



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

分子诊断与治疗杂志

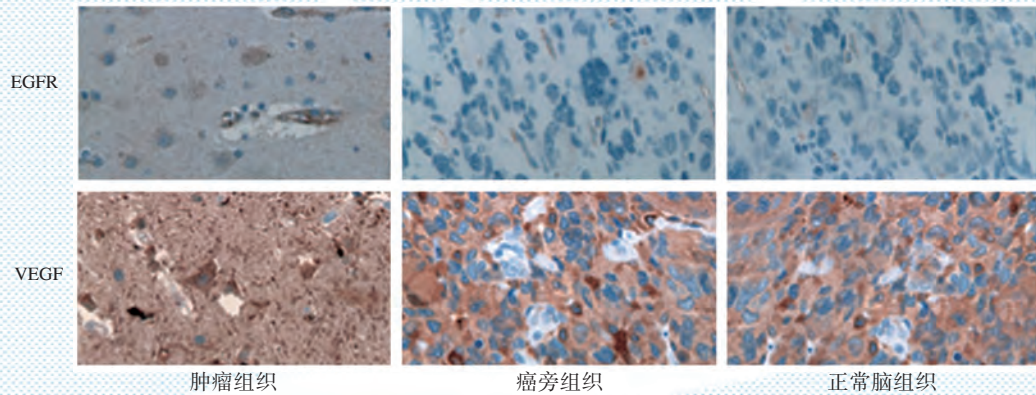
FENZI ZHENDUAN YU ZHILIAO ZAZHI

2020年8月 第12卷 第8期 总第72期

JOURNAL OF

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Volume 12 Number 8 August 2020



图(P1088) EGFR、VEGF蛋白在组织中的表达(HE, ×200)

Figure(P1088) Expression of EGFR and VEGF proteins in tissues (HE, ×200)

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



刘红星



刘红星,《分子诊断与治疗杂志》第五届编委会委员。本科毕业于滨州医学院临床医学专业,硕士毕业于北京大学工学院生物医学工程专业。于2006年加入陆道培医学团队工作至今,从事临床医师工作3年,血液病实验诊断及相关研

究工作17年。现任北京陆道培血液病研究院副院长、北京陆道培医院及河北燕达陆道培医院病理和检验医学科主任,带领发展了有210多名全职员工、专注于血液病实验诊断和相关研究工作的实验医学团队。

指导建设血液病基因组分析团队、较早推进高通量基因测序技术、基因突变组和全面基因组学分析中血液病中的研究和临床应用,探索第三代基因测序技术和光学图谱技术在血液病分子诊断中的创新应用。主持开展急性白血病1K转录组、深度全外显子组、代谢组和免疫组库等多组学研究项目。指导建设急性白血病基因变异图谱/知识库,包括融合基因图谱、基因表达图谱、基因剪接变异图谱、免疫组库指纹图谱等。

结合临床实践提出“融合基因家族(fusion gene family)”、“个体化用药指纹图(personalized medication fingerprints)”、“靶向鸡尾酒疗法(targeted cocktail therapy)”、“突变组(mutaome)”、“遗传致病的冰山模型”等分子诊断新概念。以第一/通讯作者于Nature Medicine、Cancer、British Journal of Cancer、British Journal of Haematology等国内外学术期刊发表论文90余篇,参与编写血液病实验诊断相关国内专家共识3篇、专业书籍3本,申请发明专利6项。所指导的工作于美国血液学会年会(ASH)、美国人类遗传学会年会(ASHG)、日本血液学会年会(JSH)等国际学术会议报告70余人次。

现为《分子诊断与治疗杂志》编委、《白血病·淋巴瘤》通讯编委、International Journal of Medical Reviews编委;《中华医学杂志》、《国际检验医学杂志》、The American Journal of Clinical Pathology、EBio-Medicine、Cancer Gene Therapy、Journal of Cancer等多个中英文学术期刊的审稿专家;中国医药卫生文化协会实验诊断与社会化服务专委会委员、中国抗癌协会肿瘤临床检验与伴随诊断专业委员会委员、中国中西医结合学会检验医学专委会血液系统疾病实验诊断学组副主任委员、中国研究型医院学会分子诊断医学专委会临床分子检验学组委员、中国医学装备人工智能联盟病理委员会委员、北京非公立医疗机构协会检验医学专委会副主任委员、北京医学检验学会常务理事、北京免疫学会理事等16个学术委员会委员等;美国临床肿瘤学会(ASCO)、美国血液学会(ASH)、美国人类遗传学会(ASHG)会员。

分子诊断与治疗杂志

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

月刊 2020年8月 第12卷 第8期 总第72期 Bimonthly Volume 12 Number 8 August 2020

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

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

地址 广州市天河区天河北路179号祥龙大厦11楼(510620)
电话 (020) 32290789-206, 32290789-201
电子邮箱 jmdt@vip.163.com
刊号 ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
邮发代号 46-283
发行单位 广东省报刊发行局
发行范围 国内外公开发售
广告发布登记通知书 440100190057
印刷 天意有福科技股份有限公司
出版日期 2020年8月18日
定价 RMB 15.00元

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

Add 11 Fl., Xianglong Building, 179# Tian he bei Lu, Guangzhou, China 510620
Tel (020) 32290789-206, 32290789-201
E-mail jmdt@vip.163.com
CSSN ISSN 1674-6929
CN 44-1656/R
Printing TianYi Yofus Technology Co., Ltd.
Publish Date 2020.8.18
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8月 第12卷 第8期

目次

述评

髓系肿瘤胚系易患因素研究进展 聂代静 王芳 周晓苏 等(987)

论著

胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准的制定
..... 张文新 于婷 孙楠 等(991)

采用二代测序对Marfan综合征家系进行植入前遗传学诊断 何天文 卢建 陈创奇 等(995)

胃癌根治术预后相关因素的研究 李立新 蔡翠芳 李文祥 等(1001)

E6流式细胞仪检测CD34⁺细胞百分比和绝对计数方法的建立
..... 付笑迎 张小玲 刘梦桐 等(1005)

急性淋巴细胞白血病患者血清TK1及E-cadherin蛋白表达水平及意义
..... 邢东文 张余转 林坚 等(1010)

非小细胞肺癌患者癌组织及血清中circRNA的表达水平及临床意义
..... 杨桃权 张千仕 范习刚 等(1014)

CK-MB、cTnI、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死价值研究 常琳 常佩云 刘娟(1018)

miR-126、miR-96与急性心肌梗死患者血小板活化及近期预后相关性
..... 刘汉毅 杜小杰 王金墙 等(1022)

RDW对高血压并发房颤的诊断预测 裘存新 胡剑平 余林 等(1026)

颈动脉粥样硬化患者中血清Lp-PLA₂、CD147的表达及意义 谭红 朱红霞 张可帅(1030)

hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1与缺血性脑血管病病情及预后关系 李占增 任英巧 伍淑玲 等(1034)

前白蛋白和降钙素原在新生儿高胆红素血症中的表达及与心肌酶谱的相关性
..... 汪灵芝 贾文婷 张苗苗(1039)

孕妇血清抑制素A联合胎盘生长因子在孕早期唐氏综合征产前筛查中的预测价值
..... 黄雪珍 陈倩岚 蔡锦梅 等(1044)

鼻咽癌组织中SATB1表达与化疗耐药及预后的关系分析 杨和强 刘文峰 胡玥(1047)

脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平对早产儿支气管肺发育不良的预测价值
..... 林晴晴 谭卉晗 吴永芳 等(1052)

轴突生长抑制因子A、核因子-kB p65对急性高血压脑出血患者病情及预后的评估
..... 尹艳霞 尚文俊 郭华 等(1056)

CCL18、MIF mRNA、HIF-1 α 在人脑胶质瘤中的表达及预后评估价值	吕超 孙慧渊 闫俊飞(1060)
CRP、PCT 联合肺部感染评分在 ICU 肺部感染诊断及预后中的应用价值	黄杨 张磊 郭伟(1064)
肺炎支原体感染合并川崎病患儿血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平与冠状动脉损伤的相关性	郭璇 宋瑶 阿布来提·阿不都哈尔(1069)
血清 PAPP _A 、free β -hCG 及 PLGF 联合检测在孕早期唐氏综合征筛查诊断中的应用价值	贾广珠 王恒会 王丽 等(1073)
Th1/Th2 及相关细胞因子 IFN- γ 、IL-10 在无痛分娩中的变化及意义	张海艳 王占晖 刘钦文(1077)
血浆 CD64、PCT 及 hs-CRP 水平在急性白血病化疗后合并细菌感染预后的评估	李萨萨 杨友卫 武琳琳 等(1082)
星形细胞肿瘤组织 EGFR、VEGF 表达及其与病理分级的相关性研究	张弛 袁健 彭刚 等(1086)
食管癌组织中 PD-L1、Vim、Zeb1 的表达与放疗敏感性的关系分析	付江萍 蓝柳 胡芳 等(1090)
硫酸特布他林联合布地奈德雾化对支气管肺炎患儿临床治疗效果分析	韩梅 宋华 张伟 等(1095)
重症 MPP 患儿 D-D、CRP、PAF 及血小板参数测定的临床意义	赵娜 郑华月 乔瑞君(1099)
miR-182-5p 通过 <i>HOXB7</i> 基因调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭迁移	肖飞 辛士永 邵长帅 等(1103)
血清 CYR61、IGF-1 水平对胫骨平台骨折术后愈合延迟的预测价值	郑海亮 刘晶(1108)
婴儿型炎症性肠病 1 例并文献分析	杨志 王玲 孙子发 等(1112)
呼出气一氧化氮与支气管哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞相关性及其联合检测价值	江银玲 杨万春 沈欣(1115)
急性脑梗死合并医院获得性肺炎患者的病原菌分布变迁情况及耐药性分析	田敬华 杨品娜 高翔 等(1119)
关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 对人工股骨头置换术后感染的诊断价值及与术后康复的关系	徐兵 汪华清 黄强开 等(1124)

综 述

宫颈病变流行病学分析及宫颈冷冻治疗新进展	曹欢 刘冰 王晓丹(1129)
----------------------------	-----------------

专家风采

刘红星	(封二)
-----------	------

实验室巡礼

陆道培分子医学团队及实验室介绍	(封三)
-----------------------	------

JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Monthly Volume 12 Number 8 August 2020

CONTENTS

COMMENTS

Research advances of germline predisposition factors of myeloid neoplasms

NIE Daijing, WANG Fang, ZHOU Xiaosu, LIU Ming, LI Mianyang, LIU Hongxing (987)

ORIGINAL ARTICLES

Establishment of industry standards for fetal chromosome aneuploidy including trisomy 21, trisomy 18 and trisomy 13 (Next-Generation Sequencing)

ZHANG Wenxin, YU Ting, SUN Nan, CHEN Yangyi, GAO Fei, HUANG Jie, QU Shoufang (991)

Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using next-generation sequencing

HE Tianwen, LU Jian, CHEN Chuangqi, LIU Dun, DING Hongke, DONG Yunqiao, DU Li, YIN Aihua (995)

The value of T-cadherin expression in predicting the prognosis of gastric cancer after radical operation

LI Lixin, CAI Cui Fang, LI Wenxiang, SHI Lei, PU Jing (1001)

Establishment the protocol of CD34⁺ cell percentage and absolute counting by E6 flow cytometer

FU Xiaoying, ZHANG Xiaoling, LIU Mengtong, YU Yue, CHEN Shiyang, PENG Dong, KUANG Yaxian, LIU Sixi, CHEN Yunsheng (1005)

Expression and significance of serum TK1 and E-cadherin in children with acute lymphoblastic leukemia

XING Dongwen, ZHANG Yuzhuan, LIN Jian, LIN Lufei (1010)

Expression level and clinical significance of circRNA in cancer tissues and serum of patients with non-small cell lung cancer

YANG Guangquan, ZHANG Qianshi, FAN Xigang, WU Fei (1014)

Study on the value of combined diagnosis of acute myocardial infarction by CK-MB, cTnI, coronary angiography and electrocardiogram

CHANG Lin, CHANG Peiyun, LIU Juan (1018)

Correlation of miR-126 and miR-96 with platelet activation and short-term prognosis in patients with acute myocardial infarction

LIU Hanyi, DU Xiaojie, WANG Jinqiang, FENG Guiwen (1022)

Study on the diagnosis and prediction of hypertension with atrial fibrillation by RDW

QIU Cunxin, HU Jianping, YU Lin, ZHOU Enping (1026)

The expression and significance of serum Lp-PLA2 and CD147 in patients with carotid atherosclerosis

TAN Hong, ZHU Hongxia, ZHANG Keshuai (1030)

Relationship between hs-CRP, NF- κ B, VCAM-1 and the condition and prognosis of ischemic cerebrovascular disease

LI Zhanzeng, REN Yingqiao, WU Shuling, LU Yanhui, GUO Jia (1034)

Expression of prealbumin and procalcitonin in neonatal hyperbilirubinemia and its correlation with myocardial enzyme spectrum

WANG Lingzhi, JIA Wenting, ZHANG Miaomiao (1039)

Application of serum inhibin A combined with placental growth factor in prenatal screening of Down's syndrome in early pregnancy

HUANG Xuezheng, CHEN Qianlan, CAI Jinmei, SUN Lili (1044)

Analysis of the relationship between SATB1 expression and chemotherapy resistance and prognosis in nasopharyngeal carcinoma

YANG Heqiang, LIU Wenfeng, HU Yue (1047)

