灰白、灰红,质实。

镜下观察:肿瘤细胞大部分呈实性片状,部分区域呈小腺管状、囊状结构,肿瘤细胞排列密集,间质成分较少,细胞轻度异型,细胞呈立方状、矮柱状,细胞核较小,核仁不明显,细胞质呈细颗粒状、嗜酸性,很难找到核分裂,无病理性核分裂,WHO/ISUP分级较低,大部分为1级,少部分为2级。(图1A,B)

免疫结果表型:(图1C,D,表1)

#### 2.3 随访

术后随访39个月,患者一般情况较好,无复发、转移,并将对患者继续随访。



注:A.肿瘤细胞呈实性片状、小腺管状、囊状结构,肿瘤细胞排列密集(HE×200);B.肿瘤间质少,细胞异型性小,无病理性核分裂,细胞呈立方状、矮柱状,胞核小,核仁不明显,胞质呈嗜酸性细颗粒状(HE×400);C.Vimentin示肿瘤细胞弥漫阳性(IHC×400);D.EMA示肿瘤细胞部分阳性(IHC×400)

图1 SPRCC组织学特点及免疫表型

Figure 1 Histological characteristics and immunophenotype of SPRCC

表1 乳头状肾细胞癌实性亚型临床资料及免疫组化结果

Table 1 The clinical datas and immunohistochemical results of SPRCC

性别	年龄	部位	肿瘤大小	免疫组化结果阳性	免疫组化结果阴性
男	73岁	右肾背外侧 肾门水平	4×3×2 cm	CKpan、CK7、CK8/18、CK19、 P504S、CD10、EMA、PAX-8、 Vimentin、Ki-67 阳性率1%	RCC、WT-1、CK20、CD57、Syn、 CD56、CgA、CD117、Desmin、SMA、 Myogenin、S-100、E-cadherin

### 3 讨论

#### 3.1 文献复习

乳头状肾细胞癌发生率在肾细胞癌中排第2位,5年生存率为80%~90%。病变可累及双侧肾脏或多灶发生。PRCC是一具有乳头状或小管乳头状结构的肾实质恶性肿瘤,乏血供,起源于肾实质的近曲小管或远曲小管。大体标本一般呈实性,灰白色,常有出血、坏死或囊性变,形态多不规则,肿瘤边界清者可有假包膜。组织学上可见癌细胞构成的多少不等的小管和乳头状结构,乳头多由纤细的纤维血管轴心构成,偶见乳头轴心因水肿和结缔组织透明变性而变宽,其中可有泡沫状巨噬细胞或胆固醇结晶,间质内常见砂砾体,肿瘤细胞有丰富的胞浆,形态多呈立方状或矮柱状<sup>[2]</sup>。经典的PRCC主要分为I型和II型,I型:乳头表面被覆小细胞,胞浆稀少,单层排列<sup>[3]</sup>。II型:肿瘤细胞核分级高,胞浆嗜酸性,细胞核呈假复层排列。I型者多灶性病变更常见,预后好于II型<sup>[4]</sup>。PRCC具有典型的乳头状结构,乳头为具有纤细的血管轴心的真性乳头,并且这种典型的乳头结构至少50%以上<sup>[5]</sup>。

乳头状肾细胞癌实性亚型作为PRCC一个特殊亚型,主要表现为以实性片状为主,部分区可表现为小管状或短乳头状结构类似肾小球。肿瘤常见出血,罕见坏死,常见巨噬细胞和泡沫细胞,巨噬细胞内、间质和肿瘤细胞胞浆内可有含铁血黄素沉积。乳头轴心和周围纤维化间质中常有钙化,也可出现草酸钙结晶<sup>[6]</sup>。肿瘤细胞排列密集,间质成分较少,细胞轻度异型,细胞呈立方状、矮柱状,细胞核较小,核仁不明显,呈细颗粒状、嗜酸性,很难找到核分裂,无病理性核分裂。根据2016版WHO泌尿男性生殖系统肿瘤分类推荐使用WHO/ISUP推出的4级分级系统,SPRCC细胞核多为WHO/ISUP1-2级<sup>[7]</sup>。免疫表型表达CK8/18、CK19、EMA、CK7、CD10、P504S、PAX-8以及Vimentin,而不表达CK20、RCC、WT-1、CD57、S-100、CD117等<sup>[8-9]</sup>。

本例患者术后随访39个月,患者一般情况较好,无复发、转移。SPRCC是一种低度恶性的肾细胞肿瘤,临床分期较早,预后较好<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 鉴别诊断

SPRCC组织学形态与后肾腺瘤、嗜酸细胞腺

瘤以及透明细胞乳头状肾细胞癌等肿瘤相似,需要进行鉴别诊断。

##### 3.2.1 SPRCC与后肾腺瘤的鉴别

后肾腺瘤(metanephric adenoma)又称后肾源性肾瘤是一种十分罕见的肾脏良性肿瘤,可发生于各年龄组,但最常见于女性患者,可伴有真性红细胞增多症及肉眼血尿等。向上皮组织分化的生后肾组织是其组织来源,所以有人称之为成熟的或分化的肾母细胞瘤<sup>[11]</sup>。

大体可见与周围肾组织境界清楚的球形肿瘤,直径可达15cm,切面灰白,有时可见出血、坏死及钙化。组织学见瘤细胞体积大,形态一致,胞核染色质细腻,核仁不明显,伴有少量浅淡胞浆;排列成小管状,间质较少,呈疏松状。后肾腺瘤细胞形态和结构均较一致,与肾母细胞瘤和肾细胞癌不同,其肿瘤体积较大,结构单纯,其形态及免疫表型同分化型肾母细胞瘤和肾源性残余相似,被认为是分化成熟的肾母细胞瘤<sup>[12]</sup>。免疫表型示低分子量CK阴性,高分子量的CK部分阳性,Vimentin阳性。肿瘤细胞可表达CKpan、CD57及WT-1,而EMA和P504S均阴性<sup>[12-13]</sup>。

SPRCC需要与后肾腺瘤以及上皮为主型肾母细胞瘤进行鉴别,最近的文献提示,Cadherin17(CDH17)在81%后肾性腺瘤阳性表达,而在上皮为主型肾母细胞瘤和SPRCC均为阴性表达,是一种敏感而特异性免疫标记<sup>[14]</sup>,有助于两者区别。

##### 3.2.2 SPRCC与肾脏嗜酸细胞瘤的鉴别

肾脏嗜酸细胞瘤(renal oncocytoma)是可能来自集合管插入细胞的一种肾脏的良性上皮性肿瘤,肿瘤由胞浆嗜酸性的大细胞构成。临床多无症状,常因体检时偶然发现。男性居多,发病年龄多在60~70岁,是一种生长缓慢、预后良好的良性肿瘤。

大体上肿瘤多单侧发生,一般体积较大,边界清楚,无完整包膜,切面呈实性,均质,棕褐色,多数肿瘤中央出现灰白色星芒状瘢痕,在大体上与SPRCC有较明显区别。组织学肿瘤细胞呈实性片状,腺管状或巢团状,间质少,肿瘤细胞多为较一致的圆形或多角形,细胞质为嗜酸性颗粒,细胞核小,无明显核仁,几乎无核分裂,无病理性核分裂,无坏死,镜下形态与SPRCC较难鉴别<sup>[15]</sup>。

免疫表型示嗜酸细胞瘤 CKpan、CD117、EMA、CK8/18 表达率较高, Vimentin、CD10 低表达或不表达, CK7 不表达或小灶性低表达, Ki-67 阳性率多 <1%, 依靠免疫表型能够将两者区分<sup>[16]</sup>。

### 3.2.3 SPRCC 与透明细胞乳头状肾细胞癌的鉴别

透明细胞乳头状肾细胞癌(clear cell papillary renal cell carcinoma, CCPRCC)是 2016 版 WHO 泌尿和男性生殖系统肿瘤类型中的一个新的亚型<sup>[17]</sup>。

大体形态主要局限于肾内, 界限清楚, 具有较厚的包膜, 切面灰黄、灰红或黄褐色, 以实性为主, 也可伴有囊性成份, 质地中等, 无明显出现、坏死及钙化。

组织学特征肿瘤细胞大部分排列呈管状、腺泡状、乳头状、囊状或实性巢状等结构组成, 可以以某一种结构为主, 也可以多种结构相混合。肿瘤细胞小至中等大小, 立方状或矮柱状, 细胞核大小较一致, 核仁不明显, WHO/ISUP 分级较低, 大部分为 I 级, 少部分为 II 级<sup>[18]</sup>。大部分区域可见肿瘤细胞核远离基底部朝向腔面, 形态特征类似于早分泌期子宫内膜的核下空泡。间质内及乳头轴心无泡沫细胞、含铁血黄素沉积及砂砾体形成<sup>[19]</sup>。

免疫表型 CK7 弥漫阳性, CA9 呈细胞膜基底部及侧面阳性, 腔面阴性的“杯口状”着色<sup>[20]</sup>。CKpan、CK8/18、CK19、EMA、PAX-8、Vimentin 阳性, 而 CD10、CD117、P504S 阴性, Ki-67 阳性率较低, 约 ≤5%<sup>[21]</sup>, 而本例 CK7 为局部阳性, 有助于鉴别。