Predictive value of TGF- β 1 and Treg cell count in umbilical cord blood for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants	
<i>LIN Qingqing, TAN Huihan, WU Yongfang, ZHU Wei, HUANG Ying</i>	(1052)
Evaluation value of axon growth inhibitory factor A and nuclear factor-kB p65 on the condition and prognosis of patients with acute hypertensive cerebral hemorrhage	
<i>YIN Yanxia, SHANG Wenjun, GUO Hua, GAO Zhen, SUN Xue</i>	(1056)
Expression of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in human gliomas and the value of prognostic assessment	
<i>LV Chao, SUN Huiyuan, YAN Junfei</i>	(1060)
The application value of CRP and PCT combined with pulmonary infection score in the diagnosis and prognosis of pulmonary infection in ICU	
<i>HUANG Yang, ZHANG Lei, GUO Wei</i>	(1064)
Correlation between serum levels of IL-6, IL-8 and IL-10 and coronary artery lesions in children with Mycoplasma pneumoniae infection and Kawasaki disease	
<i>GUO Xuan, SONG Yao, Abreti Abuduhar</i>	(1069)
Application value of combined detection of serum PAPP _A , free β -hCG, and PLGF in the diagnosis of Down Syndrome in early pregnancy	
<i>JIA Guangzhu, WANG Henghui, WANG Li, YE Yuanhua</i>	(1073)
Changes of Th1/Th2 and related cytokines IFN - γ , IL-10 in painless birth and its significance	
<i>ZHANG Haiyan, WANG Zhanhui, LIU Qinwen</i>	(1077)
Evaluation of plasma CD64, PCT and hs-CRP levels after acute leukemia chemotherapy combined with bacterial infection prognosis	
<i>LI Sasa, YANG Youwei, WU Linlin, XU Li</i>	(1082)
Expression of EGFR and VEGF in astrocyte tumor tissues and their correlation with pathological grade	
<i>ZHANG Chi, YUAN Jian, PENG Gang, XIE Yuanyang, SU Jun, LIU Qing, YUAN Xianrui, LI Haoyu</i>	(1086)
The relationship between expressions of PD-L1, Vim and Zeb1 in esophageal carcinoma tissues and radiotherapy sensitivity	
<i>FU Jiangping, LAN Liu, HU Fang, FANG Xiangdong, GAO Youshu, MO Yuzhen</i>	(1090)
Analysis of the clinical therapeutic effect of terbutaline sulfate combined with budesonide atomization on children with bronchial pneumonia	
<i>HAN Mei, SONG Hua, ZHANG Wei, WANG Pingle</i>	(1095)
The clinical significance of D-D, CRP, PAF and platelet parameters in children with severe MPP	
<i>ZHAO Na, ZHENG Huayue, QIAO Ruijun</i>	(1099)
miR-182-5p regulates the proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells through the <i>HOXB7</i> gene	
<i>XIAO Fei, XIN Shiyong, SHAO Changshuai, ZHANG Jianguo, GAO Zhongwei</i>	(1103)
Predictive value of serum CYR61 and IGF-1 levels for healing delay after tibial plateau fracture surgery	
<i>ZHENG Hailiang, LIU Jing</i>	(1108)
A case of infantile inflammatory bowel disease and literature analysis	
<i>YANG Zhi, WANG Lin, SUN Zifa, FANG Qingfeng, CHENG Bangning, CHEN Biqian</i>	(1112)
Correlation between exhaled nitric oxide and peripheral blood eosinophils in patients with asthma and the value of combined detection	
<i>JIANG Yinling, YANG Wanchun, SHEN Xin</i>	(1115)
Analysis of pathogenic bacteria distribution and drug resistance in hospital-acquired pneumonia patients with acute cerebral infarction	
<i>TIAN Jinghua, YANG Pinna, LIU Qingquan</i>	(1119)
The diagnostic value of joint fluid AD-1, SDF-1 and SicAM-1 in postoperative infection after artificial humeral head replacement and their relationship with postoperative rehabilitation	
<i>XU Bing, WANG Huaqing, HUANG Qiangkai, XIAO Qiang, LIU Yan, WU Feipeng, HU Qionghua</i>	(1124)

REVIEWS

Epidemiological analysis of cervical lesions and new development of cervical cryotherapy	
<i>CAO Huan, LIU Bing, WANG Xiaodan</i>	(1129)

髓系肿瘤胚系易患因素研究进展

聂代静¹ 王芳¹ 周晓苏² 刘铭¹ 李绵洋³ 刘红星^{1,2,4*}

[摘要] 2016年版世界卫生组织造血和淋巴组织肿瘤分类中的一大更新是将具有胚系易患因素的髓系肿瘤(MNGPs)列为独立的分类。MNGPs可占骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病的4%~15%。不同的MNGPs内在原因、进展规律和治疗反应各有特征,正确诊断有利于制定更适合的治疗策略。家系调查鉴定突变携带者,有利于随访和肿瘤监测。

[关键词] 髓系肿瘤;胚系易患因素;高通量基因测序;遗传性骨髓衰竭综合征

Research advances of germline predisposition factors of myeloid neoplasms

NIE Daijing¹, WANG Fang¹, ZHOU Xiaosu², LIU Ming¹, LI Mianyang³, LIU Hongxing^{1,2,4*}

(1. Division of Laboratory Medicine, Hebei Yanda Ludaopei Hospital, Langfang, Hebei, China, 065201; 2. Beijing Ludaopei Institute of Hematology, Beijing, China, 100176; 3. Clinical Laboratory Department, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China, 100039; 4. Division of Pathology and Laboratory Medicine, Beijing Ludaopei Hospital, Beijing, China, 100176)

[ABSTRACT] In 2016, myeloid neoplasms with germline predisposition (MNGPs) was included as a separate classification for the first time in the World Health Organization's classification of hematopoietic and lymphoid tissue tumors (4th revised edition). MNGPs account for 4%~15% of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia cases. They have a wide range of causes, rates of progression, and treatment responses. As such, the correct diagnosis of MNGPs will identify more effective treatment strategies. Utilizing pedigree surveys to identify mutation carriers is conducive to follow-up and tumor monitoring.

[KEY WORDS] Myeloid neoplasm; Germline predisposition; High-throughput sequencing; Bone marrow failure syndrome

肿瘤的发生是遗传和环境共同作用的结果。2015年本团队曾撰文强调血液肿瘤的遗传和先天易感因素值得重视^[1]。在2016年修订的世界卫生组织(world health organization, WHO)造血和淋巴组织肿瘤分类中,一个重要的更新是将“具有胚系易患因素的髓系肿瘤(myeloid neoplasms with germline predisposition, MNGPs)”列为独立的分类^[2]。美国血液学会(the American Society of Hematology,

ASH)已联合临床基因组资源协会(the Clinical Genome Resource, ClinGen)成立髓系肿瘤(myeloid neoplasms, MNs)变异治疗专家组,制定胚系易感突变相关的指南^[3]。本文结合笔者近年的相关研究和工作经验,介绍该领域的最新研究进展。

1 MNGPs 鉴定的临床意义

既往认为MNGPs罕见,临床诊疗中常忽视遗传

基金项目:国家自然科学基金面上项目(61971443)

作者单位:1.河北燕达陆道培医院检验科,河北,廊坊 065201

2.北京陆道培血液病研究院,北京 100176

3.中国人民解放军总医院第一医学中心检验科,北京 100039

4.北京陆道培医院病理和检验医学科,北京 100176

*通信作者:刘红星, E-mail:starliu@pku.edu.cn

综合征相关体征的检查和家族史调查,或因条件限制无法进行相关检测。近年来新一代高通量基因测序(next generation sequencing, NGS)技术的进展和推广应用,使基因检测的临床常规应用和MNGPs的正确诊断成为可能。

MNGPs不仅见于儿童和青少年,也可于中年甚至老年发病^[2,4]。相当比例的患者不伴特征性体征或家族史,表现为散发的MNs^[2,4]。因此,年龄、体征和家族史都不能作为排除MNGPs的依据。既往认识不足和缺乏基因检查的依据时,MNGPs的发生率被低估。尽管特定基因相关的MNGP发生率不高,但目前可鉴定的各种MNGPs的总发生率可达MDS和AML的4%~15%^[4-6]。不同的MNGPs的内在原因、进展规律和治疗反应各有特征,因此需要针对胚系病因制定更合适的治疗策略^[1,2,4]。MNGPs患者的家庭成员也可能携带致病突变,并有发生MNs的风险。因此还应进行家系调查,密切随访突变携带者,必要时进行医疗干预^[2]。

2 既往无器官功能异常的MNGPs

这类MNGPs主要以血液肿瘤发病,目前已鉴定的主要有CEBPA-MNGP和DDX41-MNGP。

CEBPA是AML中最常发生体细胞突变的基因之一^[1,7]。CEBPA-MNGP患者发生AML时常为双CEBPA等位基因突变(CEBPA double mutation, CEBPAdm),胚系突变常位于基因5'端,体细胞突变常位于3'端。CEBPA-MNGP接近完全外显,常于儿童及青少年期发生AML,但也有46岁发病的报道^[8]。CEBPA-MNGP的形态和免疫表型与体细胞CEBPA突变的AML相似,发病前常无血细胞异常和MDS病史^[9]。患者对化疗敏感,但易复发或发生第二次的原发AML,这部分患者需异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)治疗^[10]。在本团队的一项研究中,5.3%的CEBPAdm-AML患者携带胚系CEBPA突变,即为CEBPA-MNGP^[10]。所报道的4例患者分别于4、9、11和23岁发病,其中3例分别在化疗缓解后10、26和66个月复发,1例在随访期间持续缓解。

DDX41突变见于约1.5%的MNs,其中一半伴胚系突变^[4]。DDX41-MNGP发病年龄大(中位年龄62岁),多以MDS发病,也可为AML。DDX41-MNGP预后差,但对去甲基化治疗反应好。在一项中国的报道中:DDX41-MNGP在MNs中的发生率为

1.6%,发病中位年龄67岁;88%的DDX41-MNGP患者伴另一DDX41等位基因体细胞突变;这些患者对去甲基化治疗的反应率可达69%^[11]。

3 伴既往血小板异常的MNGPs

家族性血小板异常伴AML易患(familial platelet disorder with predisposition to AML, FPD/AML)是一种RUNX1基因突变的常染色体显性遗传综合征^[1-2]。RUNX1编码一种在造血中起重要作用的转录因子蛋白,其体细胞突变和RUNX1-RUNX1T1融合基因在MNs中常见且具有重要临床意义。在WHO2016版分类标准中,伴RUNX1-RUNX1T1的AML和RUNX1-MNGP各被列为独立的AML遗传学分型,RUNX1体细胞突变的AML(RUNX1-AML)被列为暂定分型^[2]。最近的报道发现高达30%的RUNX1-AML患者携带胚系RUNX1突变,即属于RUNX1-MNGP^[12]。RUNX1-MNGP与体细胞突变的RUNX1-AML具有不同的伴随基因突变谱^[13]。

RUNX1调节巨核细胞发育和血小板生成。RUNX1-MNGP以血小板数量和功能异常为特点,常在较年轻时进展为MDS/AML(中位发病年龄33岁)^[1-2,4]。不同RUNX1家系外显率差异很大(11%~100%,中位数44%),同一家系中患者的临床表现亦不相同^[4]。胚系RUNX1突变多位于5'端,进展为AML时常伴随其他基因的体细胞突变。另一RUNX1等位基因的体细胞突变常见,但非必须。关于RUNX1-MNGP的研究相对较多,但对于各种RUNX1突变,如何判断其病理意义仍是重要问题。ASH/ClinGen专家组已发布关于胚系RUNX1突变变异致病意义的专家建议,初步制定了含52个变异的注释列表^[3,14]。

2型血小板减少症(thrombocytopenia 2, THC2)是ANKRD26基因突变导致的常染色体显性遗传病,以轻至中度血小板减少和MDS/AML易患(较总体人群高约30倍)为特征^[1-2,15]。ANKRD26突变多位于5'端非翻译区,影响RUNX1等转录因子与其启动子的结合。ANKRD26-MNGP患者常表现为轻度血小板减少和轻度出血倾向,血浆促血小板生成素常升高,骨髓检查可见巨核系造血异常、小巨核细胞伴核分叶异常等^[16]。

ETV6基因突变可导致5型血小板减少症(thrombocytopenia 5, THC5),表现为常染色体显

性的家族性血小板减少和血液肿瘤^[1,2,4,17]。患者伴不同程度血小板减少,轻至中度出血倾向。*ETV6*突变多位于结合DNA的ETS结构域,以二聚体和显性负效应影响正常*ETV6*蛋白的核定位,从而导致血小板相关基因异常表达。*THC5*更多进展为急性淋巴细胞白血病,但也可发生MDS/AML。

4 伴其他器官功能异常的MNGPs

主要包括*GATA2*-MNGP、遗传性骨髓衰竭综合征(inherited bone marrow failure syndromes, IBMFS)、Bloom综合征(Bloom syndrome, BSyn)和遗传性端粒疾病(telomere biology disorders, TBD)等^[2]。这些综合征多涉及一组基因,具有多种临床表现。

胚系*GATA2*突变可见于编码区和非编码区,多为单等位基因的错义、无义或调节区突变。突变携带者可表现为免疫缺陷、淋巴水肿、耳聋及MDS/AML易患^[2],也可仅以中性粒细胞减少或骨髓衰竭发病^[4]。*GATA2*相关疾病的发病年龄和疾病表型具有很强的异质性:中位年龄约20岁,64%表现为感染,9%表现为淋巴水肿,21%以MDS/AML为首发病;约70%的*GATA2*胚系突变携带者会进展为MDS/AML,中位年龄29岁^[18]。多数*GATA2*-MNGP儿童病例表现为散发性MDS/AML,并无MN家族史或其他综合征表现。*GATA2*-MNGP预后较差,合并*NRAS*等体细胞突变可能会促进向AML的进展^[19-20]。Allo-HSCT可改善这部分患者的预后,但易发生移植相关的神经毒性反应和血栓事件^[19]。

IBMFS包括范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)、Shwachman-Diamond综合征、Diamond-Blackfan贫血和先天性重型中性粒细胞减少症(severe congenital neutropenia, SCN)等。其中FA最为常见,约25%~30%的FA患者并无畸形、皮肤色素异常及身材矮小等综合征表现^[2,4,21]。FA患者发生各种肿瘤的概率是总体人群的600~800倍,MDS/AML可能是首发病。到50岁时有40%的FA患者发生MDS,40岁时有20%发生AML,其中*FANCD1/BRCA2*突变携带者常更早期发生白血病^[4]。目前已鉴定22种FA相关的基因,*FANCA*突变最常见,约23%~40%的*FANCA*突变为基因片段缺失,在常规NGS panel测序或WES分析时容易被忽略^[22]。

编码DNA解旋酶的*BLM*基因突变可导致BSyn,患者常有发育异常、光敏性皮炎、免疫缺陷等

表现^[1,23]。BSyn患者到40岁时有80.9%发生肿瘤,其中白血病可占40%^[1,23]。本团队曾报道一例患者于8岁时被诊断为再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA),曾对激素和环孢素治疗有反应,但3年后进展为AML^[23]。体格检查有皮肤色素沉着和轻度头颅骨发育异常,但无其他BSyn相关的典型体征。经联合WES和转录组测序发现该患者携带两个遗传性的*BLM*截短型突变,并且*RUNX1-PRDM16*融合基因阳性。该患者的AML常规化疗未能缓解,经挽救性allo-HSCT获得了持续的完全缓解。

SCN以持续的中性粒细胞减少和严重的细菌感染为特征,已鉴定的致病基因有*ELANE*、*G6PC3*、*GFI1*、*WAS*和*HAX1*等^[1,4]。近年来粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)的应用帮助90%的患者显著改善了生存,但累积发生MDS/AML的风险也增加,并且呈G-CSF剂量相关性。使用G-CSF超过10年的SCN患者中,每年约2.3%发生MDS/AML,进展为AML时常继发*CSF3R*突变。

先天性角化不良(dyskeratosis congenita, DC)是TBD的临床表现形式之一,除骨髓衰竭和肿瘤易患以外,还可伴肺/肝纤维化。指甲发育不良、花斑状皮肤色素异常和黏膜白斑是其典型体征,MDS/AML的发生风险是总体人群的2663倍^[1,2]。部分DC患者可只表现为造血衰竭,缺乏皮肤黏膜异常等典型表现,难以与AA和低增生性MDS鉴别。另一方面,15%的MDS患者携带DC相关的胚系基因突变^[1]。对于伴MDS家族史或有血细胞减少、头颈部鳞癌、肺/肝纤维化的MDS/AML患者,应筛查DC相关的胚系基因突变。

5 其他新发现的MNGPs

上述MNGPs只能解释一小部分具有遗传倾向MN^[24]。人们对MNGPs的认识仍在不断拓展,近年来报道的相关基因有*TET2*、*SAMD9*、*SAMD9L*、*SRP72*、*STG2B*和*GSKIP*等^[4,24-26]。在一项对179例疑似IBMFS患者的研究中,用WES鉴定有48%(86例)为IBMFS,其中18.6%(16/86)为*SAMD9*或*SAMD9L*突变,7%(6例)为*MECOM/EVII*突变,8%(7例)为*ERCC6L2*突变^[24]。*SAMD9*或*SAMD9L*胚系杂合突变携带者常表现为持续的血小板减少,易进展为伴单体7/7q-的MDS,并且具有多种临床表

型,也可直接以MDS/AML发病^[4,24]。

*TET2*体细胞突变常见于MNs^[7],近两年也开始有胚系*TET2*突变的血液肿瘤家系报道^[25-26]。在2019年报道的一个家系中,携带相同的*TET2*移码突变的3名同胞分别于39、45和46岁时发生不同类型的淋巴瘤^[25]。在新近报道的一个MNs家系中,携带相同*TET2*移码突变的3名同胞分别于53、60和61岁时诊断为真性红细胞增多症、CMML和AML^[26]。本团队曾于2016年报道一例2岁6个月发病的AML患者同时携带胚系*TET2*和*NOTCH1*突变,该患者同时有*RUNX1-RUNX1T1*融合基因、*CALR*突变和*KIT*突变阳性,并对常规化疗方案耐药^[27]。这些报道提示,胚系*TET2*突变相关的血液肿瘤可能具有异质性强、难治、预后差的特点。

6 总结及展望

本团队于2017年撰文提出遗传致病因素的冰山模型,并预期肿瘤等疾病的遗传易患因素将越来越多被揭示^[28]。高通量基因测序、基因组分析、大数据和人工智能技术的进展正在加速MNGPs的发现和基因检测的临床应用^[29-31]。越来越多的证据显示相当比例的血液肿瘤患者存在胚系易患因素^[32]。有效检测和分析MNGPs相关的基因突变可帮助更多患者得到正确诊断和个体化治疗,但亦应注意基因变异临床意义的准确解释需要病理学家、临床医师和临床遗传学家等多学科的紧密合作^[2-3]。

参考文献

- [1] 陈雪,刘红星. 血液肿瘤的遗传和先天易感因素值得重视:第56届美国血液学会年会报道[J]. 白血病·淋巴瘤, 2015, 24(2): 65-70.
- [2] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [3] Wu D, Luo X, Feurstein S, et al. How I curate: applying American Society of Hematology-Clinical Genome Resource Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel rules for *RUNX1* variant curation for germline predisposition to myeloid malignancies [J]. *Haematologica*, 2020, 105(4): 870-887.
- [4] Kennedy AL, Shimamura A. Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution [J]. *Blood*, 2019, 133(10): 1071-1085.
- [5] Sung PJ, Babushok DV. Born to *RUNX1* [J]. *Blood*, 2020, 135(21): 1824-1825.
- [6] Wartiovaara-Kautto U, Hirvonen EAM, Pitkänen E, et al. Germline alterations in a consecutive series of acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2018, 32(10): 2282-2285.
- [7] 王芳,张阳,陈雪,等. 初诊急性髓系白血病患者十种常见突变基因的突变组分析 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2015, 24(3): 161-164.
- [8] Tawana K, Wang J, Renneville A, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline *CEBPA* mutations [J]. *Blood*, 2015, 126: 1214-23.
- [9] Tawana K, Rio-Machin A, Preudhomme C, Fitzgibbon J. Familial *CEBPA*-mutated acute myeloid leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2017, 54(2): 87-93.
- [10] Zhang Y, Wang F, Chen X, et al. Companion gene mutations and their clinical significance in AML with double mutant *CEBPA* [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2019, Online Published.
- [11] Qu S, Li B, Qin T, et al. Molecular and clinical features of myeloid neoplasms with somatic *DDX41* mutations [J]. *Br J Haematol*. 2020.
- [12] Simon L, Spinella JF, Yao CY, et al. High frequency of germline *RUNX1* mutations in patients with *RUNX1*-mutated AML [J]. *Blood*, 2020, 135(21): 1882-1886.
- [13] Brown AL, Arts P, Carmichael CL, et al. *RUNX1*-mutated families show phenotype heterogeneity and a somatic mutation profile unique to germline predisposed AML [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(6): 1131-1144.
- [14] Luo X, Feurstein S, Mohan S, et al. ClinGen Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel recommendations for germline *RUNX1* variants [J]. *Blood Adv*, 2019, 3(20): 2962-2979.
- [15] Rabbolini D, Connor D, Morel-Kopp MC, et al. An integrated approach to inherited platelet disorders: results from a research collaborative, the Sydney Platelet Group [J]. *Pathology*, 2020, 52: 243-255.
- [16] Fournier E, Debord C, Soenen V, et al. Baseline dysmegakaryopoiesis in inherited thrombocytopenia/platelet disorder with predisposition to haematological malignancies [J]. *Br J Haematol*, 2020, 189: e119-e122.
- [17] Galera P, Dulau-Florea A, Calvo KR. Inherited thrombocytopenia and platelet disorders with germline predisposition to myeloid neoplasia [J]. *Int J Lab Hematol*, 2019, 41 Suppl 1: 131-141.
- [18] Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. *GATA2* deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity [J]. *Blood*, 2014, 123: 809-21.
- [19] Hofmann I, Avagyan S, Stetson A, et al. Comparison of Outcomes of Myeloablative Allogeneic Stem Cell Transplantation for Pediatric Patients with Bone Marrow Failure, Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia with and without Germline *GATA2* Mutations [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26(6): 1124-1130.

胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准的制定

张文新¹ 于婷¹ 孙楠¹ 陈样宜² 高飞¹ 黄杰^{1*} 曲守方^{1*}

[摘要] 目的 制定胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准,使用BioelectronSeq 4000等不同测序平台的试剂盒进行验证,评价标准的可行性。**方法** 使用高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体(T21、T18和T13)国家参考品,按照拟定行业标准的要求进行验证。首先提取国家参考品的血浆游离DNA,制备文库,上机测序,通过生物信息软件分析获得染色体数目的结果。**结果** 胎儿游离DNA浓度为10%和5%的国家阳性参考品结果均为相应染色体三体;40个3.5%浓度的国家检测限参考品,其中至少20个参考品结果为相应染色体三体;嵌合比例为70%和30%的国家嵌合体参考品均为相应染色体三体;国家微缺失微重复参考品中18号染色体微重复的参考品均为18三体,其余参考品结果均不是21、18和13三体;染色体正常或其他染色体异常的国家阴性参考品,结果均不是21、18和13三体。**结论** 制定的行业标准可以用于该类产品试剂盒的质量评价,为产品注册检验及上市后监督管理提供依据。

[关键词] 无创产前基因检测;染色体非整倍体;第二代测序技术;胎儿游离DNA;三倍体

Establishment of industry standards for fetal chromosome aneuploidy including trisomy 21, trisomy 18 and trisomy 13 (Next-Generation Sequencing)

ZHANG Wenxin, YU Ting, SUN Nan, CHEN Yangyi, GAO Fei, HUANG Jie*, QU Shoufang*

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China, 100050; 2. CapitalBio Genomics Co., Ltd., Dongguan, Guangdong, China, 523808)

[ABSTRACT] **Objective** To develop, verify, and evaluate the feasibility of industry standards for diagnosing fetal chromosome aneuploidy trisomy 21, trisomy 18, and trisomy 13 using next generation sequencing (NGS). **Methods** According to the requirements of the proposed industry standards and national reference materials of fetal chromosomal aneuploidy abnormality (T21, T18 and T13), cell-free DNA in plasma was sequenced using NGS. Chromosome number was determined using bioinformatics analysis software. **Results** National positive references with the fetal cell-free DNA concentrations of 10% and 5% were the corresponding trisomy. In 40 national limit references with 3.5% concentrations, at least 20 samples were the corresponding trisomy. National chimera references with the chimera proportion of 70% and 30% were the corresponding trisomy. Trisomy 18 was found in two samples with chromosome 18 microduplication in national microdeletion and microduplication references, while the results of other samples were not trisomy 21, trisomy 18 and trisomy 13. Using national negative references employing normal chromosomes or chromosomes with other abnormalities, the results were negative for trisomy 21, 18 and 13. **Conclusion**

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,北京 100050

2. 东莞博奥木华基因科技有限公司,广东,东莞 523808

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

注:张文新和于婷共为第一作者

The established industry standards can evaluate kit quality, and provide a basis for product registration and post-marketing supervision and management.

[KEY WORDS] Non-invasive prenatal genetic testing; Chromosomal aneuploidy; Next-generation sequencing; Circulating cell-free fetal DNA; Trisomy (T)

染色体非整倍体异常是常见的遗传病,包括21-三体综合征(Trisomy 21, T21)、18-三体综合征(Trisomy 18, T18)和13-三体综合征(Trisomy 13, T13),以及一些性染色体三体型(47, XXY)及X染色体单体型(45, X)。21-三体综合征是新生儿最常见的染色体病,发生率约为1:800^[1],60%患儿在胎内早期即流产,存活者有明显的智力落后和生长发育障碍等。而13-三体综合征和18-三体综合征患儿则伴有严重的畸形及生长和智力发育迟缓,多数在出生后1年内死亡^[2]。这类疾病建议通过产前筛查和产前诊断进行预防,从而降低出生缺陷发生率。传统的产前诊断方法是通过绒毛活检、羊水穿刺或者脐静脉血穿刺等,获得胎儿的染色体进行核型分析。1997年,卢煜明^[3]等在母体的血液发现了胎儿游离DNA(circulating cell-free fetal DNA),几乎全部来源于胎盘滋养层细胞。母体外周血游离DNA约5%~10%为胎儿的DNA,并且随着孕周增大胎儿游离DNA含量也随之增加,分娩后2小时即被清除,成为妊娠的特异性标志。基于这一研究,无创产前基因检测(Non-invasive prenatal genetic testing, NIPT)技术为胎儿染色体非整倍体检测开辟新的研究方向,它是采用二代测序技术(Next-generation sequencing technology)并结合生物信息学分析胎儿发生染色体非整倍体的风险率^[4],已经应用于临床检测。

目前我国尚无相关的国家标准或者行业标准对该类试剂盒的性能和使用进行规范,亟需制定其行业标准对试剂盒的性能进行评价。行业标准的制定将有助于提高并统一产品标准。本研究是使用国家药品监督管理局(NMPA)批准的基于二代测序技术的胎儿染色体非整倍体(T13/T18/T21)检测试剂盒,对高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体(T21、T18和T13)国家参考品进行检测,评价该标准的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体

(T21、T18和T13)国家参考品,中国食品药品检定研究院(简称中检院)提供。

胎儿染色体非整倍体(T13/T18/T21)检测试剂盒(可逆末端终止测序法)和NextSeq CN500基因测序仪,杭州贝瑞和康基因诊断技术有限公司提供。胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)和BGISEQ-500基因测序仪,华大生物科技(武汉)有限公司提供。胎儿染色体非整倍体21三体、18三体和13三体检测试剂盒(半导体测序法)和DA8600基因测序仪,广州市达瑞生物技术股份有限公司提供。胎儿染色体非整倍体(T21、T18、T13)检测试剂盒(半导体测序法)和BioelectronSeq 4000基因测序仪,东莞博奥木华基因科技有限公司提供。

1.2 血浆游离DNA提取

采用试剂盒说明书指定的血浆游离DNA提取试剂盒(磁珠法)或者核酸提取或纯化试剂,提取国家参考品的血浆游离DNA。

1.3 文库的制备

采用四家胎儿染色体非整倍体(T13/T18/T21)检测试剂盒,对血浆游离DNA进行文库构建。以半导体测序法试剂盒为例,先将血浆游离DNA片段末端修复,进行目标DNA片段的富集,然后在DNA片段两端分别加入与测序芯片结合的接头连接和区分样本的唯一性的标签序列,PCR扩增后用DNA纯化试剂盒进行纯化,获得待测序分析的文库。使用荧光定量PCR仪测定各个文库的浓度,按照等物质的量混合文库。

1.4 测序

将一定量的混合文库,加到测序芯片上,用基因测序仪检测。以BioelectronSeq 4000基因测序仪为例,将带有测序接头的DNA文库加入乳液扩增反应体系,使每个DNA模板在独立的微扩增环境中扩增放大,然后其作为测序模板载入测序芯片。将四种脱氧核苷酸分别标记不同的荧光基团,每一个循环添加一种核苷酸,该核苷酸如果被合成到DNA中会释放氢离子,引起溶液PH值变化从而得到核苷酸序列信息。

1.5 数据分析

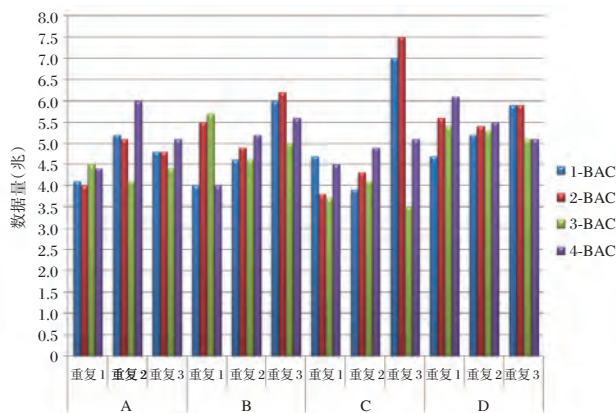
测序完成后通过生物信息软件,对获得的fastq数据进行过滤。使用BWA软件,将每个read与人类基因组参考序列进行比对,计算出唯一比对到基因组每条染色体上的read数,并获得每条染色体上read数占全部染色体的百分比。使用Z值公式分别计算待分析样本的21号、18号和13号染色体的Z值,Z值大于3.0的样本判定为相应染色体三体阳性。

2 结果

2.1 建库质量和有效数据量

行业标准的建库质量,要求在检测国家参考品或企业参考品时,应规定明确的文库构建失败率。采用国家参考品检测时,要求文库构建失败率应不超过1.0%,即227个样本不超过2个样本失败。经过四家不同试剂盒的验证,结果表明只有1家公司的2批试剂的文库构建失败率为0.88%和0.44%,其余均为0%,符合标准要求。

标准要求对国家参考品或企业参考品中数据量控制参考品,应有明确的数据量要求。国家参考品要求数据量控制参考品(1-BAC、2-BAC、3-BAC和4-BAC)的有效数据量应不低于3.5 M(1M代表1,000,000条reads)。经过A、B、C和D四家不同试剂盒的验证,每个参考品重复3次试验,结果表明均符合要求,见图1。