结合大体形态、组织学特征及免疫表型将 SPRCC 与后肾腺瘤、嗜酸细胞瘤以及 CCPRCC 能够较明确的进行鉴别诊断。

### 参考文献

- [1] Yang C, Shuch B, Kluger H, et al. High WHO/ISUP Grade and Unfavorable Architecture, Rather Than Typing of Papillary Renal Cell Carcinoma, May Be Associated With Worse Prognosis[J]. *Am J Surg Pathol*, 2020 Feb 25.
- [2] 肖若陶, 马潞林, 等. 乳头状肾细胞癌 60 例临床病理特征分析[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2017, 22(9): 674-677.
- [3] 严景民, 盛海波, 等. II 型乳头状肾细胞癌的临床病理特征和预后[J]. *空军医学杂志*, 2018, 34(6): 412-414.
- [4] 王艳芬, 张新华, 等. 实性乳头状肾细胞癌 1 例的免疫表型和细胞遗传学特征[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(8): 912-917.
- [5] 李世杰, 陈小楠, 吴斌. 乳头状肾细胞癌 60 例临床特点及预后相关因素分析[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2019, 11(1): 41-44.
- [6] Renshaw AA, Zhang H, Corless CL, Fletcher JA, Pins MR. Solid variants of papillary (chromophil) Renal Cell Carcinoma: clinicopathologic and genetic features [J]. *Am J Surg Pathol*, 1997, 21(10): 1203-1209.
- [7] Moch H, Humphrey P, Ulbright T, et al. WHO classification of tumours of urinary system and male genital organ [M]. Lyon: IARC Press, 2016.
- [8] Oncocytic papillary renal cell carcinoma with solid architecture: Mimic of renal oncocytoma [J]. *Pathol Int*, 2008, 58: 164-168.
- [9] 余晶晶, 杨育生, 等. NapsinA、CK7、P504S、CD10 及 TFE3 联合应用在乳头状肾细胞癌鉴别诊断中的价值[J]. *现代实用医学*, 2018, 30(11): 1521-1523.
- [10] 辛士永, 张建国, 高中伟. 乳头状肾细胞癌与肾透明细胞癌临床病理特征及预后对比分析[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2018, 36(3): 189-193.
- [11] 王聪, 范钦和, 等. 后肾腺瘤八例临床病理学特点[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(3): 154-157.
- [12] 周全中, 张体江, 等. 后肾腺瘤的 CT、MRI 表现及其病理基础[J]. *临床放射学杂志*, 2019, 38(3): 500-502.
- [13] 杨飞亚, 邢念增, 等. 后肾腺瘤 12 例临床病理特征及诊治分析[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2019, 34(5): 389-393.
- [14] 饶秋, 夏秋媛, 周晓军, 等. 2016 版 WHO 肾脏肿瘤新分类解读[J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(7): 435-441.
- [15] 于双妮, 肖雨, 陈杰, 等. 86 例肾嫌色细胞癌与 33 例嗜酸细胞腺瘤的临床病理特征的比较分析[J]. *诊断病理学杂志*, 2018, 25(10): 673-679.
- [16] Truong LD, Shen SS. Immunohistochemical diagnosis of renal neoplasms [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(1): 92-109.
- [17] 闫广宁, 陈晓东, 赖日全. WHO(2016)肾肿瘤新分类的再学习[J]. *诊断病理学杂志*, 2018, 25(5): 398-400.
- [18] Liddell H, Mare A, Heywood S, et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma: a potential mimic of conventional clear cell renal carcinoma on core biopsy [J]. *Case Rep Urol*, 2015, 2015: 1-4.
- [19] 张菁, 王晨亮, 等. 透明细胞乳头状肾细胞癌 1 例[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(7): 825-826.
- [20] 曾英, 肖华亮, 等. 透明细胞乳头状肾细胞癌 2 例报道并文献复习[J]. *诊断病理学杂志*, 2018, 25(3): 177-180.
- [21] 杨晓群, 王朝夫等. 透明细胞乳头状肾细胞癌的临床病理特征[J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(6): 372-376.

# 老年 COPD 伴严重呼吸衰竭患者血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平变化

曹婷婷<sup>1</sup> 万俊<sup>1</sup> 冯永海<sup>2</sup> 楚荷莹<sup>3\*</sup>

**[摘要]** 目的 探讨血清胱抑素 C(CysC)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素 17(IL-17)、激活素 A(ACTA)在老年慢性阻塞性肺疾病(COPD)伴严重呼吸衰竭患者中的表达。方法 选取 2016 年 3 月至 2019 年 3 月本院 224 例老年 COPD 患者,根据有无发生严重呼吸衰竭分组观察组( $n=78$ )、轻症组( $n=146$ ),另选取同期健康体检者 86 例为对照组。比较 3 组不同预后患者血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平,分析血清指标对老年 COPD 伴严重呼吸衰竭的诊断价值及血清指标间相关性,并分析血清指标与 APACHE II 评分相关性及预后预测价值。结果 3 组血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平,差异有统计学意义( $P<0.05$ ); VEGF 与 Cys C、IL-17、ACTA 水平呈负相关, CysC、IL-17、ACTA 间水平呈正相关( $P<0.05$ );死亡患者血清 CysC、IL-17、ACTA 水平、APACHE II 评分高于存活患者, VEGF 水平低于存活患者( $P<0.05$ ); VEGF 水平与 APACHE II 评分呈负相关, CysC、IL-17、ACTA 水平与 APACHE II 评分呈正相关( $P<0.05$ );血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平联合对预测老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的 AUC(0.864)大于单一血清指标,敏感性为 92.86%,特异性为 70.00%。结论 血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平在老年 COPD 伴严重呼吸衰竭患者中呈异常表达,并与病情密切相关,联合检测有望成为老年 COPD 伴严重呼吸衰竭诊断及预后判断的有效手段。

**[关键词]** 胱抑素 C; 血管内皮生长因子; 白细胞介素 17; 激活素 A; 慢性阻塞性肺疾病; 呼吸衰竭

## Changes of serum CysC, VEGF, IL-17, and ACTA levels in elderly patients with COPD and severe respiratory failure

CAO Tingting<sup>1</sup>, WAN Jun<sup>1</sup>, FENG Yonghai<sup>2</sup>, CHU Heying<sup>3\*</sup>

(1. Department of general medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052; 2. Department of respiratory medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052; 3. Department of respiratory medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

**[ABSTRACT]** Objective To investigate the expression of serum cystatin C (CysC), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 17 (IL-17) and activin A (ACTA) in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with severe respiratory failure. Methods 224 elderly patients with COPD were selected in our hospital from March 2016 to March 2019, according to the occurrence of severe respiratory failure, they were divided into an observation group ( $n=78$ ) and a control group ( $n=146$ ), and 86 healthy medical examinees in the same period were selected as the healthy control group. Compared the serum CysC, VEGF, IL-17 and ACTA levels of patients with different prognosis in the three groups and the observa-

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(19A320065)

作者单位:1. 郑州大学第五附属医院全科医学科,河南,郑州 450052

2. 郑州大学第五附属医院呼吸内科,河南,郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院呼吸内科,河南,郑州 450052

\*通信作者:楚荷莹, E-mail: chuheyings@163.com

tion group, and analyzed the diagnostic value of serum indicators for elderly COPD with severe respiratory failure and the correlation between serum indicators, and the correlation between serum indicators and APACHE II score and the prognostic value were analyzed. **Results** The levels of serum CysC, VEGF, IL-17, and ACTA in the three groups were statistically significant ( $P<0.05$ ); VEGF was negatively correlated with CysC, IL-17, and ACTA levels, and CysC, IL-17, and ACTA levels were positively correlated ( $P<0.05$ ); the serum levels of CysC, IL-17, ACTA, and APACHE II score were higher in dead patients than in surviving patients, and VEGF levels were lower than in surviving patients ( $P<0.05$ ); VEGF level was negatively correlated with APACHE II score, and CysC, IL-17, and ACTA levels were positively correlated with APACHE II score ( $P<0.05$ ); the combined serum levels of CysC, VEGF, IL-17, and ACTA in predicting the prognosis of COPD with severe respiratory failure in elderly patients (0.864) was greater than that of a single serum indicator, with a sensitivity of 92.86% and a specificity of 70.00%. **Conclusion** Serum CysC, VEGF, IL-17, and ACTA levels are abnormally expressed in elderly patients with COPD and severe respiratory failure, and are closely related to the disease, and the combined detection is expected to be an effective method for diagnosis and prognosis of elderly COPD with severe respiratory failure.

[KEY WORDS] Cystatin C; Vascular endothelial growth factor; Interleukin 17; Activin A; Chronic obstructive pulmonary disease; Respiratory failure

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)属进行性发展的不完全可逆气流受限型疾病<sup>[1]</sup>,调查显示,我国>40岁人群COPD发病率可达8.2%,入院5年内病死率高达50.0%,并随年龄增长呈持续升高态势<sup>[2]</sup>。由于老年COPD身体机能衰退、呼吸道防御能力减弱,极易进展为通气功能障碍,诱发严重呼吸衰竭。相关研究发现,急性呼吸道感染是COPD患者发生呼吸衰竭的主要原因,可进一步加剧气道炎症,形成恶性循环<sup>[3]</sup>。胱抑素C(Cystatin C, CysC)可损伤呼吸道黏膜上皮细胞,诱导柱状上皮细胞凋亡。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能有效调节肺泡上皮细胞、血管内皮细胞,重塑炎性疾病对肺组织的损害<sup>[4]</sup>。白细胞介素17(Interleukin 17, IL-17)、激活素A(Activin A, AC-

TA)可引发炎症反应,加重气道损伤。然而关于血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA联合对老年COPD伴严重呼吸衰竭的诊断及预后价值尚需进一步研究证实。基于此,本研究探讨血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA与老年COPD伴严重呼吸衰竭患者预后的相关性。具体分析如下。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取2016年3月至2019年3月本院224例老年COPD患者,根据有无发生严重呼吸衰竭分组观察组( $n=78$ )、轻症组( $n=146$ ),另选取同期健康体检者86例为对照组。两组基本资料:年龄、病程、性别、体质量指数、合并症比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),均衡可比,见表1。

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

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

一般资料	观察组( $n=78$ )	轻症组( $n=146$ )	对照组( $n=86$ )	$F/\chi^2$ 值	$P$ 值
性别(男/女)	45/33	84/62	49/37	0.010	0.995
年龄(岁)	65.97±2.15	66.19±1.74	65.80±1.83	1.218	0.297
COPD病程(年)	9.89±1.22	10.02±1.13	9.72±1.30	1.693	0.186
体质量指数( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	22.79±2.20	23.15±2.08	22.94±2.13	0.779	0.460
合并症					
高血压	20(25.64)	37(25.34)	21(24.42)		
糖尿病	13(16.67)	24(16.44)	14(16.28)	0.019	1.000
高脂血症	8(10.26)	14(9.59)	8(9.30)		

纳入标准:①均符合 COPD 相关标准<sup>[5]</sup>;②观察组动脉血氧分压<60 mmHg,动脉血二氧化碳分压>50 mmHg;③年龄>60岁;④患者及家属均签署知情同意书。排除标准:①合并肺大疱、急性肺部感染、气胸者;②近6周全身使用糖皮质激素者;③因肺结核、支气管哮喘、充血性心力衰竭等所致慢性咳嗽喘息者;④睡眠呼吸暂停综合征者;⑤精神行为异常者。本实验经医院伦理委员会同意批准。