注:蓝色,红色,绿色及紫色分别代表1-BAC、2-BAC、3-BAC和4-BAC四个数据量控制参考品。

图1 数据量控制参考品结果

Figure 1 Result of data volume reference

2.2 阳性参考品符合率

标准要求采用国家参考品或企业参考品中阴性参考品进行检测,结果应为相应的胎儿染色体

非整倍体(21三体、18三体和13三体)。分析胎儿游离DNA浓度为10%的T21、T18和T13国家阳性参考品的数据,结果显示均为相应染色体三体,且与样本的染色体核型结果一致。其中标示为21-T21-17-10%的国家阳性参考品结果为21三体高风险($Z=10.159$),同时提示13三体低风险($Z=-0.824$)和18三体低风险($Z=0.736$),见图2。

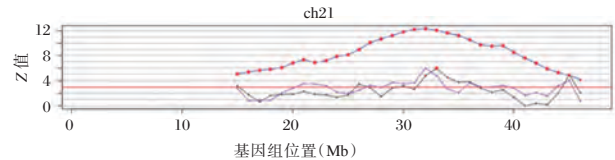


图2 阳性参考品21号染色体的结果

Figure 2 Result of chromosome 21 for positive reference

2.3 阴性参考品符合率

标准要求采用国家参考品(染色体正常样本和其他类型染色体非整倍体)或企业参考品中阴性参考品进行检测,结果应为21三体、18三体和13三体阴性。分析胎儿游离DNA浓度为10%国家阴性参考品的数据,结果显示均未检出21三体、18三体和13三体。标示为187-T22-1-10%阴性参考品结果为21三体低风险($Z=0.908$)、18三体低风险($Z=-0.023$)和13三体低风险($Z=0.383$),而22三体高风险($Z=14.459$),其结果与该样本的染色体核型结果一致,见图3。

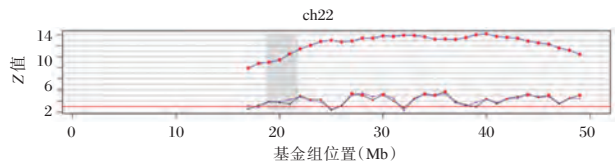


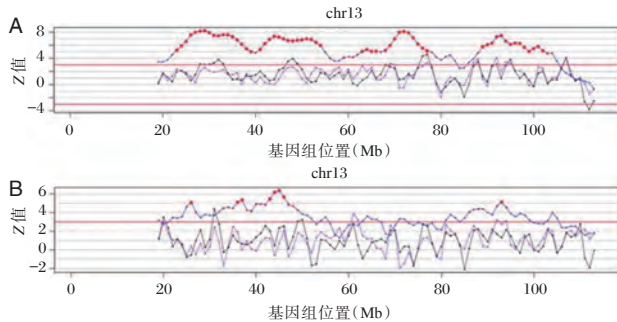
图3 阴性参考品22号染色体的结果

Figure 3 Result of chromosome 22 for negative reference

2.4 检测限

标准要求采用国家参考品或企业参考品中检测限参考品进行检测,对5%浓度检测限参考品应全部检出,对3.5%浓度检测限参考品检出率应不低于50%。分析胎儿游离DNA浓度为5%和3.5%国家检测限参考品的数据,结果显示均能正确检出相应染色体三体。标示为101-T13-7-5%的5%浓度检测限参考品结果为13三体高风险($Z=10.819$)、18三体低风险($Z=-1.326$)和21三体低风险($Z=0.458$),标示为147-T13-3-3.5%的3.5%浓度检测限参考品结果为13三体高风险($Z=8.067$)、18

三体低风险 ($Z=-2.221$) 和 21 三体低风险 ($Z=-0.102$), 见图 4。结果表明不低于 3.5% 胎儿 DNA 浓度染色体非整倍体样本能够正确检出。



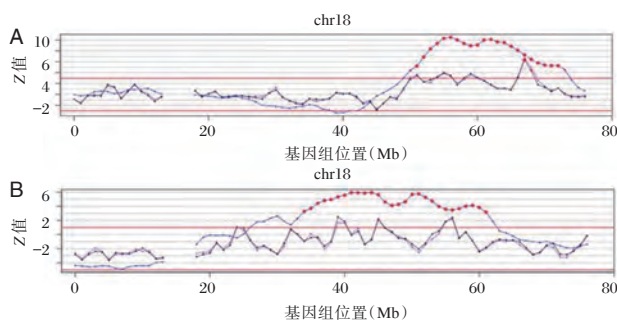
注: A 为标示 101-T13-7-5% 的 5% 浓度检测限参考品, B 为标示 147-T13-3-3.5% 的 3.5% 浓度检测限参考品。

图 4 5% 浓度和 3.5% 浓度的检测限参考品 13 号染色体的结果

Figure 4 Result of chromosome 13 for 5% and 3.5% limit reference

2.5 微缺失微重复参考品符合率

标准要求采用国家参考品或企业参考品中微缺失微重复参考品进行检测, 微缺失微重复参考品中 18、13、21 号染色体中一定片段大小以上微重复样本应全部检出相应拷贝数变异, 其他染色体微缺失微重复参考品检测结果不应为 21 三体阳性、18 三体阳性和 13 三体阳性。微缺失微重复国家参考品包括 2 个 18 号染色体含 20 Mb 以上微重复的参考品, 结果显示全部检出 18 三体高风险 ($Z=4.601$ 和 4.798), 同时 13 三体低风险 ($Z=-1.154$ 和 0.932) 和 21 三体低风险 ($Z=-1.265$ 和 -1.373); 而其他 8 个微缺失微重复参考品结果均未检出 21 三体、18 三体和 13 三体。见图 5。



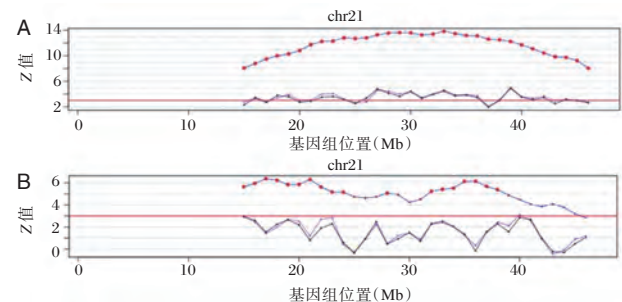
注: A 为标示 194-微缺失 2%~5% 的微重复参考品, B 为标示 200-微缺失 8-5% 的微重复参考品。

图 5 微重复参考品 18 号染色体的结果

Figure 5 Result of chromosome 18 for microduplication reference

2.6 嵌合体参考品符合率

标准要求采用国家参考品或企业参考品中嵌合体参考品进行检测, 对规定百分比以上的异常嵌合体参考品应全部检出, 低于规定百分比的异常嵌合体参考品可为检出或未检出。分析嵌合比例为 70% 和 30% 的国家嵌合体参考品的数据, 结果显示为相应染色体三体, 表明该试剂盒也能准确检测出嵌合体样本。标示为 158-T21-M-70% 嵌合体参考品的结果为 21 三体高风险 ($Z=14.275$)、13 三体低风险 ($Z=-1.508$) 和 18 三体低风险 ($Z=0.866$), 标示为 161-T21-M-30% 嵌合体参考品的结果为 21 三体高风险 ($Z=6.353$)、13 三体低风险 ($Z=-2.155$) 和 18 三体低风险 ($Z=-0.716$), 见图 6。



注: A 为标示 158-T21-M-70% 的嵌合体参考品, B 为标示 161-T21-M-30% 的嵌合体参考品。

图 6 嵌合体参考品 21 号染色体的结果

Figure 6 Result of chromosome 21 for chimera reference

3 讨论

无创产前基因检测在临床上已经应用于胎儿染色体非整倍体 (T21、T18 和 T13) 的检测^[5-6], 它只需采集孕妇静脉血从中提取胎儿游离 DNA, 具有无创性、高通量和高准确性等优点, 为胎儿染色体非整倍体疾病的产前辅助诊断提供新的检测技术。但是该技术也有一定的局限性, 对三体平衡易位和嵌合型三体的检出率低, 不能特异性地检测出嵌合体异常等干扰因素的影响, 而且限制性胎盘镶嵌体 (confined placental mosaicism, CPM) 对性染色体异常检测有较多的假阳性等影响^[7-8]。因此染色体核型分析技术仍是染色体非整倍体诊断的金标准, 无创产前基因检测结果阳性需要进行染色体核型分析作为最终诊断。

2014 年国家食品药品监督管理总局要求遗传性疾病预测的产前基因检测仪器、试剂和医用软件等产品需要经食品药品监管部门 (下转第 1000 页)

采用二代测序对 Marfan 综合征家系进行植入前遗传学诊断

何天文^{1,2} 卢建^{1,2} 陈创奇³ 刘顿³ 丁红珂^{1,2} 董云巧³ 杜丽^{1,2} 尹爱华^{1,2*}

[摘要] **目的** 探讨二代测序在 Marfan 综合征家系的植入前遗传学诊断应用价值和优势。**方法** 针对 2016 年 10 月在广东省妇幼保健院医学遗传中心就诊的 1 例 Marfan 综合征家系行外显子捕获测序筛查微纤维蛋白(*FBNI*)基因突变位点,筛查结果通过 Sanger 测序进行验证,明确基因突变位点。选择 *FBNI* 基因编码区及外显子-内含子交界为目标区域,在该基因上下游 2 M 区域内选择 100 个高密度紧密连锁的单核苷酸多态位点(SNP)作为遗传连锁标记,构建夫妇单倍型。采用二代测序对胚胎的突变位点直接测序和单体型连锁分析进行植入前遗传学诊断。**结果** 男方存在 *FBNI* 基因 c.247+1G>A 的致病性突变,经直接测序和单体型连锁分析,患者夫妇的 5 个囊胚中 3 个正常,2 个致病。选择发育良好且遗传学检测正常的胚胎植入母体子宫,足月分娩一健康婴儿。**结论** 采用二代测序对 Marfan 综合征家系进行植入前遗传学诊断可以阻断此单基因病在该家系中的再发风险,还可以避免选择非整倍体胚胎而导致的流产问题,是 Marfan 综合征出生缺陷的有效预防手段。

[关键词] 二代测序; Marfan 综合征; *FBNI* 基因; 植入前遗传学诊断

Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using next-generation sequencing

HE Tianwen^{1,2}, LU Jian^{1,2}, CHEN Chuangqi³, LIU Dun³, DING Hongke^{1,2}, DONG Yunqiao³, DU Li^{1,2}, YIN Aihua^{1,2*}

(1. Medical Genetics Center of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442; 2. Maternal and Children Metabolic-Genetic Key Laboratory of Guangdong, Guangzhou, Guangdong, China, 511442; 3. Reproductive center of Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong, China, 511442)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the value and advantage of next-generation sequencing in preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome. **Methods** A Marfan syndrome family was screened for the *FBNI* gene mutation site by exon capture sequencing in the medical genetics center of Guangdong Women and Children Hospital in October 2016. The screening results were verified by Sanger sequencing, and the mutation site was identified. The coding region and exon-intron junction of the *FBNI* gene were selected as the target region, and 100 high-density closely linked single nucleotide polymorphisms (SNP) were selected as the genetic linkage markers in the upstream and downstream 2m regions of the *FBNI* gene to construct the couple haplotypes. Direct sequencing of mutation sites and haplotype linkage analysis by next generation sequencing were used for preimplantation genetic diagnosis. **Results** There was a pathogenic mutation of the *FBNI* gene c.247+1g>A in the male side. By direct sequencing and haplotype linkage analysis, 3 of the 5 blastocysts of

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC1000703)

作者单位:1. 广东省妇幼保健院医学遗传中心,广东,广州 511442

2. 广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室,广东,广州 511442

3. 广东省妇幼保健院生殖中心,广东,广州 511442

*通信作者:尹爱华, E-mail: yinaiwa@126.com

the patients were normal and 2 were pathogenic. A well-developed and genetically normal embryo was implanted into the mother's uterus, and a healthy baby was born at full term. **Conclusion** preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome family by next generation sequencing can block the risk of recurrence of this single gene disease in the family, and can also avoid the abortion caused by the selection of aneuploid embryos, which is an effective prevention method for birth defects of Marfan syndrome.

[KEY WORDS] Next generation sequencing; Marfan syndrome; *FBNI* gene; preimplantation genetic diagnosis

Marfan 综合征(Marfan syndrome, MFS)是一种累及全身结缔组织的常染色体显性遗传性病,其临床病变最常累及骨骼、眼与心血管系统^[1]。大多数 MFS 患者具有家族史,编码微纤维蛋白(fibfillin.1, *FBNI*)的缺陷或突变是其主要致病原因。人群发病率为 0.02%~0.03%,其中 25%~30%病例为散发的,考虑可能是亲代生殖细胞突变所致,其后代患病风险为 50%^[2-6]。目前对 MFS 出现症状进行对症治疗,并无针对 MFS 的有效根治方法^[7]。通过植入前遗传学诊断和产前诊断可以预防 MFS 患儿出生。二代测序(next generation sequencing, NGS)技术作为胚胎植入前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)的新检测手段,不仅能检测染色体非整倍性、染色体结构异常以及单基因疾病,而且精度高^[8]。本研究对 1 个 MFS 家系进行外显子捕获测序筛查 *FBNI* 基因突变,通过 Sanger 测序验证结果。明确 *FBNI* 基因致病突变后,采用 NGS 对突变位点的直接测序和致病基因连锁单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点连锁分析进行 PGD,以避免妊娠 MFS 胎儿。

1 资料与方法

1.1 研究对象

患者(Ⅱ:2)男,32岁,轻微漏斗胸,扁平足,手脚趾修长,皮下脂肪层很薄,心功能Ⅱ级,因主动脉弓夹层曾行主动脉根部置换术治疗。患者父母(Ⅰ:1,Ⅰ:2)非近亲结婚,均未见明显异常;患者妻子(Ⅱ:1)33岁,表型正常,无家族史(图1),G1P0A1,于2014年发生早期自然流产1次,没有对流产物进行相关的遗传学检查。为了避免妊娠患儿,该夫妇于2016年10月在广东省妇幼保健院医学遗传中心和生殖医学中心就诊咨询要求行PGD。该夫妇充分了解PGD治疗过程及相关风险后签署知情同意书。本研究经广东省妇幼保健院生殖医学伦理委员会批准。

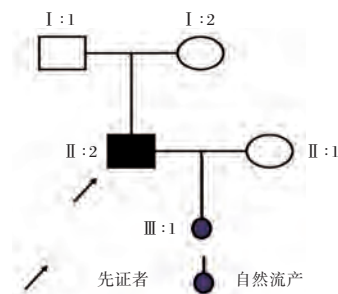


图1 Marfan 综合征家系图

Figure 1 Marfan syndrome pedigree

1.2 主要试剂与仪器

全基因组扩增试剂盒、胚胎植入前单基因病检测文库试剂盒、胚胎植入前染色体非整倍体检测试剂盒(北京中仪康卫医疗器械有限公司,中国北京),Verity 梯度 PCR 仪、ABI3730 测序仪(ABI 公司,美国),MiSeq 高通量测序(Illumina 公司,美国)

1.3 方法

1.3.1 标本采集及基因组 DNA 提取

抽取Ⅰ:1、Ⅰ:2、Ⅱ:1、Ⅱ:2的EDTA抗凝外周血各2mL,提取外周血基因组DNA。采用天根生化科技有限公司的磁珠法血液基因组提取试剂盒(DP329)进行提取,按照试剂盒说明书进行提取操作。

1.3.2 *FBNI* 基因突变筛查及验证

对 Marfan 综合征家系成员Ⅰ:1、Ⅰ:2、Ⅱ:1、Ⅱ:2进行外显子捕获测序筛查 *FBNI* 基因突变位点。检测到的致病突变位点进行 Sanger 测序验证,用 Oligo6 软件设计针对致病位点的特异性引物,扩增后用 ABI3730 遗传分析仪进行检测。对 ABI3730 遗传分析仪检测生成的 ab1 文件,用 SeqMan 软件进行分析,判定 NGS 检测到的致病突变位点是否真实存在。

1.3.3 患者夫妇单体的构建

以 *FBNI* 基因编码区及外显子-内含子交界为目标区域,在该基因上下游 2M 区域内选择 100 个

高密度紧密连锁的 SNP 作为遗传连锁标记,利用 ION AMPLISEQ™ DESIGNER 网站设计引物,经 DNA 纯化、建库、二代测序后,选择有效位点进行构建单体型。

1.3.4 胚胎培养及胚胎活检

取卵后进行卵细胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 授精,受精卵转人分裂期胚胎培养液继续培养。胚胎发育第 3 天用激光脉冲在透明带上切割一直径约 20 μm 的裂口,将胚胎转移至囊胚培养液中继续培养。待胚胎发育第 5 天 (D5) 或第 6 天 (D6) 观察到囊胚形成且脱出裂口滋养层细胞数在 2~9 个时进行活检。活检时用固定针吸吹胚胎,用活检针吸取脱出裂口的滋养层细胞,取出的滋养层细胞吹入活检液中,在 PBS 液滴中清洗后转入 PCR 反应管中。活检的囊胚编号后进行玻璃化冷冻处理,待遗传学检查完成后再行解冻移植。

1.4 植入前遗传学诊断

对活检获得的囊胚滋养层细胞进行基于等温多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA) 技术的全基因组扩增。扩增成功的样本行多重 PCR 扩增单体型目标区域,产物纯化建库后 NGS。通过 NGS 对 *FBNI* 基因突变位点直接测序和致病基因连锁 SNP 位点连锁分析进行 PGD。利用 Sanger 测序进一步验证 NGS 结果。针对结果显示不携带致病突变的胚胎进行了低深度的染色体非整倍性筛查,以排除有携带染色体拷贝数异常的胚胎。

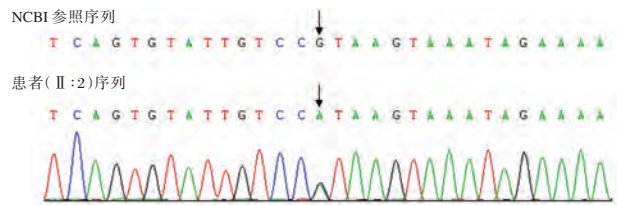
1.5 产前诊断

选择 PGD 结果显示不携带致病突变的且发育良好的胚胎于冻融胚胎周期进行移植。于胚胎移植后 14 d 查血 HCG 确定是否妊娠,于胚胎移植后 4 周行经阴道 B 超确定是否临床妊娠,于孕 18~24 周时行羊膜腔穿刺进行产前诊断验证 PGD 结果。

2 结果

2.1 突变筛查及验证

通过二代测序和分析,该家系成员未发现 *FBNI* 基因各外显子存在大片段缺失或重复,患者 (II:2) 在 *FBNI* 基因上发现 1 个剪切位点突变 c.247+1 G>A, 为杂合子,该突变位点在数据库中有疾病相关性报道。患者父母 (I:1, I:2) 及患者妻子 (II:1) 均未检出突变,该突变通过 Sanger 测序进行验证。见图 2、表 1。



注:箭头所指为突变位置。

图 2 患者 (II:2) *FBNI* 基因 c.247+1 G>A 突变 Sanger 测序图

Figure 2 Sanger sequence diagram of c.247+1 G>A mutation of *FBNI* gene in patients (II:2)

表 1 家系 *FBNI* 基因突变筛查及验证结果

Table 1 Screening and validation results of *FBNI* gene mutation in family

样品	二代测序		Sanger 测序
	测序深度	读出碱基及比例 (%)	
患者父 (I:1)	156	G (94.23) C (5.77)	GG
患者母 (I:2)	152	G (94.08) C (5.26) A (0.66)	GG
患者 (II:2)	112	G (55.36) C (2.68) A (41.96)	GA
患者妻子 (II:1)	114	G (94.74) C (5.26)	GG

2.2 夫妇单体型的构建

以 *FBNI* 基因编码区及外显子-内含子交界为目标区域,在该基因上下游 2M 区域内选择 100 个高密度紧密连锁的 SNP 作为遗传连锁标记,经过 NGS 后,选择有效位点进行单体型分析。患者夫妇有效 SNP 位点数和分布。见表 2。

表 2 患者夫妇有效 SNP 位点数和分布

Table 2 number and distribution of effective SNP in couples

样本	基因下游		基因内	基因上游	
	1M~2M	0M~1M		0M~1M	1M~2M
患者妻子 (II:1)	2	7	2	8	1
患者 (II:2)	2	17	9	12	2

2.3 胚胎培养及胚胎活检

获卵 20 个,其中成熟卵子 17 个,予以 ICSI 后正常受精 15 个,所有正常受精卵均发生卵裂, D5 观察有 5 枚囊胚符合活检标准,活检产物标记为 D501、D502、D503, D6 观察有 2 枚囊胚符合活检标准,产物标记为 D601、D602,每个样本活检细胞数约 2~9 个细胞。活检后进行胚胎玻璃化冷冻保存。

2.4 植入前遗传学诊断

对活检获得的囊胚滋养层细胞分别进行全基因组扩增。扩增成功的样本行多重 PCR 扩增单体型目标区域,产物纯化建库后 NGS。利用 Sanger 测序进行进一步验证,结果与 NGS 结果

一致。由于该突变为新发突变,结合胚胎的该突变 NGS 结果和 Sanger 测序结果再进行单体型连锁分析,结果显示 D5 的 3 个胚胎中 2 个为正常胚胎,D6 的 2 个胚胎中 1 个为正常胚胎。见表 3、表 4。

表 3 *FBNI* 基因 c.247+1G>A 突变植入前遗传学诊断结果

Table 3 Preimplantation genetic diagnosis results of c.247+1G>A mutation of *FBNI* gene

样品	二代测序			Sanger 测序	解析
	单体型检测结果	测序深度	读出碱基及比例(%)		
D501	正常	26	C(84.62)G(15.38)	CC	可移植胚胎
D502	致病	37	C(13.51)T(86.49)	CT	不可移植胚胎
D503	正常	25	C(92.00)G(8.00)	CC	可移植胚胎
D601	致病	18	C(61.11)G(5.56)T(33.33)	CT	不可移植胚胎
D601	正常	29	C(89.66)G(10.34)	CC	可移植胚胎

表 4 胚胎单倍型连锁分析结果

Table 4 results of haplotype linkage analysis

位置	女方		男方		D501		D502		D506		D601		D602	
	M1	M2	F1	F2	M1	F2	M2	F1	M1	F2	M2	F1	M2	F2
chr15:47724040	G	A	G	G	G	G	A	G	G	G	A	G	A	G
chr15:47850326	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
chr15:48024922	A	A	G	A	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
chr15:48049776	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
chr15:48146976	G	G	G	A	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A
chr15:48310341	G	A	G	G	G	G	A	G	G	G	A	G	A	G
chr15:48540199	C	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
chr15:48608083	G	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A	G	A	G
chr15:48755168	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
chr15:48779402	C	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
chr15:48797146	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	T	C
chr15:48797307	A	A	G	A	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
chr15:48797424	C	C	A	C	C	C	C	A	C	C	C	A	C	C
chr15:48813107	G	G	T	G	G	G	G	T	G	G	G	T	G	G
chr15:48905206	C	C	T	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
chr15:48967277	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G
chr15:49017024	G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	A	A
chr15:49043989	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C
chr15:49174320	A	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G	G	G	G
chr15:49196237	G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	A	A
chr15:49221825	A	A	T	A	A	A	A	T	A	A	A	T	A	A
chr15:49416746	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
chr15:49518593	T	T	A	T	T	T	T	A	T	T	T	A	T	T
chr15:49607852	T	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	T
chr15:49734634	T	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T	C	T

注:M1、M2为女方正常;F2为男方正常;F1为男方致病。

2.5 等位基因脱扣率(allele drop-out, ADO)分析

五个活检胚胎的致病突变位点(chr15:48905206)没有发生脱扣。统计五个活检胚胎的致病突变位点和 47 个 SNP 位点的脱扣等位基因数,得出复合 ADO 率为 11.25%。

2.6 胚胎移植及产前诊断

选择遗传学检测正常且发育良好的胚胎(D501)在患者妻子的第3个月经周期行囊胚解冻移植。移植后 14 d 检测外周血 hCG 为 1 044 mIU/mL;移植后 40 d 经阴道超声见单个孕囊,孕囊大小约

18 mm~13 mm, 胚芽长约 4 mm, 可见心血管搏动。孕 19 周经羊膜腔穿刺进行产前诊断证实为健康胎儿。孕 40 周剖宫产分娩一正常男婴, 体重 3 100 g, 健康状况良好。

3 讨论

MFS 具有高度表型异质性, 不同家系患者有不同器官、不同程度的损害, 甚至同一家系中不同患者也可能有不同器官、不同程度的损害^[9]。*FBNI* 基因定位于 15q21.1, 全长 235 kb, 含 65 个外显子, 编码序列为 10 kb^[10]。产前诊断是预防单基因遗传患儿出生的主要手段。以羊膜腔穿刺术为主要的传统产前诊断技术不但具有有创性, 还具有一定的导致孕妇流产的风险。经产前诊断后确诊胎儿为 MFS 后, 孕妇需要终止妊娠, 对孕妇本人及其家庭也造成一定的生理和心理负担。PGD 指的是从体外受精第 3 日的卵裂球取 1~2 个细胞或第 5、6 日的囊胚取 5~10 个外滋养层细胞, 进行遗传学分析后, 选择正常胚胎移植母体子宫, 避免异常胚胎妊娠的发生, 从源头避免遗传性缺陷胚胎的种植。把产前诊断推进到孕前诊断, 将遗传病的预防提前到胚胎阶段, 与传统的产前诊断具有明显的优势, 避免可能的治疗引产给母体带来生理和心理的创伤^[11-12]。

1996 年, Harton GL 等人通过巢式 PCR 技术对 Marfan 进行了第一次植入前基因检测治疗^[13]。随着基于等温多重置换技术的全基因组扩增 (Whole genome amplification, WGA) 技术的发明^[14], 克服了单细胞水平基因检测 DNA 模板量过少的问题, 极大地提高了检测结果的准确性以及单细胞分析的可靠度。2006 年, Belén L 等研究者评价了 MDA-PGD 在 Marfan 中的应用^[15]。以上研究均需要对单个特定基因的特定变异位点进行设计和优化后检测, 是耗时耗力的工作。NGS 技术的发明, 实现了一次性对上百万条 DNA 进行测序, 缩短了耗费时间, 遗传性疾病的诊断率和分辨率迈入新的高度, 给 PGD 技术带来了革命性的改变。患者 (II : 2) 携带 *FBNI* 基因 1 个剪切位点突变 c.247+1G>A, 为杂合子, 已有该突变位点在数据库中有疾病相关性报道^[16]。明确致病突变位点后, 采用 NGS 对突变位点的直接测序和致病基因连锁 SNP 位点连锁分析进行 PGD。以 *FBNI* 基因编码区及外显子-内含子交界为目标区域, 在该基

因上下游 2M 区域内选择 100 个高密度紧密连锁的 SNP 作为遗传连锁标记, 可很大程度上减少因重组导致的检测不完全。该 Marfan 家系中患者父母 (I : 1, I : 2) 及患者妻子 (II : 1) 均未检出突变, 该突变为患者新发致病突变, 不能通过分析患者父母的单倍型确定携带致病突变的风险染色体。因此该家系要尽量多送检胚胎, 通过结合胚胎的该突变 NGS 结果和 Sanger 测序结果以及胚胎的单体型才能确定携带致病突变的风险染色体。通过致病基因连锁 SNP 位点连锁分析和突变位点的直接测序结果提高 PGD 结果的准确性。由于胚胎活检所得细胞数很少, 必须进行 WGA, 而 WGA 会增加检测结果扩增不均匀或等位基因脱扣的风险。WGA 是 NGS 在 PGD 和植入前遗传学筛查 (preimplantation genetic screenin, PGS) 临床应用的关键一步, 其高度均一性和保真度是 PGD 和 PGS 结果准确的必要条件。NGS 具有高通量、高并行性和高分辨率等特性, 可以提供高深度的多位点多基因分析, 结合致病基因连锁 SNP 位点, 可以避免由 ADO 带来的检测错误^[17]。

参考文献

- [1] Dean JCS, Loeys B. Marfan Syndrome and Related Disorders [M]//KUMAR D, ELLIOTT P. Cardiovascular Genetics and Genomics: Principles and Clinical Practice. Cham; Springer International Publishing, 2018: 589-615.
- [2] Ramirez F, DE BACKER J. Marfan Syndrome [M]//OHASHI T, TSUKAHARA H, RAMIREZ F, et al. Human Pathobiochemistry: From Clinical Studies to Molecular Mechanisms. Singapore; Springer Singapore, 2019: 241-54.
- [3] 王洪利, 侯森, 王波, 等. *FBNI* 基因新发突变致马凡综合征 1 例报告并文献复习 [J]. 临床儿科杂志, 2019, 37 (7): 541-544.
- [4] 杨岚, 郭小新, 蒋琳鑫, 等. 两个马凡综合征家系的 *FBNI* 基因突变分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36 (6): 566-5670.
- [5] 畅荣妮, 谭建强, 潘莉珍, 等. 应用高通量测序技术检测一疑似马凡综合征家系 [J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 27 (4): 463-464.
- [6] 辛国祥, 赵军, 赵友财. 一个马凡综合征家系 *FBNI* 基因突变筛查 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (27): 28-31.
- [7] Pyeritz RE. Marfan Syndrome [M]. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2013: 310-311.
- [8] 朱洁茹, 欧建平, 朱伟杰. 基因测序在胚胎植入前遗传学诊断应用的研究进展 [J]. 生殖与避孕, 2016, 36 (8): 666-671.