## 1.2 方法

### 1.2.1 检测方法

空腹取3 mL 静脉血,离心12 min,3 000 r/min,分离取血清,置于-70℃冰箱低温保存。采用全自动酶标仪(购自美国Bio-Bad公司)以酶联免疫吸附试验检测血清 Cys C、VEGF、IL-17、ACTA 水平,具体操作:设空白孔、标准孔、待测样品孔,酶标包被板上标准孔、待测样品孔分别添加样品(50 μL)、待测样品(50 μL),混匀,封板,置于37℃温水中,促使抗体与抗原充分反应。温育30 min后,每孔均添加洗涤液,反复洗涤5次,后添加酶标试剂(50 μL),并置于37℃温水温育30 min。反复洗涤5次,拍干,添加显色剂。37℃避光显色10 min,于每孔添加终止液(50 μL),终止反应。15 min内450 nm 波长依序测量各孔吸光度(OD值)。

### 1.2.2 治疗方法

两组均予以抗感染、解痉平喘、静脉滴注抗生素、低流量氧疗、强心利尿、纠正电解质失衡等对

症处理,在此基础上观察组接受布地奈德气雾剂联合正压通气治疗。

## 1.2 观察指标

①比较3组血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平。②分析血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平之间相关性。③比较不同预后患者血清指标水平、急性生理与慢性健康状况评分 II (APACHE II)评分,其中 APACHEII 评分最高分71分。④分析血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平与 APACHEII 评分相关性。⑤分析血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平对老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的预测价值。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析处理数据,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,*t*检验,计数资料用*n*(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,多组间表用方差分析,采用 Pearson 进行线性相关性分析,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析诊断、预测价值,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平

3组血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平,差异有统计学意义(*P*<0.05),且血清 CysC、IL-17、ACTA 水平,观察组>轻症组>对照组;VEGF 水平,观察组<轻症组<对照组。见表2。

表2 3组血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平对比( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum CysC, VEGF, IL-17 and Acta levels between the 2 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	Cys C (ng/mL)	VEGF (mg/L)	IL-17 (ng/L)	ACTA (ng/L)
观察组	78	151.23±30.24 <sup>ab</sup>	323.43±54.12 <sup>ab</sup>	65.14±18.52 <sup>ab</sup>	45.69±8.24 <sup>ab</sup>
轻症组	146	130.47±24.58 <sup>b</sup>	387.64±69.12 <sup>b</sup>	44.87±15.76 <sup>b</sup>	36.51±6.25 <sup>b</sup>
对照组	86	102.41±20.37	451.63±67.29	18.31±12.84	25.74±6.13
<i>F</i> 值		79.021	79.267	182.984	178.781
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较<sup>a</sup>*P*<0.05;与健康对照组比较<sup>b</sup>*P*<0.05

## 2.2 血清指标相关性分析

观察组 VEGF 与 CysC、IL-17、ACTA (水平呈负相关关系,CysC 与 IL-17、ACTA 水平呈正相关关系,IL-17 与 ACTA 呈正相关(*P*<0.05)。见图1。

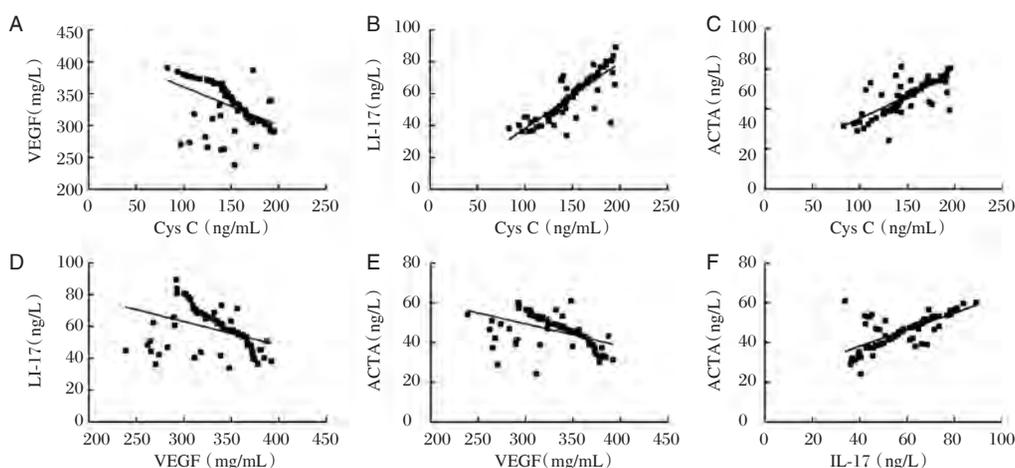
## 2.3 不同预后患者血清指标水平、APACHEII 评分

经有效治疗后,观察组死亡28例,存活50例。死亡患者血清 CysC、IL-17、ACTA 水平、

APACHE II 评分高于存活患者,VEGF 水平低于存活患者,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表3。

## 2.4 血清指标与 APACHEII 评分相关性分析

观察组 VEGF(*r*=-0.349)水平与 APACHE II 评分呈负相关关系,CysC(*r*=0.836)、IL-17(*r*=0.654)、ACTA(*r*=0.675)水平与 APACHE II 评分呈正相关关系,差异有统计学意义(*P*<0.05)。



注:A为CysC与VEGF相关性;B为CysC与IL-17相关性;C为CysC与ACTA相关性;D为VEGF与IL-17相关性;E为VEGF与ACTA相关性;F为IL-17与ACTA相关性

图1 血清指标相关性分析

Figure 1 Correlation Analysis of serum indexes

表3 不同预后患者血清指标水平、APACHE II评分对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of serum index level and APACHE II score in patients with different prognosis ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CysC (ng/mL)	VEGF (mg/L)	IL-17 (ng/L)	ACTA (ng/L)	APACHE II 评分(分)
死亡患者	28	169.32±31.25	158.14±31.31	74.56±19.62	49.30±9.47	31.41±5.02
存活患者	50	141.10±22.83	415.82±70.26	48.31±15.37	39.25±6.12	24.78±4.83
t值		5.283	30.775	6.541	5.689	5.734
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.5 血清指标对老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的预测价值

绘制 ROC 曲线, 血清 CysC、VEGF、IL-17、ACTA 水平联合对预测老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的 AUC 为 0.864 (95%CI: 0.768~0.931, Z 统计: 9.204), 大于血清 VEGF (0.806)、IL-17 (0.796)、ACTA (0.743)、CysC (0.696) 敏感性为 92.86%, 特异性为 70.00%。见图 2。

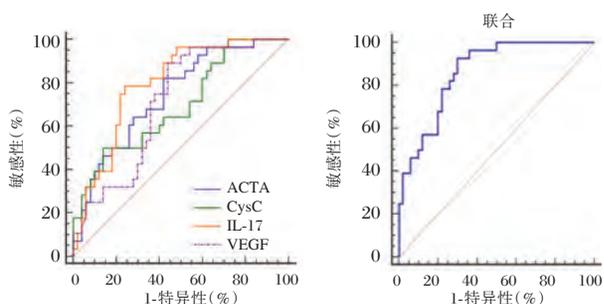


图2 血清指标单一及联合对老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的预测价值

Figure 2 the predictive value of single and combined serum indexes for the prognosis of COPD with severe respiratory failure in the elderly

### 3 讨论

COPD 伴严重呼吸衰竭病理学改变表现为肺实质与气道慢性炎症, 可导致肺泡组织、气道持续损伤, 肺功能受损加重, 引发一系列生理功能与代谢紊乱<sup>[6-7]</sup>。因此, 早期诊断及预测预后对降低 COPD 伴严重呼吸衰竭病死率具有重要意义。

血清 CysC 在老年 COPD 伴严重呼吸衰竭患者呈过度表达。老年 COPD 患者通常合并低氧血症, 可加重巨噬细胞等炎症细胞缺氧受损, 进而导致二氧化碳过度滞留, 引发体内氧化应激, 继而诱导大量 CysC 释放, 加重体内炎症细胞浸润, 损伤呼吸道肺泡上皮, 增加肺换气功能障碍发生风险<sup>[8-9]</sup>。经 ROC 曲线发现血清 CysC 水平具有成为老年 COPD 伴严重呼吸衰竭预后的有效预测因子潜力。

VEGF 水平高表达, 在肺动脉重建中起着关键作用<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, 血清 VEGF 水平在老年 COPD 伴严重呼吸衰竭患者中呈低表达, 与古力鲜·马合木提等<sup>[11]</sup>研究相似, VEGF 水平下降一

定程度会破坏肺部微血管与肺泡壁,增强与肺部炎症反应对抗所致代偿性,从而进一步降低呼吸功能,最终发展为严重呼吸衰竭。本研究还发现,VEGF水平下降可能增加老年COPD伴严重呼吸衰竭死亡患者风险,原因可能与VEGF水平下调可能会降低肺部血管、内皮细胞数量,对肺泡壁及微血管产生间接影响有关。

相关研究表明,COPD患者气道慢性炎症持续存在的主要原因与自身免疫反应有关<sup>[12-13]</sup>。老年COPD伴严重呼吸衰竭患者血清IL-17水平明显上调。自身免疫反应紊乱,会降低老年COPD伴严重呼吸衰竭患者肺功能,促进IL-17分泌,诱导、活化中性粒细胞,参与肺部慢性炎症进展病理损伤,从而加重气道受限程度,诱发呼吸衰竭。Pearson线性相关分析进一步证明抑制IL-17水平表达会减轻全身炎症反应,阻断炎症级联反应,优化气道功能,减轻病情程度,提高老年COPD伴严重呼吸衰竭患者存活率。另外,随COPD病情严重程度加重,ACTA合成、分泌增多,可通过自分泌、旁分泌方式上调炎症因子表达,促进气道平滑肌细胞增殖与迁移,引发细胞外基质沉积,致使气道平滑肌纤维化加重,肺功能减低<sup>[14]</sup>。本研究还发现CysC、VEGF、IL-17、ACTA存在一定关联性,对老年COPD伴严重呼吸衰竭具有一定诊断价值。进一步采用联合应用模式,血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA水平联合预测老年COPD伴严重呼吸衰竭预后特异性可达70.00%,提示血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA水平联合检测在预测老年COPD伴严重呼吸衰竭预后方面具有一定价值。

综上所述,血清CysC、VEGF、IL-17、ACTA联合检测有望成为老年COPD伴严重呼吸衰竭诊断及预后判断的有效手段。

## 参考文献

[1] Shah S A, Velardo C, Farmer A, et al. Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Identification and Prediction Using a Digital Health System[J]. J Med Internet Res, 2017, 19(3):e69.

[2] Liu S, Zhou Y, Liu S, et al. Association between exposure

to ambient particulate matter and chronic obstructive pulmonary disease: results from a cross-sectional study in China [J]. Thorax, 2017, 72(9):788-795.

- [3] 赵春柳,黄靓雯,张利,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重住院患者呼吸道病毒感染与炎症细胞因子的相关性[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(12):942.
- [4] Ikeda N, Nakajima Y, Sho M, et al. The association of K-ras gene mutation and vascular endothelial growth factor gene expression in pancreatic carcinoma [J]. Cancer, 2015, 92(3):488-499.
- [5] Celli B, Decramer M, Wedzicha JA, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Research Questions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(7):e4-e27.
- [6] Anthonisen N R. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. Med J Austral, 2016, 167(5):273-278.
- [7] Wong EKC, Lee PCS, Ansary S, et al. Role of venous blood gases in hypercapnic respiratory failure chronic obstructive pulmonary disease patients presenting to the emergency department [J]. Intern Med J, 2019, 49(7):834-837.
- [8] Klisic A, Kotur-Stevuljevic J, Kavacic N, et al. Relationship between Cystatin C, Retinol-binding Protein 4 and Framingham Risk Score in Healthy Postmenopausal Women [J]. Arch Iran Med, 2016, 19(12):845-851.
- [9] Zhang M, Li Y, Yang X, et al. Serum Cystatin C as an Inflammatory Marker in Exacerbated and Convalescent COPD Patients [J]. Inflammat, 2016, 39(2):625-631.
- [10] Byers DE. Linking VEGF Deficiency and IL-33 Upregulation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(5):550-551.
- [11] 古力鲜·马合木提,李新,张慧,等.VEGF、ICAM-1、IL-13及IL-17在慢阻肺、支气管哮喘及慢阻肺合并哮喘患者中的表达及意义[J].临床肺科杂志,2017,22(9):1563-1566.
- [12] Renáta Marietta Böcskei, Lilla Tamási, Béla Benczúr, et al. Inflammatory markers (IL-6, suPAR) and arterial stiffness parameters in COPD patients [J]. Eur Respirat J, 2016, 48(suppl 60):PA3670.
- [13] Takemura Y, Sasaki M, Goto K, et al. PT08.3: Proinflammatory Cytokine IL-6, But Not TNF- $\alpha$ , Affects Energy Metabolism and Nutritional Status in Patients with Lung Cancer [J]. Clin Nutrit, 2016, 35(1):S38.
- [14] Chaker AM, Zissler UM, Poulos N, et al. Activin-A Is a Pro-Inflammatory Regulator in Type-2-Driven Upper Airway Disease [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 176(1):15-25.

## 14-3-3 $\zeta$ 蛋白在乳腺癌发生发展中的作用研究进展

董正远<sup>1</sup> 杨清玲<sup>2</sup> 陈昌杰<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 14-3-3蛋白家族(14-3-3 protein family)是一类酸性且高度保守的小分子蛋白,广泛存在于真核生物细胞内。14-3-3蛋白自身无明显的催化活性,主要与其他蛋白相互作用而发挥调控靶蛋白的作用。14-3-3 $\zeta$ 是14-3-3蛋白家族的重要成员之一,近几年受到学者的广泛关注,且越来越多的学者开展14-3-3 $\zeta$ 与癌症的研究。本文综述了近几年研究者对14-3-3 $\zeta$ 与癌症的研究,尤其与乳腺癌耐药、复发、转移等相关研究,为乳腺癌的诊疗提供新思路、寻找新靶标。

**[关键词]** 14-3-3 $\zeta$ 蛋白; 乳腺癌

### 14-3-3 $\zeta$ and breast cancer

DONG Zhengyuan<sup>1</sup>, YANG Qingling<sup>2</sup>, CHEN Changjie<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Cancer Transforming Medicine in Anhui Province, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000; 2. Department of Biochemistry & Molecular Biology; Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

**[ABSTRACT]** The 14-3-3 protein family is a kind of acidic and highly conserved small molecule proteins, widely exists in eukaryotic cells. The 14-3-3 protein has no obvious catalytic activity, and mainly interacts with other proteins to regulate the target protein. 14-3-3 $\zeta$  is one of the important members of the 14-3-3 protein family. Recently, we found that 14-3-3 $\zeta$  is a novel target for the cancer therapy. In this review, we focus on the current progress on breast cancer resistance, recurrence, and metastasis, and discuss the potential of 14-3-3 $\zeta$  serviced as an effective therapeutic target for breast cancer in patient whose tumors overexpress 14-3-3 $\zeta$ .

**[KEY WORDS]** 14-3-3 $\zeta$ protein; Breast cancer

癌症目前仍然是医学界难以克服的障碍,也是世界范围内导致死亡的常见疾病,且发病率呈上升趋势。癌症的治疗过程中常常出现耐药、转移等情况,导致治疗失败,迫切需要一种新的有效的治疗手段来治疗癌症,或者能够早期发现癌症,达到早期治疗的目的。最近几年研究人员发现了

14-3-3 $\zeta$ ,为癌症的早期诊断、治疗以及缓解耐药提供了新思路。14-3-3 $\zeta$ 通过与靶蛋白结合影响其活性达到调节靶蛋白的目的<sup>[1]</sup>。14-3-3 $\zeta$ 蛋白是一种信号转导蛋白,介导细胞信号转导,在细胞迁移、凋亡和侵袭等过程中起到重要作用<sup>[2-3]</sup>。14-3-3 $\zeta$ 也参与癌症的发生,细胞周期进程及耐药等过

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学重大项目(KJ2019ZD28);安徽省学术与技术带头人后备人选资助项目(2017H110);

蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byyxc1926)

作者单位:1. 蚌埠医学院癌症转化医学安徽省重点实验室,安徽,蚌埠 233000

2. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室,安徽,蚌埠 233000

\*通信作者:陈昌杰, E-mail:tochenchangjie@163.com

程<sup>[4]</sup>。在本文中重点综述了14-3-3 $\zeta$ 与癌症,尤其与乳腺癌的发生及耐药、复发、转移相关的分子机制,探讨其作为标志物、临床诊断以及治疗靶点的价值。

## 1 14-3-3 $\zeta$ 与癌症

14-3-3 $\zeta$ 调节多种信号通路,参与癌症的发生发展、耐药、转移等过程,因此,14-3-3 $\zeta$ 可能是一种新的癌症治疗分子靶点<sup>[5]</sup>。

在肺癌研究中,降低Hsp 27或14-3-3 $\zeta$ 抑制了非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)的侵袭和转移,且只有Hsp 27和14-3-3 $\zeta$ 互补转染才能完全恢复Hsp 27和14-3-3 $\zeta$ 的侵袭和转移能力<sup>[6]</sup>。在卵巢癌研究中,卵巢癌组织中14-3-3 $\zeta$ 蛋白的表达水平高于正常组织,14-3-3 $\zeta$ 蛋白高表达与卵巢癌TNM分期及无转移预后有关,低表达可抑制卵巢癌细胞增殖、迁移、及体内转移,促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。在骨肉瘤相关研究中,14-3-3 $\zeta$ 蛋白在正常组织中表达很低,在骨肉瘤组织中呈高表达,且骨肉瘤患者肿瘤的大小与14-3-3 $\zeta$ 蛋白的表达有关<sup>[8]</sup>,为骨肉瘤的临床诊断提供一条新的思路。在原发性肝癌研究中,Zhao JF等<sup>[9]</sup>证实了ASH 1-miR-375-14-3-3 $\zeta$ 信号轴的存在,ASH 1和miR-375被显著下调,而14-3-3 $\zeta$ 明显升高,研究表明ASH 1和miR-375作为肿瘤抑制因子,而14-3-3 $\zeta$ 在原发性肝癌中起癌基因的作用。综合以上研究可以发现,14-3-3 $\zeta$ 的高表达对于癌症的发生可能具有重要的作用,在多种癌症组织中表达过高。

## 2 14-3-3 $\zeta$ 与乳腺癌

乳腺癌作为女性恶性肿瘤中发病率最高的恶性肿瘤<sup>[10]</sup>,在治疗过程中往往发生耐药,而耐药也是影响乳腺癌治疗的重要因素<sup>[11]</sup>。近几年来,14-3-3 $\zeta$ 在乳腺癌耐药中的研究越来越重要。随着对14-3-3 $\zeta$ 的不断研究,人们发现14-3-3 $\zeta$ 不仅在乳腺癌耐药方面起着重要作用,在乳腺癌的复发和转移方面也至关重要。

### 2.1 14-3-3 $\zeta$ 与乳腺癌的发生

14-3-3 $\zeta$ 表达增加始于乳腺疾病早期的不典型导管增生,同时他们在MCF10A细胞中过表达14-

3-3 $\zeta$ ,发现14-3-3 $\zeta$ 过表达严重破坏腺泡结构,认为14-3-3 $\zeta$ 过表达是乳腺癌发生的早期因素<sup>[12]</sup>。Rehman SK<sup>[13]</sup>的实验发现14-3-3 $\zeta$ 高表达增强了MAPK/c-Jun信号,增加了miR-221的转录使p27 CDKI的翻译水平下降,加速细胞增殖,且14-3-3 $\zeta$ -miR-221-p27增殖轴也在乳腺癌患者中发挥作用,这表明,14-3-3 $\zeta$ 的高表达可能在乳腺癌的发生发展中起着因果作用。TGF- $\beta$ /Smad信号在肿瘤中发挥双重角色,其中14-3-3 $\zeta$ 发挥关键调控作用<sup>[14]</sup>。TGF- $\beta$ 在癌前病变细胞中作为癌症抑制因子,但在癌细胞中作为转移促进剂,Xu J等<sup>[15]</sup>证实了TGF- $\beta$ 通过下游效应分子Smads发挥两种不同的功能。在乳腺上皮细胞癌前病变中,14-3-3 $\zeta$ 使p53稳定性降低,抑制了TGF- $\beta$ 的癌症抑制功能,促进癌症的发生;反之,14-3-3 $\zeta$ 可促进TGF- $\beta$ 诱导骨转移。表明14-3-3 $\zeta$ 对癌症的重要性。以上研究表明14-3-3 $\zeta$ 在癌症的发生中起重要作用,可作为一种新型分子标志物,用于乳腺癌的早期诊断。