- [9] 初歌今, 张清炯, 郭向明. 马凡综合征的临床诊断与分子生物学研究进展 [J]. 中国实用眼科杂志, 2002, 20(4): 245-249.
- [10] 蒋琳鑫, 张丁丁, 肖迎, 等. 一例马凡综合征患儿 FBN1 基因的突变分析 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2018, 35(3): 414-417.
- [11] 陈大蔚, 章志国, 郝燕, 等. 成骨发育不全家系遗传学分析及植入前遗传学诊断研究 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(4): 433-438.
- [12] 李荣, 毕博文, 沈晓婷, 等. 软骨发育不全植入前遗传学诊断的方法学研究 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014, (6): 372-7.
- [13] Harton GL, Tsipouras P, Sisson ME, et al. Preimplantation genetic testing for Marfan syndrome [J]. Mol human rep, 1996, 2(9): 713-715.
- [14] Paez JG, Lin M, Beroukhi R, et al. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification [J]. Nucleic acids research, 2004, 32(9): e71.
- [15] Lledo B, Ten J, Galan FM, et al. Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification [J]. Fertil Steril, 2006, 86(4): 949-55.
- [16] Dietz HC, Mcintosh I, Sakai LY, et al. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome [J]. Genomics, 1993, 17(2): 468-4675.
- [17] 谢美娟, 杨学习, 李明. 下一代测序技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(5): 353-357.

(上接第 994 页)

审批注册, 并经卫生计生行政部门批准方可应用。为完成基于第二代测序技术的胎儿染色体非整倍体(T13/T18/T21)检测试剂盒的注册检验工作, 中检院研制高通量测序用外周血胎儿染色体非整倍体(T21、T18 和 T13)国家参考品。2018 年中检院负责制定胎儿染色体非整倍体 21 三体、18 三体和 13 三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准。人群中胎儿 DNA 浓度分布的统计结果表明有接近一半样本中胎儿 DNA 浓度大于 10%, 超过 96% 样本中胎儿 DNA 浓度高于 4%, NIPT 协议建议使用 4% 作为较低的胎源 DNA 含量临界值^[9]。标准的检测限要求胎儿 DNA 浓度 5% 的阳性参考品必须检出, 同时要求胎儿 DNA 浓度 3.5% 的阳性参考品必须有 50% 以上的检出比例。为了模拟胎儿嵌合体异常情况, 在国家参考品中设置嵌合比例分别为 70% 和 30% 的 T21、T18 和 T13 嵌合体参考品, 标准要求 70% 嵌合体参考品必须检出。中检院采用不同测序平台的试剂盒对国家参考品进行检验, 结果显示均符合行业标准的要求, 表明制定的胎儿染色体非整倍体 21 三体、18 三体和 13 三体检测试剂盒(高通量测序法)行业标准具有很好的适用性, 可以用于试剂盒的质量评价和上市后的监督管理工作。

参考文献

- [1] Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2017, 44(2): 245-256.
- [2] Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy [J]. Obstet Gynecol, 2016, 127(5): e123-37.
- [3] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. Lancet, 1997, 350(9076): 485-487.
- [4] Shaffer BL, Norton ME. Cell-free DNA screening for aneuploidy and microdeletion syndromes [J]. Obstet Gynecol Clin N Am, 2018, 45(1): 13-26.
- [5] 王元丽, 唐明珠, 杨学习. 11339 例孕妇无创产前检测结果对比分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 46(6): 363-366+406.
- [6] 侯桂玉, 郭跃文, 蒋丽江, 等. 超声 NT、血清学筛查与无创产前基因检测联合筛查高危孕妇胎儿染色体非整倍体 580 例分析 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(10): 21-23.
- [7] Palka C, Guanciali-Franchi P, Morizio E, et al. Non-invasive prenatal screening: A 20-year experience in Italy [J]. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol X. 2019, 3: 100050.
- [8] 罗艳梅, 胡华梅, 徐聚春, 等. 无创产前基因检测在胎儿染色体非整倍体筛查中的应用研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(6): 464-467.
- [9] Xu XP, Gan HY, Li FX, et al. A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection [J]. PLoS One, 2016; 11(1): e0146997.
- [1] Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Di-

胃癌根治术预后相关因素的研究

李立新¹ 蔡翠芳² 李文祥³ 石磊⁴ 蒲竞^{4*}

【摘要】 目的 研究 T-cadherin 分子表达对胃癌根治术后预后的预测价值。方法 选取 2016 年 1 月至 2017 年 1 月期间本院收治的 198 例胃癌患者为对象,根据术后临床情况分为预后良好组及预后不良组,分析患者临床疗效,采用多因素 Logistic 回归分析法分析胃癌根治术后预后不良的独立影响因素。结果 198 例胃癌患者中,有 67(33.84%)例预后不良,131(66.16%)例预后良好。单因素分析结果显示,胃癌根治术后预后不良与肿瘤大小、Borrmann 分型、T-cadherin 表达有明显相关性,肿瘤大小>5 cm、Borrmann 分型 I~II 型、T-cadherin 表达<50%患者预后更差($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,肿瘤大小、Borrmann 分型、T-cadherin 表达是胃癌根治术后预后不良的独立危险因素($P<0.05$)。结论 肿瘤大小>5 cm、Borrmann 分型 I~II、T-cadherin 表达 $\leq 50.00\%$ 是胃癌根治术后不良预后的危险因素,需引起临床重视。

【关键词】 T-cadherin 分子;胃癌根治术;预后;Borrmann 分型

The value of T-cadherin expression in predicting the prognosis of gastric cancer after radical operation

LI Lixin¹, CAI Cuifang², LI Wenxiang³, SHI Lei⁴, PU Jing^{4*}

(1. Department of Oncology, Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu, China, 730046; 2. Department of Neurourology, Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu, China, 730046; 3. Lanzhou Second People's Medical Oncology Surgery, Lanzhou, Gansu, China, 730046; 4. Department of General Surgery, Lanzhou Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu, China, 730046)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the prognostic value of T-cadherin expression in patients with gastric cancer after radical operation. Method 198 patients with gastric cancer admitted to our hospital from January 2016 to January 2017 were selected as the objects. According to the prognosis, they were divided into two groups: the group with good prognosis and the group with poor prognosis. The general data of the patients were collected, and the prognosis of the patients after radical gastrectomy was analyzed. The independent influencing factors of poor prognosis were analyzed by multivariate logistic regression analysis. Result Among 198 patients with gastric cancer, 67 had a poor prognosis, accounting for 33.84%. 131 cases had a good prognosis, accounting for 66.16%. The results of univariate analysis showed that the poor prognosis after radical gastric cancer was significantly correlated with tumor size, Borrmann classification, and T-cadherin expression. Tumor size was greater than 5 cm, Borrmann classification I to II, and T-cadherin expression <50% of patients, the prognosis is worse ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that tumor size,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81970542)

作者单位:1. 兰州市第二人民医院肿瘤外科,甘肃,兰州 730046

2. 兰州市第二人民医院神经泌尿外科,甘肃,兰州 730046

3. 兰州市第二人民医院肿瘤外科,甘肃,兰州 730046

4. 兰州市第二人民医院普外科,甘肃,兰州 730046

*通信作者:蒲竞, E-mail:shitong3036@163.com

Borrmann classification, T-cadherin expression is an independent risk factor for poor prognosis after radical gastric cancer ($P < 0.05$). **Conclusion** Tumor size > 5 cm, Borrmann type I ~ II and T-cadherin expression $\leq 50.00\%$ are risk factors of poor prognosis after radical gastrectomy, which requires clinical attention.

[KEY WORDS] T-cadherin molecule; Radical gastrectomy for gastric cancer; prognosis; Borrmann typing

胃癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,其发病率居消化道肿瘤之首,病因较为复杂,主要与地域环境、生活饮食、癌前病变、基因遗传等因素有关^[1-2]。胃癌不仅给患者消化系统带来损伤,还可能发生转移,危及患者肝肾及呼吸功能,具有较高的致死率^[3-4]。目前临床上胃癌主要通过X线钡餐检查、纤维胃镜检查等进行诊断,可采用手术、化疗、靶向治疗等方式进行治疗。据报道,大多数胃癌患者确诊时都已处于进展期,早期胃癌仅占1.5%~4.7%,故胃癌根治术在临床应用广泛^[5]。以往报道显示,胃癌根治术后预后情况受多种因素的影响,且影响较大,因此对相关因素进行观察研究,对改善胃癌根治术后预后情况研究意义重大^[6]。基于此,本实验将对影响胃癌根治术后预后情况的有关因素进行研究,旨在为临床改善胃癌根治术后预后情况提供参考,研究结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2016年1月至2017年1月期间本院收治的198例胃癌患者为对象,根据预后情况分为预后良好及预后不良组。198例患者中,男性100例,女性98例;年龄为32~81岁,平均 (41.34 ± 6.34) 岁;体质指数(body mass index, BMI) 21~24 kg/m²,平均 (22.14 ± 2.31) kg/m²;早期胃癌34例,进展期胃癌164例;肿瘤部位:胃近侧部胃癌43例,胃中部胃癌68例,胃远侧部胃癌87例;纳入标准:①经X线钡餐、胃镜、腹部B超、血常规、便常规或胃液分析等诊断为胃部恶性肿瘤;②患者及其家属临床资料完整;③患者及家属均已签署知情同意书。排除标准:①合并先天性心脏病、病毒性心肌炎、甲状腺功能亢进、心肌病等疾病患者;②伴有其他恶性肿瘤患者;③合并严重免疫系统及血液系统疾病患者;④术中见肿瘤腹腔播散或是远处转移;⑤失语及严重认知障碍者;⑥麻醉药不耐受患者;⑦失访或资料不全者。

1.2 方法

统计患者一般资料,包括性别、年龄、身高、BMI、吸烟史、贫血史、实验室指标等。采用Light-Speed16排螺旋CT机(兰州市第二人民医院)检测患者肿瘤大小、有无血管侵犯。根据肿瘤情况对胃癌进行Borrmann分型^[7]:①I型,肿瘤呈息肉状,向胃腔凸陷,生长存在局限性;②II型,肿瘤表面有较深的溃疡,边缘呈堤状隆起,界限分明;③III型,溃疡界限不清,肿瘤浸润性生长;④IV型,癌肿沿胃壁浸润性生长,胃壁变硬,胃腔缩小,称为革囊胃;其中I~II归为局限型,III~IV归为浸润型。western blot检测T-cadherin蛋白表达:根据试剂盒要求提取细胞总蛋白,加上样品缓冲液,混合后在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将电泳出现的蛋白电转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉将其封闭,并分比与抗T-cadherin、抗 β -actin多克隆抗体进行孵育,再与相应的抗体反应,采用化学发光法检测反应出现的阳性条带。用Gel-Pro分析软件对结果进行分析,计算T-cadherin分子与相应的光密度比值^[8]。免疫组织化学检测T-cadherin蛋白表达:取患者组织切片,经抗原修复后用石蜡包埋,并用血清封闭,再加入适量T-cadherin大鼠抗人多克隆抗体,在4℃环境中静置一夜。第2日采用PBS清洗清洗干净,滴加生物素标记的二抗及链霉菌生物素-过氧化物酶,苏木精复染,DAB显色,二甲苯透明,梯度酒精脱水,中性树脂封片;免疫组化切片经由两位及以上的病理学专家进行评估;选用PBS代替一抗作为阴性对照,正置显微镜,每张切片随机挑选5个视野进行拍照,计数100~200个细胞,T-cadherin的表达水平由染色强度与染色面积对应数值的乘积表示,表达率 $\leq 50.00\%$ 表示低表达,表达率 $> 50\%$ 表示高表达^[9]。

1.3 观察指标

观察胃癌根治术后预后情况,统计患者手术前一般资料(包括肿瘤大小、Borrmann分型、血管侵犯、T-cadherin表达等),采用多因素Logistic回归分析法分析胃癌根治术后预后不良的独立影响因素。预后判断:对行胃癌根治术患者进行3年随

访,3年内患者死亡或经X线钡餐检查、纤维胃镜检查、腹部B超、肿瘤标记物、血常规检查、便常规检查或胃液分析等复查,出现癌细胞扩散或转移等复发现象,纳为预后不良;3年内患者生存并未出现复发情况,纳为预后良好。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理上述数据,计数资料以n(%)表示,组间行 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间行t值检验;采用多因素Logistic回归分析法分析胃癌根治术后预后不良的独立影响因素。 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌根治术后预后情况分析

198例胃癌患者中,其中有67例发生预后情况不良,占33.84%,纳为预后不良组;131例预后良好,占66.16%,纳为预后良好组。

2.2 影响胃癌根治术后预后不良的单因素分析

单因素分析结果显示,胃癌根治术后预后不良与肿瘤大小、Borrmann分型、T-cadherin表达有明显相关性,肿瘤大小 >5 cm、Borrmann分型I~II型、T-cadherin表达 $<50.00\%$ 患者预后更差($P<0.05$),见表1。

表1 影响胃癌根治术后预后不良的单因素分析

[n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

Table 1 Single factor analysis of poor prognosis after radical gastrectomy for gastric cancer

[n(%), ($\bar{x}\pm s$)]

指标	预后不良组 (n=67)	预后良好组 (n=131)	t/ χ^2 值	P值
性别			0.558	0.455
男	37(55.22)	65(49.62)		
女	30(44.78)	66(50.38)		
年龄(岁)	42.37 \pm 6.31	44.21 \pm 7.28	1.130	0.263
身高(cm)	173.21 \pm 10.37	169.89 \pm 9.99	1.364	0.177
BMI(kg/m ²)	21.97 \pm 2.31	22.84 \pm 2.46	1.525	0.132
吸烟史	13(19.40)	31(23.67)	0.466	0.495
饮酒史	14(20.90)	33(25.19)	0.452	0.501
肿瘤大小(cm)			7.115	0.008
>5	48(71.64)	68(51.91)		
\leq 5	19(28.36)	63(48.09)		
Borrmann分型			6.523	0.011
I~II	46(68.66)	65(49.62)		
III~IV	21(31.34)	66(50.38)		
血管侵犯			0.317	0.574
有	34(50.75)	72(54.96)		
无	33(49.25)	59(45.04)		
T-cadherin表达(%)			5.625	0.018
\geq 50.00	19(28.36)	60(45.80)		
\leq 50.00	48(71.64)	71(54.20)		

2.3 影响胃癌根治术后预后不良的多因素 Logistic 回归分析

将胃癌根治术后预后不良作为因变量,将患者肿瘤大小、Borrmann分型、T-cadherin表达作为自变量,纳入Logistic回归分析模型,并量化赋值,见表2。结果显示,肿瘤大小、Borrmann分型、T-cadherin表达是胃癌根治术后预后不良的独立危险因素($P<0.05$),见表3。