代谢重排是癌症的一个特征,代谢失调发生在癌症的早期阶段,并对癌症的发生起着关键作用,早期乳腺肿瘤病变显示14-3-3 $\zeta$ 的表达与典型糖酵解基因的表达密切相关,尤其是乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)的表达,在人乳腺癌上皮细胞中14-3-3 $\zeta$ 的高表达上调了LDHA,刺激早期转化,促进乳腺癌发生<sup>[16]</sup>;支架蛋白(scaffolding protein)在调节信号网络保真度方面发挥着重要作用,缺乏这种功能往往是发生癌症等疾病的基础,Suen KM<sup>[17]</sup>发现典型的支架蛋白Shc被细胞外信号调节激酶ERK磷酸化。此外,在三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer Tnbc)细胞株中,shc苏氨酸磷酸化被特异性上调。利用体外模型和生物物理分析进一步发现,Shc苏氨酸磷酸化可能通过募集14-3-3 $\zeta$ 和Pin-1而引起Akt和ERK信号的升高。由此可见,体内14-3-3 $\zeta$ 的异常表达可能间接地促进乳腺癌的发生,或者在重要调节途径中发挥关键调控作用。

### 2.2 14-3-3 $\zeta$ 与乳腺癌耐药

在乳腺癌中,约70%属于雌激素受体阳性,这种乳腺癌对激素疗法较为敏感。雌激素通路相关的内分泌治疗是国内外乳腺癌治疗的标准方案,

其中他莫昔芬作为内分泌治疗的一线药物,具有良好的效果,且经济、低毒性,但在治疗过程中常发生耐药<sup>[18]</sup>。Bergamaschi A<sup>[19]</sup>的研究发现揭示了他莫昔芬具有上调 14-3-3 $\zeta$  的作用,因为它能够快速下调专门针对 14-3-3 $\zeta$  的 microRNA-451。患乳腺癌时,由于 miR-451 的高表达,下调 14-3-3 $\zeta$ ,恢复了 SERMs 对内分泌抵抗细胞的生长抑制作用。此外,Liu ZR<sup>[20]</sup>进一步研究发现 miR-451a 过表达可增强 MCF-7 和 LCC 2 细胞对他莫昔芬的敏感性。miR-451a 与 14-3-3 $\zeta$  的表达呈负相关,14-3-3 $\zeta$  低表达增加细胞凋亡,14-3-3 $\zeta$  与 miR-451a 的相互调节抑制对他莫昔芬的抵抗作用,所以 14-3-3 $\zeta$  对他莫昔芬耐药具有关键调控作用。14-3-3 $\zeta$  作为内分泌治疗失败风险的重要预测指标,对生长因子信号转导有重要影响,且促进细胞存活和抵抗内分泌疗法,所以靶向 14-3-3 $\zeta$  蛋白及其共调控蛋白(如 FOXM 1)在恢复内分泌敏感性方面具有重要价值<sup>[21]</sup>。由此可见,14-3-3 $\zeta$  的出现为逆转乳腺癌耐药打开了新的大门。

### 2.3 14-3-3 $\zeta$ 与乳腺癌复发

为了治愈或延缓乳腺癌患者的生存周期,治疗方法有很多,比如:手术治疗、放疗、化疗、内分泌疗法等,因为治疗后的复发,使得患者的生存时间大大缩短。迫切需要找到肿瘤复发的原因或分子机制。目前研究发现 14-3-3 $\zeta$  的表达可能是乳腺癌复发的分子机制<sup>[22]</sup>。在肿瘤的复发中,14-3-3 $\zeta$  的阳性率为 70%~75%,而原发肿瘤的阳性率为 45%<sup>[23]</sup>。在乳腺肿瘤中,14-3-3 $\zeta$  高水平的基因特征包括许多与有丝分裂和胞质分裂有关的功能,包括极光激酶-B、马球样激酶-1、CDC25B 和 birc5,该基因特征与乳腺癌早期复发相关<sup>[24]</sup>,从基因层面描述了 14-3-3 $\zeta$  蛋白与乳腺癌复发的关系,具有重要参考价值。Li Y 等<sup>[25]</sup>通过整合基因组学,从染色体 8q22 中发现了少数高表达和扩增的基因,这些基因与早期疾病复发有关,siRNA 介导两种基因,即抗凋亡基因 14-3-3 $\zeta$  和溶酶体基因 LAPTM4B,且 LAPTM4B 和 14-3-3 $\zeta$  的 8q22 扩增和高表达对复发有一定的抑制作用。14-3-3 $\zeta$  蛋白状态与肿瘤分级、大小和雌激素受体  $\alpha$ (ER $\alpha$ ) 显著相关,而且 14-3-3 $\zeta$  蛋白的高表达也与复发部位有关<sup>[26]</sup>。综合以上研究可以发现 14-3-3 $\zeta$  的高表达与乳腺癌复发密切相

关,对以后乳腺癌的诊治有重要价值依据。

### 2.4 14-3-3 $\zeta$ 与乳腺癌转移

目前,转移仍然是乳腺癌死亡的主要原因之一。转移使乳腺癌治疗的难度加大,如何控制乳腺癌转移迫在眉睫。Lu J 等<sup>[27]</sup>研究发现,14-3-3 $\zeta$  高表达降低细胞粘附,诱导 EMT 发生,介导非浸润性导管原位癌(noninvasive ductal carcinomas in situ DCIS)向浸润性乳腺癌(Invasive breast cancer IBC)发展。且高表达 ErbB 2 和 14-3-3 $\zeta$  的乳腺癌患者的转移率高于仅表达 ErbB 2 的患者,14-3-3 $\zeta$  的高表达促使乳腺上皮细胞间质化,促进了乳腺癌细胞浸润转移;TGF- $\beta$  在癌细胞中起促进转移的作用,14-3-3 $\zeta$  能稳定乳腺癌细胞中的 Gli2,促进 TGF- $\beta$  诱导骨转移<sup>[15]</sup>。14-3-3 $\zeta$  蛋白的高表达不仅与复发部位有关而且有肺和胸壁远处转移的倾向,减少其表达或干扰其作用可能会降低乳腺癌的转移并改善临床症状和乳腺癌患者的预后,预示着 14-3-3 $\zeta$  蛋白可能会成为乳腺癌新的治疗靶点<sup>[26]</sup>。此外,14-3-3 $\zeta$  在乳腺癌中是多种信号调节网络的关键调控因,14-3-3 $\zeta$  的高表达使 p53 下降,破坏乳腺上皮细胞并促进乳腺上皮细胞 EMT,使转移发生<sup>[28]</sup>。14-3-3 $\zeta$  与磷酸化的 YAP1 相互作用,使其隔绝于细胞质,并且激活 14-3-3 $\sigma$ ,减弱 TGF- $\beta$  的抑癌作用,进一步促进乳腺癌细胞的转移<sup>[29]</sup>。

## 3 小结与展望

本篇文章介绍了 14-3-3 $\zeta$  与肿瘤尤其是乳腺癌相关关系。14-3-3 $\zeta$  作为一种潜在的靶标,能够调节相关基因或靶蛋白,进而影响细胞的生长周期、调控细胞凋亡等。14-3-3 $\zeta$  在肿瘤中有较高的表达,对肿瘤尤其是乳腺癌的发生发展至关重要,甚至对乳腺癌的耐药、复发、转移等有重要调控作用。随着对 14-3-3 $\zeta$  的深入研究,更多 14-3-3 $\zeta$  蛋白与肿瘤的关系不断被发现,有望成为新的肿瘤标志物,为乳腺癌临床诊疗提供新的依据。虽然目前对乳腺癌的耐药、复发、转移等方面还没有理想的解决方法,但 14-3-3 $\zeta$  的出现给了乳腺癌相关机制研究新的启示,我们相信随着对 14-3-3 $\zeta$  与乳腺癌相关机制的深入探索,未来不久在乳腺癌诊疗方面将会有大的突破。