表2 量化赋值表

Table 2 Quantitative assignment table

因素	量化赋值
肿瘤大小	X1 ≤ 5 cm=0, >5 cm=1
Borrmann分型	X2 III~IV=0, I~II=1
T-cadherin	X3 $\geq 50.00\%$ =0, $\leq 50.00\%$ =1
预后不良	Y 预后良好=0, 预后不良=1

表3 影响胃癌根治术后预后不良的多因素 Logistic 回归分析

Table 3 Multivariate logistic regression analysis of poor prognosis after radical gastrectomy for gastric cancer

变量	β 值	S.E值	Wald值	OR值	95%CI	P值
肿瘤大小	0.293	0.095	9.512	1.341	1.113~1.616	0.002
Borrmann分型	0.387	0.110	12.378	1.472	1.187~1.825	0.000
T-cadherin	0.334	0.100	11.156	1.397	1.148~1.700	0.000

3 讨论

胃癌作为一种具有高发病率、高致死率的恶性肿瘤,其发生受多因素的影响,如年龄、环境、饮食习惯、基因等^[10]。临床研究认为,胃癌根治手术对胃部肿瘤具有良好的治疗效果,该手术通过对原发肿瘤、转移淋巴结及受累浸润的组织进行切除的方式,达到治愈胃癌的目的,但该术存在对患者创伤大、预后较差等缺点,因此,如何改善胃癌根治术后预后情况逐渐成为临床关注的重点^[11]。有研究表明T-cadherin是一种特殊的细胞间黏附分子,可通过多种途径包括SET7/9-p53和AKt通路抑制肿瘤细胞的扩散和增殖以及血管生成,对癌症的治疗意义重大^[12]。

本研究结果显示,肿瘤大小是胃癌根治术后预后不良的独立危险因素,与既往报道^[17]相符。韩文秀等^[13]认为,肿瘤大小与胃癌根治术后预后情况有明显相关性。分析原因,肿瘤直径增加,增大了肿瘤与淋巴管的接触面积,使得肿瘤通过淋

巴管向病灶远处转移的几率增大,术后复发几率增大,预后较差;同时肿瘤增大易导致侵犯血管、胃壁神经,增大血管转移的几率,为肿瘤的转移提供新途径,导致预后更差;此外,肿瘤越大,患者手术过程中需切除的部位越多,患者术中创伤大,术后炎症反应增强,可诱发一系列的并发症,预后较差,故而肿瘤大小与胃癌根治术后预后不良关系密切。本研究结果还显示 Borrmann 分型与胃癌根治术后预后情况联系密切,鄢曹鑫等^[14]通过对 239 例患者进行观察研究,证实 Borrmann 分型对胃癌根治术后预后情况具有一定的预测作用。

T-cadherin 是一种特殊的黏附分子,其缺少经典黏附分子所具有的跨膜区,经糖基磷脂酰基醇分子附着与细胞膜上,细胞之间通过 T-cadherin 发生黏附,不易脱落,当 T-cadherin 表达下降时,细胞间粘附力降低,细胞转移速率增强。大量研究表明,T-cadherin 在机体发生如肝癌、胃癌、结直肠癌等恶性肿瘤时的表达会明显降低,重新表达 T-cadherin 的癌细胞其增殖特性受抑制,并且在某些特定的细胞肿瘤中,T-cadherin 高表达还能抑制由表皮生长因子诱导的细胞生长和侵袭性反应,进一步说明 T-cadherin 的表达与肿瘤的发展转移呈负相关^[15]。因此,在胃癌患者行胃癌根治术后,其体内 T-cadherin 表达越低,癌细胞转移率越大,患者复发率越高,预后越差,故而 T-cadherin 分子表达对胃癌根治术后预后具有一定的预测价值。

综上,肿瘤大小、Borrmann 分型、T-cadherin 分子表达对胃癌根治术后预后情况具有一定的预测作用,临床应对其密切关注。

参考文献

- [1] 刘涛,李睿,龚琳,等.胃幽门螺杆菌感染后 Semaphorin 5A 致胃癌可能机制的研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):189-193.
- [2] 吴芳华,龚超,陈魁,等.不同 Lauren 分型晚期胃癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J].消化肿瘤杂志(电子版),2019,11(3):212-218.
- [3] 魏铨沛,李霓,王刚,等.身体测量指标与胃癌发病风险的流行病学研究进展[J].中华流行病学杂志,2019,40(11):1481-1486.
- [4] Zhang M, Du X. Noncoding RNAs in gastric cancer: Research progress and prospects [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(29):6610-6618.
- [5] Lin JX, Huang CM, Zheng CH, et al. Is all advanced gastric cancer suitable for laparoscopy - assisted gastrectomy with extended lymphadenectomy a case-control study using a propensity score method[J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23(4):1252-1260.
- [6] 尚琳,李博斐,贺奋飞,等.脉管侵犯对 I 期胃癌根治术后患者预后的影响[J].中华胃肠外科杂志,2018,21(2):175-179.
- [7] 申屠伟慧,黄品同,鄢曹鑫,等.超声双重造影与多层螺旋 CT 对进展期胃癌 Borrmann 分型诊断价值的比较[J].中华超声影像学杂志,2015,24(1):44-49.
- [8] 任明强,谭天海,苏俊.T-cadherin 蛋白与基因在混合细胞型霍奇金淋巴瘤中表达和临床意义[J].重庆医学,2015,44(33):4647-4650.
- [9] 韦斌,史海涛.T-cadherin 在胃癌组织中的表达及临床意义[J].陕西医学杂志,2018,47(7):9-12.
- [10] 汪必成,向远航,王杰,等.钙结合蛋白 S100A2 在胃癌组织的表达及其与启动子甲基化的关系[J].中华实验外科杂志,2018,35(1):136-137.
- [11] 樊晓静.老年胃癌根治术后胰岛素样生长因子-I 及其受体、胰岛素样生长因子-II 水平变化及与预后的关系[J].中国老年学,2017,37(011):2724-2726.
- [12] 魏秋亚,樊勇,刘永永,等.纳米炭示踪技术在腹腔镜进展期胃癌根治术中的临床应用[J].中国微创外科杂志,2016,16(12):1113-1116.
- [13] 韩文秀,徐阿曼,张理想,等.胃癌患者术前中性粒细胞与淋巴细胞比与临床病理特征及预后关系[J].中国普通外科杂志,2016,25(10):1397-1401.
- [14] 鄢曹鑫,黄品同,申屠伟慧,等.超声双重造影与多层螺旋 CT 对胃癌术前大体分型诊断价值的比较[J].中华普通外科杂志,2018,33(1):20-24.
- [15] 王萍.T-cadherin 蛋白在急性早幼粒细胞白血病中表达及其临床意义[J].重庆医科大学学报,2019,44(2):152-156.

E6 流式细胞仪检测 CD34⁺细胞百分比和绝对计数方法的建立

付笑迎¹ 张小玲² 刘梦桐³ 余阅² 陈诗杨¹ 彭冬¹ 邝雅贤¹ 刘四喜² 陈运生^{1*}

[摘要] 目的 应用 E6 流式细胞仪建立检测 CD34⁺细胞百分比和绝对计数的方法并进行验证。方法 收集 2019 年 1 月至 2019 年 12 月在深圳市儿童医院血液肿瘤科因重型 β-地中海贫血行异基因造血干细胞移植的患儿 89 例,以移植患儿供的骨髓或外周血为研究对象,应用 E6 流式细胞仪建立 ISHAGE 法检测 CD34⁺细胞百分比,应用“流式直接体积法”计算 CD34⁺细胞的绝对计数,并结合白细胞手工计数对 CD34⁺细胞绝对计数的结果进行验证。结果 结合白细胞手工计数对 CD34⁺细胞的绝对计数结果的正确性进行验证, Pearson 相关分析结果显示:供者外周血干细胞或骨髓干细胞 CD34⁺细胞绝对计数流式结果与 CD34⁺细胞绝对计数计算结果高度相关($r=0.93, R^2=0.87, P<0.0001$);两次供者外周血干细胞或骨髓干细胞白细胞计数和单个核百分比结果高度一致;同样,两次供者外周血干细胞或骨髓干细胞 CD34⁺细胞流式计数百分比和绝对计数结果亦高度一致。结论 应用 E6 流式细胞仪的“流式直接体积法”计算 CD34⁺细胞绝对计数结果准确,可以作为造血干细胞移植术前计算供者外周血干细胞或骨髓干细胞 CD34⁺细胞数目的可靠依据。

[关键词] 异基因造血干细胞移植; CD34⁺细胞; 流式细胞术; 绝对计数

Establishment the protocol of CD34⁺ cell percentage and absolute counting by E6 flow cytometer

FU Xiaoying¹, ZHANG Xiaoling², LIU Mengtong³, YU Yue², CHEN Shiyang¹, PENG Dong¹, KUANG Yaxian¹, LIU Sixi², CHEN Yunsheng^{1*}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518038; 2. Department of Hematology and Oncology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China, 518038; 3. Medical College of Jiaying University, Meizhou, Guangdong, China, 514031)

[ABSTRACT] Objective To establish and verify the method for detecting the percentage and absolute count of CD34⁺ cells by E6 flow cytometer. Methods A total of 89 children who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sever β-thalassemia in the Department of Hematology and Oncology of Shenzhen Children's Hospital from January 2019 to December 2019 were collected, taking bone marrow or peripheral blood from transplanted donor as the research object, the ISHAGE method was established with the E6 flow cytometer for the percentage of CD34⁺ cells. The absolute count of CD34⁺ cells was calculated by “flow direct volume method”, and validated the result of the absolute count of CD34⁺ cells with the manual count of white blood cells. Results The correctness of the absolute count of CD34⁺ cells was validated by combining

基金项目:国家自然科学基金(81801588);广东省医学科学技术研究基金项目(A2018329);深圳市三名工程项目(SZSM201512033);深圳小儿血液肿瘤分子医学公共服务平台项目

作者单位:1. 深圳市儿童医院检验科, 广东, 深圳 518038

2. 深圳市儿童医院血液肿瘤科, 广东, 深圳 518038

3. 广东嘉应学院医学院, 广东, 梅州 514031

*通信作者:陈运生, E-mail:chenyunshen66@163.com

the manual count of white blood cells. The Pearson correlation analysis showed that the absolute count of CD34⁺ cells in donor peripheral blood stem cells or bone marrow stem cells was highly correlated with the calculated results of absolute CD34⁺ cell count ($r=0.93$, $R^2=0.87$, $P<0.0001$); the white blood cell count and mononuclear percentage results of the peripheral blood or bone marrow stem cells were highly consistent. Similarly, The percentage and absolute count results of CD34⁺ cells in the peripheral blood stem cells and bone marrow stem cells are also highly consistent. **Conclusion** The absolute counting results of CD34⁺ hematopoietic stem cells calculated by the "flow direct volume method" of the E6 flow cytometer are reliable, and can be used as a reliable basis for calculating the number of CD34⁺ cells in the transplant before hematopoietic stem cell transplantation.

[KEY WORDS] Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Allo-HSCT; CD34⁺ cells; Flow Cytometry; Absolute Counting

近年来,异基因造血干细胞移植术(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)在临床广泛应用,是目前唯一可以临床治愈重型 β -地中海贫血的方法,而供者外周血或骨髓中造血干细胞的数量对移植是否成功至关重要^[1-4],精确的造血干细胞计数可以帮助计算移植中 CD34⁺细胞的数量,作为判断干细胞能否成功植入的有效指标^[1, 5, 6]。20世纪80年代,CD34分子被发现,CD34⁺细胞在正常骨髓单个核细胞中的比例约为1%~4%,在外周血中 CD34⁺细胞的比例一般小于0.1%,因而造成测定结果的重复性和准确性均较差。准确计数 CD34⁺细胞的数量,可判定动员方案是否成功,何时开始采集及时终止采集外周干,并可用于比较多个移植中心的疗效^[5]。1995年,血液病治疗及移植国际联合会成立了干细胞绝对计数小组, IHSAGE(International Society of Hematotherapy and Graft Engineering, ISHAGE, 国际血液治疗与移植工程学会方案)方案于1996年问世,;之后 BD公司在 ISHAGE 方案的基础上又增加了 DNA 的荧光染料,推出 ProCOUNT 方法^[6-8]。本实验室通过对应用迈瑞 BriCyte E6 流式细胞仪建立检测 CD34⁺细胞百分比和绝对计数的方法并进行验证。

1 材料和方法

1.1 一般资料

收集 2019 年 1 月至 2019 年 12 月在深圳市儿童医院血液肿瘤科确诊为重型 β -地中海贫血并行异基因造血干细胞移植患儿共 89 例, HSCT 分为骨髓移植(Bone marrow transplantation, BMT)、外周血造血干细胞移植(Peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT)和脐血移植(Umbilical cord blood transplantation, UCBT),其中男性 50 例,女性 49 例,年龄 2~16 岁,7 例为无关相合供者

(MUD), 18 例为同胞相合供者(MSD), 64 例为单倍型供者(MID)。移植前全面检查患儿各重要脏器功能,患儿均无严重的基础疾病或重要脏器功能不全,患者及其家属充分知情并签署知情同意书,移植方案经医院伦理委员会批准。

1.2 供者外周血或骨髓干细胞动员

G-CSF(粒细胞集落刺激因子)为目前推荐使用的细胞因子,皮下或静脉注射,推荐剂量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$,可分 2 次或单次给药,连用 5 天。血细胞分离一般在动员的第 5 天进行,即使应用 G-CSF 动员,外周血干细胞数量在地贫供者中仍有较大的个体差异。目前中华骨髓库推荐的目标采集量为 MNC(单个核细胞)数 $>5\times 10^6/\text{kg}$ 且 CD34⁺细胞数 $>2\times 10^6/\text{kg}$,或根据方案确定目标细胞数^[9]。

1.3 流式细胞术测定 CD34⁺细胞百分比和绝对计数

1.3.1 标本采集

1 mL 注射器采集肝素抗凝骨髓混悬物或外周静脉血 1 mL,新鲜样本白细胞手工计数标本在 1 小时内进行样本处理;流式标本在 12 小时之内进行样本处理,样本标记前室温 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 保存,标记完后 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 免疫荧光染色

对照管:CD45-FITC(5 μL)/IgG1-PE(10 μL);测试管:CD45-FITC(5 μL)/CD34-PE(10 μL),流式抗体均来自中国同生时代。当白细胞计数 $5\times 10^9/\text{L}<N<50\times 10^9/\text{L}$ 时,无需稀释样本;当白细胞计数 $N>50\times 10^9/\text{L}$ 时,先将全血标本稀释 10 倍,对照管和测试管分别加入 100 μL 血样本;为保证加样量准确,采用反式加样法,充分混匀,室温避光孵育 15 分钟后,加入 1 \times 流式细胞分析用溶血剂(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)400 μL ,室温

避光孵育 15 min, 免洗, 即刻上机分析, 手动模式上样, 低速获取细胞, 收集单个核细胞 8 万个。处理后的样本信息在 BriCyte E6 流式细胞仪上使用客户端软件 MRFlow 进行分析。