## 参考文献

- [1] 韩雪娇,李艳春,孙立春,等. 14-3-3 $\zeta$ 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2017, 31(6):543-547.
- [2] 凌人,凌今,陈仲华,等. 14-3-3 zeta 蛋白过表达与他莫昔芬治疗乳腺癌耐药的关系[J]. 温州医科大学学报, 2017, 47(3):192-196.
- [3] Luo Z, Yang X, Ma LT, et al. 14-3-3zeta Positive Cells Show More Tumorigenic Characters in Human Glioblastoma [J]. Turk Neur osurgery, 2016,26(6):813-817.
- [4] Hong L, Chen W, Xing A, et al. Inhibition of Tyrosine 3-Monooxygenase / Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta (YWHAZ) Overcomes Drug Resistance and Tumorigenicity in Ovarian Cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49:53-64.
- [5] Matta A, Siu KW. 14-3-3 zeta as novel molecular target for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16:515-523.
- [6] Zhao GY, Ding JY, Lu CL, et al. The overexpression of 14-3-3 $\zeta$  and Hsp27 promotes non-small cell lung cancer progression[J]. Cancer, 2014, 120(5):652-663.
- [7] Shi J, Ye J, Fei H, et al. YWHAZ promotes ovarian cancer metastasis by modulating glycolysis [J]. Oncol Rep, 2019, 41:1101-1112.
- [8] 杨新萍,杨娜,张惊,等. 14-3-3 $\theta$ 蛋白在人骨肉瘤中的表达和临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(27):5221-5224.
- [9] Zhao JF, Zhao Q, Hu H, et al. The ASH1 - miR - 375 - YWHAZ Signaling Axis Regulates Tumor Properties in Hepatocellular Carcinoma[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 11:538-553.
- [10] Slinin Y, Greer N, Ishani A, et al. Timing of dialysis initiation, duration and frequency of hemodialysis sessions, and membrane flux: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline[J]. Am J Kidney Dis, 2015, 66:823-836.
- [11] Ayers D. Influence of microRNAs and Long Non - Coding RNAs in Cancer Chemoresistance[J]. Genes (Basel), 2017, 8:95.
- [12] Danes CG, Wyszomierski SL, Lu J, et al. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling[J]. Cancer Res, 2008,68:1760-1767.
- [13] Rehman SK, Li SH, Wyszomierski SL, et al. 14-3-3 $\zeta$  orchestrates mammary tumor onset and progression via miR-221-mediated cell proliferation [J]. Cancer Res, 2014, 74: 363-373.
- [14] Ten Dijke P. 14-3-3 $\zeta$  turns TGF- $\beta$  to the dark side [J]. Cancer Cell, 2015, 27:151-153.
- [15] Xu J, Acharya S, Sahin O, et al. 14-3-3 $\zeta$  turns TGF- $\beta$ 's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2[J]. Cancer Cell, 2015, 27:177-192.
- [16] Morrison CD. Tipping the balance between good and evil: aberrant 14-3-3 $\zeta$  expression drives oncogenic TGF- $\beta$  signaling in metastatic breast cancers [J]. Breast Cancer Res, 2015, 17:92.
- [17] Suen KM, Lin CC, Seiler C, et al. Phosphorylation of threonine residues on Shc promotes ligand binding and mediates crosstalk between MAPK and Akt pathways in breast cancer cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 94:89-97.
- [18] Allon M, Brouwer-Maier DJ, Abreo K, et al. Recommended Clinical Trial End Points for Dialysis Catheters [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13:495-500.
- [19] Bergamaschi A. Tamoxifen downregulation of miR - 451 increases 14-3-3 $\zeta$  and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance[J]. Oncogene, 2012, 31:39-47.
- [20] Liu ZR, Song Y, Wan LH, et al. Over-expression of miR-451a can enhance the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen by regulating 14-3-3 $\zeta$ , estrogen receptor  $\alpha$ , and autophagy[J]. Life Sci, 2016, 149:104-113.
- [21] Bergamaschi A, Christensen BL. Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3 $\zeta$ , FOXM1, and a gene signature associated with mitosis [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13:R70.
- [22] Thistle JE, Hellberg Y, Mortensen K, et al. The effect of 14-3-3 $\zeta$  expression on tamoxifen resistance and breast cancer recurrence: a Danish population-based study[J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 165:633-643.
- [23] 陈万青,郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, (13):668-674.
- [24] Bergamaschi A, Christensen BL. Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3 $\zeta$ , FOXM1, and a gene signature associated with mitosis [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13:R70.
- [25] Li Y, Zou L, Li Q, et al. Amplification of LAPTM4B and YWHAZ contributes to chemotherapy resistance and recurrence of breast cancer[J]. Nat Med, 2010, 16:214-218.
- [26] Bergamaschi A, Frasar J, Borgen K, et al. 14-3-3 $\zeta$  as a predictor of early time to recurrence and distant metastasis in hormone receptor - positive and - negative breast cancers [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137:689-696.
- [27] Lu J, Guo H, Treokitkarnmongkol W, et al. 14-3-3zeta Cooperates with ErbB2 to promote ductal carcinoma in situ progression to invasive breast cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Cell, 2009, 16:195-207.
- [28] Sun K, Deng HJ, Lei ST, et al. miRNA-338-3p suppresses cell growth of human colorectal carcinoma by targeting smoothened [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 2197 - 2207.
- [29] Boudreau A, Tanner K, Wang D, et al. 14-3-3 $\sigma$  stabilizes a complex of soluble actin and intermediate filament to enable breast tumor invasion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110:E3937-44.

# 儿童髓母细胞瘤分子分型与治疗进展

李秋<sup>1</sup> 王晓江<sup>1</sup> 朱剑栋<sup>1</sup> 张永<sup>2</sup> 谢明祥<sup>2\*</sup>

**[摘要]** 髓母细胞瘤(Medulloblastoma MB)是儿童最常见的恶性脑瘤,在所有儿童中枢神经系统肿瘤中约占20%。目前仍有约12.8%的MB患者死于该疾病,而生存下来的患者,也常遗留严重后遗症。最近的遗传学和表观遗传学发现:MB最少有4个分子亚群,其中一些组织学和遗传变异显著影响治疗方案和预后。针对MB这个发病率高、死亡率高的中枢肿瘤,本文将从MB的四个遗传(分子)群入手,综述MB治疗进展并对MB进行危险分层,以提升患者生存率和减少/减轻后遗症。

**[关键词]** 髓母细胞瘤;分子亚群;危险分层

## Molecular subgroups and treatment progress of pediatric medulloblastoma

LI Qiu<sup>1</sup>, WANG Xiaojiang<sup>1</sup>, ZHU Jiandong<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, XIE Mingxiang<sup>2\*</sup>

(1. Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou, Zunyi, Guizhou, China, 563003; 2. Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Neurosurgery, Zunyi Guizhou, Zunyi, Guizhou, China, 563003)

**[ABSTRACT]** Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor in children, about 20% of all children's central nervous system tumors. The current mortality rate is up to 12.8%, and those who survive often have serious sequelae. Recent genetics and epigenetics have found that MB has 4 molecular subgroups, some of which have histological and genetic variations that significantly affect treatment options and prognosis. In view of MB, a central tumor with high morbidity and high mortality, this review focuses on the progress of MB treatment and the risk stratify to improve patient survival and reduce sequelae.

**[KEY WORDS]** Medulloblastoma; Molecular subgroup; Risk stratification

髓母细胞瘤(Medulloblastoma MB)是儿童最常见的恶性脑瘤,在所有儿童中枢神经系统肿瘤中约占20%。其年发病率在0.2~0.58/100 000之间<sup>[1]</sup>。尽管积极治疗,约12.8%的MB患者死于该疾病<sup>[2]</sup>。即便生存下来,也常遗留严重后遗症,包括认知缺陷、内分泌失调和肿瘤复发等,并导致不能完全独立生存<sup>[3-5]</sup>。2016年世界卫生组织(WHO)出版的《中枢神经系统肿瘤分类》中提出<sup>[6]</sup>:MB的组织学变异具有临床应用价值,其中一些组织学和遗传变异显著影响治疗方案和预后。针对MB这个发病率高、死亡率高的中枢肿瘤,本文将从MB的四个遗传

(分子)群入手,综述MB治疗进展。

## 1 分子分型

根据组织学,MB被分为三种主要的疾病类型:经典型,结节/硬组织增生型(ND)和大细胞/间变型(LCA),其中ND被认为预后较好,而LCA型预后较差。随着基因表达谱、DNA甲基化和基因组分析的进展,MB的分类在组织学和分子分类方案的结合方面产生了很大的概念性进展。2016版WHO分类标准里MB有四个分子群,分别为:WNT群,SHH群,Group 3和Group 4。

基金项目:遵义市科技计划项目(遵市科核HZ字(2019)100号)

作者单位:1. 遵义医科大学 贵州,遵义 563003

2. 遵义医科大学附属医院神经外科 贵州,遵义 563003

\*通信作者:谢明祥, E-mail:864925019@qq.com

### 1.1 WNT 群

WNT 群是最少见的分子群, 约占所有 MB 的 10%<sup>[7]</sup>。男性和女性之间的发病率无统计学差异, 诊断时平均年龄 10 岁<sup>[8]</sup>。虽然易发生原发性肿瘤出血<sup>[9]</sup>, 但该亚群肿瘤通常位于大脑中线, 并且很少转移和浸润脑干<sup>[10]</sup>, 因而与其他分子群相比, 该亚组患者有较好的预后, 5 年生存率约 95%<sup>[11]</sup>。

Turcot 综合征描述了原发性脑肿瘤并发多发性大肠腺瘤的情况。随着家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 和遗传性非息肉病性结直肠癌 (HNPCC) 的遗传学被阐明, 越来越多的脑肿瘤与 FAP 相关。FAP 是由 APC 抑癌基因的灭活、种系突变引起的 APC 蛋白功能的丧失, 导致 WNT 途径效应分子  $\beta$ -catenin 的核积聚, 激活典型 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路中的靶基因, 从而导致肿瘤<sup>[12]</sup>。同理, WNT 群 MB 通常由 CTNBN1 基因第 3 外显子的激活突变引起 WNT 信号通路的激活, 从而导致  $\beta$  连环蛋白的核积聚, 从而导致 MB。研究表明与 APC 致病性变异相关的髓母细胞瘤亚型具有良好的预后<sup>[13]</sup>。该亚群中的另一个常见突变是 DDX3X 基因, 该基因编码一种可能的 RNA 螺旋酶, 调节染色体分离和细胞周期进程<sup>[14]</sup>。细胞遗传学上, 6 号染色体单体是该群中常见的结构改变。

研究表明 WNT 群至少包括两个亚型: WNT $\alpha$  (70%) 和 WNT $\beta$  (30%), 大多数 WNT $\alpha$  患者是儿童, 几乎所有这些患者都有单体 6 型改变; WNT $\beta$  患者主要是成年人, 没有单体 6 型<sup>[15]</sup>。

### 1.2 SHH 群

SHH 群约占 30% 的病例, 这类肿瘤患者的年龄呈双峰分布, 主要集中在 5 岁以下及 16 岁以上。男性预后较女性好, 可能与转录激活子 3 (STAT3) 有关<sup>[16]</sup>。SHH 群发现于小脑半球, 这是该亚型独有的位置<sup>[10, 17]</sup>。转移发生率不到 25%, 在 MB 中, 这些患者的预后是中等的, 5 年生存率约为 75%<sup>[11]</sup>。

SHH 群的特征在于 SHH 信号通路的异常激活, 该信号通路激活的关系首先在 Gorlin 综合征患者中被发现, 这些患者基底细胞癌的发病率很高, 易发生纤维增生性和结节性 MBs (MBENs)<sup>[18]</sup>。Gorlin 综合征主要是由 PTCH1 肿瘤抑制基因突变引起, 该基因编码 PCT1 (SHH 细胞表面受体)。SHH 与 PCT1 的结合激活了 G 蛋白偶联受体平滑化 (SMO), 从而从 SUFU 的胞质隔离中释放 GLI