1.4 统计学处理

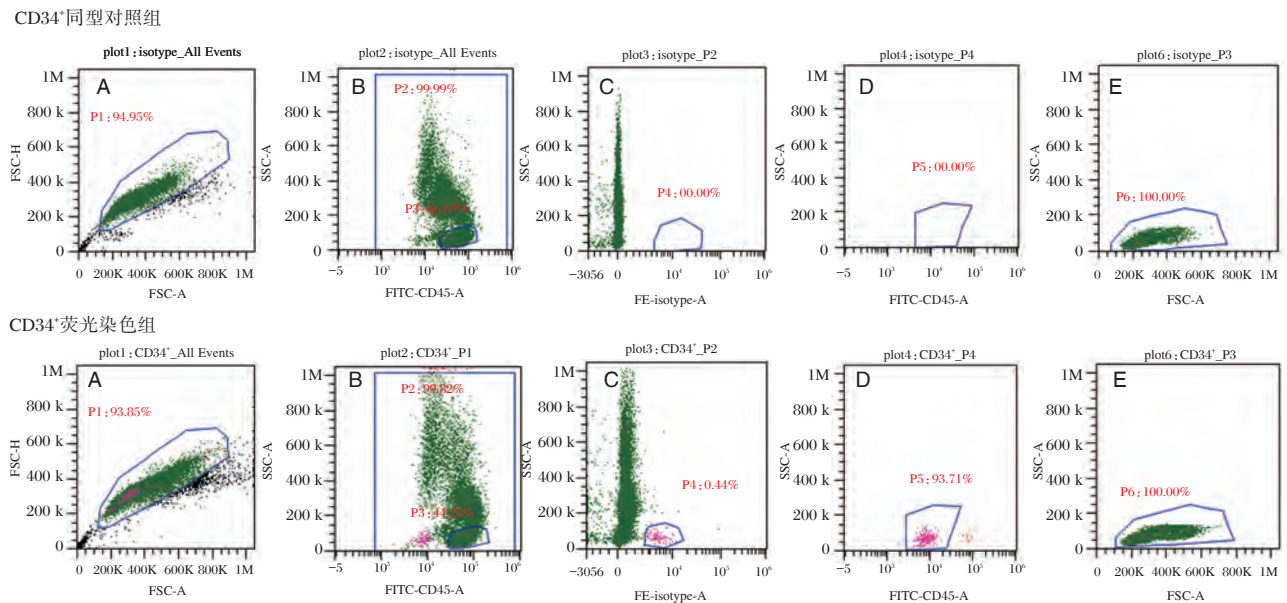
采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学处理, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 符合正态分布的两组之间比较采用 *t* 检验; 两个连续变量之间的相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 应用 E6 流式细胞仪设定 ISHAGE 法测定 CD34⁺ 细胞百分比和绝对计数的模版

共建立 5 个散点图, 按照 ISHAGE 进行逻辑设门, 最终计算出 CD34⁺ 细胞的百分比和绝对计数: CD34⁺ 细胞百分比为 0.38%, CD34⁺ 细胞绝对计数为 1633 个/μL。见图 1。



注: A 为 (X 轴) FSC-A / (Y 轴) FSC-H 散点图; B 为 (X 轴) CD45-FITC / (Y 轴) SSC-A; C 为 (X 轴) CD34-PE / (Y 轴) SSC-A 散点图; D 为 (X 轴) CD45-FITC / (Y 轴) SSC-A 散点图; E 为 (X 轴) FSC / (Y 轴) SSC 散点图。

图 1 ISHAGE 法模版计数 1 例移植患儿供者动员后的外周血标本

Figure 1 CD34⁺ cells counted by ISHAGE method by flow cytometry in a donor of transplantation

2.2 “流式直接体积法”计数 CD34⁺ 细胞绝对计数与双平台计算 CD34⁺ 细胞绝对计数相关性分析

经 Pearson 相关性分析显示, 第一次 CD34⁺ 细胞计数时, 两种方法的 Pearson 相关系数为 0.930 9, $R^2 = 0.87$, 95% CI 为 0.894 3~0.955 1, $P < 0.0001$, 显著相关; 第二次 CD34⁺ 细胞计数时, 两种方法的 Pearson 相关系数为 0.93, $R^2 = 0.86$, 95% CI 为 0.888 0~0.952 1, $P < 0.0001$, 亦显著相关。图 2。

2.3 两次外周血样本白细胞(WBC)手工计数和 CD34⁺ 细胞流式计数的相关性分析

两次手工计数白细胞的 Pearson 相关系数为 0.95, $R^2 = 0.90$, 95% CI 为 0.922 9~0.967 4, $P < 0.0001$;

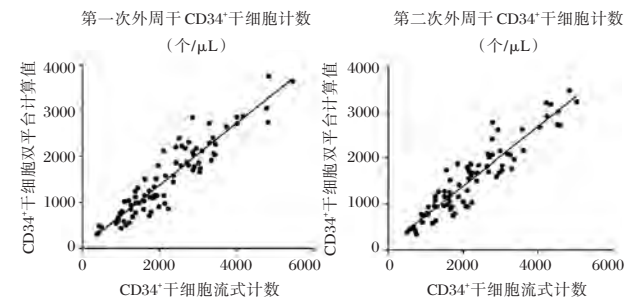


图 2 比较两种计数方式计数 CD34⁺ 细胞绝对计数的相关性
Figure 2 The correlation between the 2 counting methods to analyze the absolute count of CD34⁺ cells

两次手工计数单个核百分比 Pearson 相关系数为 0.97, $R^2 = 0.95$, 95% CI 为 0.961 9~0.984 1, 应用 Pearson 比较相关性, 两次手工计数的白细胞数和单个

核细胞百分比高度一致且相关,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。同时分析了两次 CD34⁺细胞流式计数的相关性,两次 CD34⁺细胞计数的百分比 Pearson 相关系数为 0.96, $R^2=0.92$, 95% CI 区间为 0.934 7~

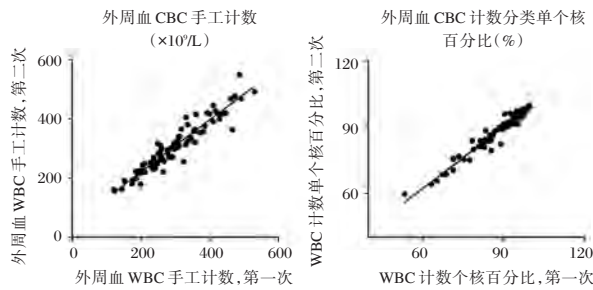


图3 两次外周血白细胞手工计数和分类的相关性

Figure 3 The correlation between two manual counts and phenotype of peripheral blood white blood cells

2.4 不同移植方式时 CD34⁺造血干细胞百分比和绝对计数的比较分析

骨髓中亲缘全相合组 CD34⁺造血干细胞的百分比高于单倍体组 ($P<0.05$);外周干的 CD34⁺造血干细胞计数显示,亲缘全相合组的 CD34⁺造血

0.972 5, $P<0.000 1$;两次 CD34⁺细胞绝对计数的 Pearson 相关系数为 0.91, $R^2=0.83$, 95% CI 区间为 0.866 1~0.942 3,亦高度相关并一致,差异有统计学意义 ($P<0.005$)见图 3,4。

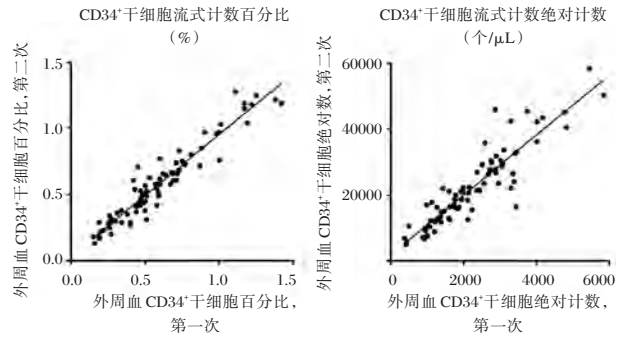


图4 两次外周血流式计数 CD34⁺细胞的相关性

Figure 4 The correlation between two peripheral blood flow cytometry counts of CD34⁺ cells

干细胞的百分比和绝对计数均高于单倍体组,外周血采集物中 CD34⁺造血干细胞百分比及绝对计数由高到低的排列为非亲缘全相合组>单倍体组>亲缘全相合组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 流式细胞术计数骨髓及外周血中 CD34⁺造血干细胞 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 CD34⁺ hematopoietic stem cells counting in bone marrow and peripheral blood by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$)

	骨髓		外周干, 第一次		外周干, 第二次	
	百分比 (%)	绝对计数 (个/ μ L)	百分比 (%)	绝对计数 (个/ μ L)	百分比 (%)	绝对计数 (个/ μ L)
非亲缘全相合组			0.71 \pm 0.37	3197 \pm 1153		
亲缘全相合组	0.39 \pm 0.21 ^a	121 \pm 52	0.45 \pm 0.20 ^a	1710 \pm 647 ^a	0.46 \pm 0.21 ^a	1661 \pm 608 ^a
单倍体组	0.22 \pm 0.11	98 \pm 56	0.63 \pm 0.31	2375 \pm 1208	0.61 \pm 0.30	2373 \pm 1203

注:亲缘全相合组&单倍体组:^a $P<0.05$ 。

3 讨论

外周血造血干细胞移植近年来已经被广泛应用开展,正常外周血中造血干细胞浓度很低,应用 G-CSF 进行外周血干细胞动员后,外周血造血前体细胞浓度显著增加,但这种情况维持时间短暂,故准确计数 CD34⁺细胞的数量,可判定动员方案是否成功,何时开始采集及何时终止采集外周干^[10-11]。用流式细胞术计数脐带血,外周血及骨髓等样本中 CD34⁺细胞的方法已被普遍采用。然而,不同实验方法之间计数 CD34⁺细胞的百分比和绝对计数的方法存在效大的变异性,由于 CD34⁺细胞在骨髓,脐带血或被动员后的外周血中含量很低,

而造成测定重复性和准确性均很差,如何准确地计数 CD34⁺细胞的绝对计数,是本实验室关注的关键性问题^[12-14]。

影响流式计数 CD34⁺细胞结果的主要因素包括:①标本制备过程是否分离 PBMCs 和洗涤细胞:进行 PBMCs 分离及进行洗涤均会丢失部分细胞,造成实验误差^[5]。因此本实验室建立的检测方法为全血标本检测,红细胞溶解剂溶血 15 min 后免洗,直接上机检测,整体流程仅需 1 小时左右,即可得到 CD34⁺细胞的百分比和绝对计数结果,及时为临床干细胞采集提供干细胞计算依据。②CD34⁺抗体荧光的选择:由于藻红蛋白(phycoerythrin, PE)的发射光强,发射光峰值在 580 nm 与

细胞的自发荧光相互干扰小,因此本方案中采用PE标记CD34, FITC标记CD45,并应用BriCyte C6流式细胞仪的自动荧光补偿调节荧光补偿。③数据获取及分析方案:不同的方案获取细胞数不同,一般来说,收集细胞数目越多,结果越准确,本方案采用低速收集8万个单个核细胞,分析方案采用1994年由Sutherland等提出的ISHAG方案,使用CD34-PE, CD45-FITC, SSC和FSC 4个参数,其中CD45主要表达于白细胞表面,在不成熟的造血干细胞表达强度较弱,且不表达于血小板,红细胞和细胞碎片,因此利用CD45设门可以去掉血小板、红细胞和碎片的干扰^[6]。迈瑞BriCyte E6流式细胞仪提供全方位多角度智能化自动软件,可以直接测量样本体积,因此无需在样本中额外添加参比的荧光微球,即可获得样本中细胞的绝对计数结果,本实验应用“流式直接体积法”实现单平台同时检测CD34⁺细胞百分比和绝对计数。与经典的BD流式细胞仪的ProCOUNT方法相比,本实验方法更简便易行,实验成本更低^[15]。有研究显示,基于体积和基于参比微球的两种单平台测量方法,不仅在CD3⁺CD4⁺细胞检测上具有较高的相关系数和较低的偏差,而且在其他淋巴细胞亚群的检测上也体现了良好的一致性^[16]。现行的造血干细胞计数的另一种方法是Sysmex XN血液分析仪上的全自动干细胞(HPC)计数,但与本方法相比,其仪器设备及实验成本均较高^[17]。

综上所述,准确计数CD34⁺细胞的绝对计数对移植物的成功植入至关重要,“直接体积计算法”计数CD34⁺细胞绝对计数的方法操作简便,结果可信,且测试成本更低,对于改善国内基层医院及发展中国的诊疗水平具有重要意义。

参考文献

- [1] Zimmerman TM, Lee WJ, Bender G, et al. Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvests[J]. Bone Marrow Transplant, 1995, 15(3): 439-444.
- [2] 王丽, 王三斌, 方建培, 等. 造血干细胞移植治疗重型β地中海贫血儿科专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(12): 935-939.
- [3] 方建培, 尹晓林, 兰和魁, 等. 儿童非输血依赖型地中海贫血的诊治和管理专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(12): 929-934.
- [4] 田竑, 陈广华, 吴德沛. 间充质干细胞在造血干细胞移植术中应用的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(6): 415-419.
- [5] 刘艳荣, 陈珊珊, 于弘. 流式细胞术计数CD34阳性细胞的标准化和质量控制[J]. 中国实验血液学杂志, 2000(4): 302-306.
- [6] Sutherland D R, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering[J]. J Hematother, 1996, 5(3): 213-226.
- [7] McNiece I, Kern B, Zilm K, et al. Minimization of CD34⁺ cell enumeration variability using the ProCOUNT standardized methodology[J]. J Hematother, 1998, 7(6): 499-504.
- [8] Leuner S, Arland M, Kahl C, et al. Enumeration of CD34⁺ positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy[J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 22(7): 699-706.
- [9] 徐宏贵, 方建培. 造血干细胞移植治疗β地中海贫血[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(11): 818-822.
- [10] 宋文刚, 张明徽, 章卫平, 等. 动员外周血CD34阳性细胞流式细胞术测定中的策略探讨[J]. 中国实验血液学杂志, 2002(4): 347-350.
- [11] 北京市临床流式细胞分析协作组. 流式细胞术三色分析调查成年人外周血CD34⁺造血干细胞绝对计数参考范围[J]. 中华检验医学杂志, 2002(1): 57-59.
- [12] 戴宇东, 孙启俊, 张益红, 等. 3种流式细胞术计数脐血CD34⁺细胞方法的比较[J]. 临床检验杂志, 2002(3): 161-162.
- [13] Siftar Z, Paro MM, Sokolic I, et al. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important?[J]. Coll Antropol, 2010, 34(1): 207-217.
- [14] 万岁桂, 刘艳荣. CD34阳性细胞绝对计数的流式细胞术测定指南[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(7): 539-546.
- [15] 万岁桂, 苏力, 孙雪静, 等. ProCOUNT与单平台