转录因子。这导致 GLI 转录因子的核定位和靶基因的激活, 包括那些参与细胞增殖的基因 (如 MYCN、CCND1), 从而导致肿瘤<sup>[19]</sup>。因此通过抑制 SMO 等过程从而阻断 SHH 信号途径的靶向治疗具有了可行性。TP53 突变经常是与 Li-Fraumeni syndrome 综合征 (LFS) 相关的突变, 大约在 30% 的儿童 SHH-MBs 中可发现, 并且与极差的预后相关<sup>[20]</sup>。GPR161 种系突变也与儿童 SHH-MBs 相关<sup>[21]</sup>。较为特别的发现是 U1 snRNA 突变发生在 5' 剪接位点结合区, 而非蛋白编码区, 突变型 U1 snRNA 介导的选择性剪接使肿瘤抑制基因 (PTCH1) 失活, 并激活癌基因 (GLI2 和 CCND2), 这种突变只存在 SHH 型 MB 中, 并主要集中在 97% 的成人 (SHH $\delta$  亚型) 和 25% 的青少年 (SHH $\alpha$  亚型)<sup>[22-23]</sup>。细胞遗传学研究主要发现该型 MB 存在包括染色体 3q 的增加与 9q、10q 和 14q 的丢失。进一步将 SHH 群 MB 分为四个亚型: SHH $\alpha$  亚型富含 TP53 突变、MYCN 和 GLI2 扩增, 且预后极差。SHH $\beta$  亚型主要见于婴儿, 在诊断时常已发生转移, 并导致预后不良。SHH $\gamma$  亚型也主要见于婴儿, 但基因组相对稳定, 预后较好, 多数 MBENs 属于 SHH $\gamma$  亚型, SHH $\delta$  亚型主要存在于成人中, 常含有 TERT 启动子突变<sup>[15]</sup>。

### 1.3 Group 3

Group 3 约占 MB 的 25%<sup>[7]</sup>, 该亚组预后最差, 5 年生存率约为 50%<sup>[11]</sup>。Group 3 主要影响婴幼儿, 男性的发病率是女性的两倍。肿瘤多位于中线/第四脑室<sup>[17]</sup>。大约 40%~45% 的患者在诊断时已经有转移性疾病<sup>[24]</sup>。

当前对 Group 3 的分子基础报道较少。MYC 原癌基因的扩增几乎是这个亚型独有的, 但也只能在 17% 的 Group 3 中可以见到<sup>[25]</sup>。研究发现该组有广泛的染色体改变, 表明基因组高度不稳定。由于 DNA 的结构变化, 通过增强子劫持聚集在一起, 特异性激活原癌基因 GFII 和 GFIIIB。并且 Kelch 重复序列和含蛋白 4 (KBTBD4) 基因的 BTB 结构域中的重复帧内插入也可能相关<sup>[26]</sup>。细胞遗传学方面, 最常见的是等臂染色体 17q(i17q), 约 40% 的患者存在 i17q, 且与不良预后相关<sup>[27]</sup>。

Group 3 群 MB 可能有三种不同的亚型: Group 3 $\alpha$  常见于婴儿, 并且常常诊断时已经转移; Group 3 $\beta$  组可发现 GFII 家族癌基因的高频激活和 OTX2 扩增; Group 3 $\gamma$  常发生转移, 并且经常表

现出 MYC 扩增,它的预后最差<sup>[15]</sup>。

#### 1.4 Group 4

Group 4 群 MB 是最常见的亚组,占病例的近 35%<sup>[7]</sup>,预后中等,5 年生存率约为 75%<sup>[11]</sup>。没有好发年龄段,男性的发病率是女性的三倍。Group 4 群肿瘤位于中线/第四脑室,可能与起源于上菱形层的表皮中胚层 (EOMES) 和 LIM 同源框转录因子 1 $\alpha$  (LMX1A) 相关<sup>[28]</sup>,近 35%~40% 的患者在诊断时已经转移<sup>[24]</sup>。

Group 4 中的常见改变包括组蛋白赖氨酸脱甲基酶基因 KDM6A 的失活突变、编码同核蛋白- $\alpha$  相互作用蛋白 (SNCAIP) 基因的串联复制、MYCN 和 CDK6 基因的扩增。Northcott 发现 PRDM6 是第 4 组中受增强子劫持影响最高的基因,并且 PRDM6 位于 SNCAIP 下游 600 kb 处,其在 SNCAIP 复制的 Group 4 肿瘤中的表达显著升高<sup>[26]</sup>。通过蛋白质组学和磷酸蛋白质组学分析确定了反常 ERBB4-SRC 信号是 Group 4 的标志<sup>[29]</sup>。细胞遗传学上常见的是等臂染色体 17q。另外,Group 4 群 MB 也存在亚型,Group 4 $\alpha$  和 Group 4 $\gamma$  存在 CDK6 局灶性扩增、8p 染色体丢失以及 7q 染色体增加,Group 4 $\beta$  富含 SNCAIP 重复和 PRDM6 过度表达<sup>[30]</sup>。

## 2 治疗进展

当前公认的 MB 治疗是手术以及术后放化疗的综合治疗方案,但治疗效果仍不容乐观。至少约 12.8% 的 MB 患者直接死于该疾病,而生存下来的患者,也常遗留严重后遗症,包括认知缺陷、内分泌失调和肿瘤复发等。因此当前治疗研究方向主要是提升生存率和减少/减轻并发症。

### 2.1 危险分层

当前临床危险分层将 3 岁以上的患者分为标准风险;而存在残余肿瘤细胞被列为高风险,包括转移、脑脊液肿瘤细胞阳性或局部残余疾病超过 1.5 cm<sup>2</sup>。随着分子研究的进展,在先前的分层基础上又有了新的进展。根据目前的生存率将 MB 分为 4 个危险组:低风险 (>90% 生存率)、平均 (标准) 风险 (75%~90% 生存率)、高风险 (50%~75% 生存率) 和非常高风险 (<50% 生存率) 组。低风险组主要包括:WNT 群和非转移性 Group 4 肿瘤 (11 号染色体全失或 17 号染色体全增);平均风险组包括:无转移 Group 3 群及 Group 4 群 MB、不伴 MYC 扩增的 Group 3 群;高危层主要包括:转移性 SHH、

伴 MYCN 扩增的 SHH 以及转移性 Group 4 群 MB; 很高危组包括转移性 Group 3 群或伴有 TP53 突变的 SHH<sup>[31]</sup>。新近的危险分层包含了分子研究的进展,为 MB 患者术后辅助治疗提供了参考,为避免或减少放疗、化疗副作用起到了很好的效果。

### 2.2 手术治疗

既往认为肿瘤全切除 (GTR) 是 MB 治疗的基础,当前对肿瘤切除范围研究有了新的进展。Thompson 研究指出,与近全切除 (NTR) 相比,GTR 对无进展生存率或总生存率无明显益处。当然对于 Group 4 群 MB,NTR 能提升无进展生存率,但对总生存率无明显提升<sup>[32]</sup>。因此考虑到 GTR 可能会损害正常组织,一味追求 GTR 已不适合当前标准,必须充分考虑收益与成本,保护正常组织,改善术后并发症成为了潮流。

### 2.3 放射治疗

不管切除的程度如何,术后几乎总会残留肿瘤细胞继续生长和扩散,最终导致肿瘤复发。MB 对放化疗非常敏感,既往术后予以全脑全脊髓放疗是儿童 MB 术后的首选方案。但由于严重副作用,结合新近的危险分层,当前的研究讨论热点主要是如何在保证疗效的情况下减少放射量,从而减少放疗并发症。代表性研究如下:经过标准疗法后,低危组患者的生存率接近 100%,为减少放疗副作用,将新诊断的 WNT 群 MB 患者的颅脊髓放射治疗剂量由 24 Gy 减少至 18Gy;有研究予以适形调强放射及调容弧光治疗从而减少副作用<sup>[33]</sup>。传统放疗是运用光子放射治疗 (XRT),有研究报告质子放射治疗 (PRT) 与 XRT 相比,减少了对正常组织的剂量,从而在放疗后智力保留方面更具有优势<sup>[34-35]</sup>。

### 2.4 化疗

化疗也是 MB 重要的治疗方案之一,尤其是对于 3 岁以下的患儿,化疗几乎是术后唯一的有效治疗。当前化疗药物及方案很多,例如长春新碱、铂类以及环磷酰胺等,新近研究主要从提高疗效并降低毒性、耐药性入手。

从分子研究中我们发现 SHH 与 PCT1 的结合激活了 G 蛋白偶联受体平滑化 (SMO) 是 SHH 群 MB 的始发因素。并且其它研究表明持续、低水平的 SMO 激活对于 SHH 群肿瘤细胞增殖和组织侵袭是必要的<sup>[36]</sup>。因此 SMO 抑制剂被认为能够阻断该进程的发展。例如 Robinson 研究表明 Vismo-

degib(一种 SMO 抑制剂)对复发性 SHH 群 MB 有抑制作用<sup>[37]</sup>。和化疗药物一样,长期使用这类药物会存在耐药,机制较复杂。有研究表明,当使用 SMO 抑制剂 sonidegib 后,MB 细胞的纤毛发生基因的反突变导致纤毛丢失,并导致耐药性<sup>[38-39]</sup>。又例如磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)途径的激活,使肿瘤细胞以独立于 SHH 信号的方式生长。因此使用 SMO 抑制剂和 PI3K 抑制剂联合治疗可以延缓单用 SMO 抑制剂出现的耐药性<sup>[40]</sup>。

### 2.5 自体干细胞移植治疗以及贝伐单抗

对于 3 岁以下患儿来说,一般认为放疗弊大于利。现有研究表明大剂量化疗(HDC)联合自体干细胞移植(ASCR)可以作为一种避免放疗的治疗策略,已在新诊断和复发的 MB 患者中得到应用<sup>[41]</sup>。使用自体干细胞有效性和安全性已得到验证<sup>[42]</sup>,当前 ASCR 联合 HDC 也作为复发和进展 MBs 的放疗补救治疗方案。贝伐单抗是一种重组人源化抗血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体,通过抑制 VEGF 诱导的血管形成,使肿瘤稳定或抑制肿瘤生长。贝伐单抗也运用于 MB 治疗中,尤其是转移性和复发性 MB 治疗,贝伐单抗具有较好疗效的同时,不伴随明显副作用<sup>[43]</sup>。

## 3 结语

MB 是儿童最常见的恶性脑瘤,目前治疗效果仍然不容乐观。随着基因表达谱、DNA 甲基化和基因组分析的研究进展,确定了 MB 的 4 个分子亚群。根据这些组织学和遗传变异对 MB 患者进行危险因素分层,显著影响了治疗方案和预后。有理由相信,随着基因组分析的进展,人类攻克 MB 的那一天不会太久远!

### 参考文献

[1] Johnson Kimberly J, Cullen Jennifer, Barnholtz-Sloan Jill S et al. Childhood brain tumor epidemiology: a brain tumor epidemiology consortium review[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23: 2716-2736.

[2] Salloum Ralph, Chen Yan, Yasui Yutaka et al. Late Morbidity and Mortality Among Medulloblastoma Survivors Diagnosed Across Three Decades: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 731-740.

[3] Gibson Todd M, Mostoufi-Moab Sogol, Stratton Kayla L, et al. Temporal patterns in the risk of chronic health conditions in survivors of childhood cancer diagnosed 1970-99: a report

from the Childhood Cancer Survivor Study cohort[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19: 1590-1601.

[4] Vatner Ralph E, Niemierko Andrzej, Misra Madhusmita, et al. Endocrine Deficiency As a Function of Radiation Dose to the Hypothalamus and Pituitary in Pediatric and Young Adult Patients With Brain Tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 2854-2862.

[5] Brinkman Tara M, Ness Kirsten K, Li Zhenghong, et al. Attainment of Functional and Social Independence in Adult Survivors of Pediatric CNS Tumors: A Report From the St Jude Lifetime Cohort Study [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 2762-2769.

[6] Louis David N, Perry Arie, Reifenberger Guido, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 803-20.

[7] Louis David N, Perry Arie, Reifenberger Guido, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 803-820.

[8] Northcott Paul A, Shih David J H, Peacock John, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes[J]. *Nature*, 2012, 488: 49-56.

[9] Reisinger Dominik, Gojo Johannes, Kasprian Gregor, et al. Predisposition of Wingless Subgroup Medulloblastoma for Primary Tumor Hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 2019, 2020: 478-484.

[10] Gibson Paul, Tong Yiai, Robinson Giles, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins [J]. *Nature*, 2010, 468: 1095-1099.

[11] Northcott Paul A, Jones David T W, Kool Marcel, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, 12: 818-834.

[12] Anastas Jamie N, Moon Randall T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 11-26.

[13] Surun Aureore, Varlet Pascale, Brugières Laurence, et al. Medulloblastomas associated with APC germline pathogenic variant share the good prognosis of CTNNB1 mutated medulloblastomas [J]. *Neuro-oncology*, 2020: 128-138.

[14] Jones David T W, Jäger Natalie, Kool Marcel et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma [J]. *Nature*, 2012, 488: 100-105.

[15] Cavalli Florence M G, Remke Marc, Rampasek Ladislav et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 737-754.e6.

[16] White Christine L, Jayasekara W Samantha N, Picard Daniel, et al. A Sexually Dimorphic Role for STAT3 in Sonic Hedgehog Medulloblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019 NOV 1; 11(11). pii:E1702.doi:10.33901/cancer 11111702.

[17] Perreault S, Ramaswamy V, Achrol A S et al. MRI surro-

- gates for molecular subgroups of medulloblastoma [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2014, 35: 1263-1269.
- [18] Garrè Maria Luisa, Cama Armando, Bagnasco Francesca, et al. Medulloblastoma variants: age-dependent occurrence and relation to Gorlin syndrome—a new clinical perspective [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 2463-2471.
- [19] Deshpande Ishan, Liang Jiahao, Hedeem Danielle, et al. Smoothed stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity [J]. *Nature*, 2019, 571: 284-288.
- [20] Orr Brent A, Clay Michael R, Pinto Emilia M, et al. An update on the central nervous system manifestations of Li-Fraumeni syndrome [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 139(14): 689-701.
- [21] Begemann Matthias, Waszak Sebastian M, Robinson Giles W, et al. GPR161 Germline Mutations Predispose to Pediatric Medulloblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(1): 43-50.
- [22] Suzuki Hiromichi, Kumar Sachin A, Shuai Shimin, et al. Recurrent noncoding U1 snRNA mutations drive cryptic splicing in SHH medulloblastoma [J]. *Nature*, 2019, 574: 707-711.
- [23] Spliceosomal - RNA Mutations May Drive Medulloblastoma and Other Cancers [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9: 1644.
- [24] Kool Marcel, Korshunov Andrey, Remke Marc, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 123: 473-484.
- [25] Rickman David S, Schulte Johannes H, Eilers Martin, The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8: 150-163.
- [26] Northcott Paul A, Buchhalter Ivo, Morrissy A Sorana, et al. The whole - genome landscape of medulloblastoma subtypes [J]. *Nature*, 2017, 547: 311-317.
- [27] Shih David J H, Northcott Paul A, Remke Marc, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32: 886-896.
- [28] Lin Charles Y, Erkek Serap, Tong Yiai, et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins [J]. *Nature*, 2016, 530: 57-62.
- [29] Forget Antoine, Martignetti Loredana, Puget Stéphanie, et al. Aberrant ERBB4-SRC Signaling as a Hallmark of Group 4 Medulloblastoma Revealed by Integrative Phosphoproteomic Profiling [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34: 379-395.e7.
- [30] Cavalli Florence M G, Remke Marc, Rampasek Ladislav, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 737-754.e6.
- [31] Ramaswamy Vijay, Remke Marc, Bouffet Eric, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 821-831.
- [32] Thompson Eric M, Hielscher Thomas, Bouffet Eric, et al. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17: 484-495.
- [33] Al-Wassia Rolina K, Ghassal Noor M, Naga Adly, et al. Optimization of Craniospinal Irradiation for Pediatric Medulloblastoma Using VMAT and IMRT [J]. *J Pediatr Hematol. Oncol*, 2015, 37: e405-11.
- [34] Kahalley Lisa S, Peterson Rachel, Ris M Douglas, et al. Superior Intellectual Outcomes After Proton Radiotherapy Compared With Photon Radiotherapy for Pediatric Medulloblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(5): 454-461.
- [35] Das Manjulika, Intelligence outcomes after proton versus photon therapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 38(5): 454-461.
- [36] Neve Anuja, Migliavacca Jessica, Capdeville Charles, et al. Crosstalk between SHH and FGFR Signaling Pathways Controls Tissue Invasion in Medulloblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11: pii:E1985.doi:10.3391cancers11121985.
- [37] Robinson Giles W, Orr Brent A, Wu Gang, et al. Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032 [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 2646-2654.
- [38] Goranci -Buzhala Gladiola, Gabriel Elke, Mariappan Aruljothi, et al. Losers of Primary Cilia Gain the Benefit of Survival [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7: 1374-1375.
- [39] Zhao Xuesong, Pak Ekaterina, Ornell Kimberly J, et al. A Transposon Screen Identifies Loss of Primary Cilia as a Mechanism of Resistance to SMO Inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7: 1436-1449.
- [40] Eckerdt Frank, Clymer Jessica, Bell Jonathan B, et al. Pharmacological mTOR targeting enhances the antineoplastic effects of selective PI3K $\alpha$  inhibition in medulloblastoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 12822.
- [41] Altshuler C, Haley K, Dhall G, et al. Decreased morbidity and mortality of autologous hematopoietic transplants for children with malignant central nervous system tumors: the 'Head Start' trials, 1991-2009 [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2016, 51: 945-948.
- [42] Koo Jane, Silverman Stacy, Nuechterlein Brandon, et al. Safety and feasibility of outpatient autologous stem cell transplantation in pediatric patients with primary central nervous system tumors [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54: 1605-1613.
- [43] Bonney Phillip A, Santucci Joshua A, Maurer Adrian J, et al. Dramatic response to temozolomide, irinotecan, and bevacizumab for recurrent medulloblastoma with widespread osseous metastases [J]. *J Clin Neurosci*, 2016, 26: 161-163.

## 桂林医学院检验科

桂林医学院检验科位于山水甲天下的国际旅游名城-桂林市,是一个集临床检验、教学、科研为一体的综合性临床实验室,在临床检验方面素来享有盛名。目前拥有一批世界上最先进的检验仪器设备和一支由博士、硕士及本科生为主组成的经验丰富的高素质专业技术人员队伍,是广西地区多家大学医学检验专业学生的实习基地。本科室以高学术水平、精湛的技术、准确的结果、一流的仪器设备、良好的服务著称,为临床正确诊断、治疗、判断预后以及科学研究、检验医学人才培养、教学等提供了大量、及时而准确的实验数据。

检验科一直把检验质量作为立科之本,坚持以人才建设促进学科发展,进一步加强落实临床检验医疗质量管理与持续改进,促进科室又快又好健康发展。检验科现有临床生化实验室、临床免疫实验室、临床微生物实验室、临床分子诊断实验室、门急诊实验室等多个专业实验室。本学科现有58名专业技术人员队伍,其中教授5名,副教授13人,具有博士学位9名,硕士学位16人。是一个高职称、高学历、年青化、结构合理、团结合作,创新能力突出的研究团队。

检验科拥有大量自动化仪器,固定资产4000多万元,硬件门类齐全,已达到国内先进水平,主要设备有全自动生化免疫流水线、全自动Sysmex血液体液流水线、全自动BD流式细胞仪、Sysmex 5100全自动血凝仪、Sysmex UF-1000i全自动尿沉渣分析仪、法国梅里埃MALDI-TOF质谱仪、法国梅里埃BacT/ALERT 3D型血培养仪、罗式荧光定量PCR仪等。除完成一般临床检验项目外,不断增加新技术、新项目,充分满足临床疾病诊断的需要。始终贯彻以病人为中心,以质量为核心的原则,服务意识不断增强。检验科有完善和有效的质量管理体系,重视实验室的质量和安全管理。除开展实验室室内质量控制外,还参加国家卫计委临检中心、广西省临检中心组织的室间质量控制评价活动,并获得优异成绩。

检验科为广西桂北地区检验医学领域技术力量最雄厚、设备最先进、检验项目最齐全的科室。现有优秀学科带头人1名;学术带头人2名,技术骨干3名。我科的专业技术人员即为桂林医学院检验学院的师资队伍,每年承担医学检验学院检验技术及卫检本科生全部临床检验的教学任务,并负责各级进修生和实习人员的带教工作。科室科研气氛浓厚,科研能力较强,近五年来主持国家自然科学基金项目6项,广西科技厅重点项目2项,广西自然科学基金项目7项,厅局级项目多项,全科以第一作者或通讯作者发表的专业学术论文100多篇,其中SCI收录50多篇,主编及参编本科、专科教材多部。



目前,检验科正致力于实验室全面质量管理和控制工作,以ISO 15189文件为准则,不断提高医学检验诊断水平,力争将科室建成国内一流标准化实验室。科室本着以人为本的原则追求“求实、求真、创新和进取”,以“客观公正,准确优质,科学管理,持续改进”十六字为质量方针,致力于满足患者和临床医护部门的需要,竭诚为社会、临床、科研、教学提供最优质的服务。

## 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。

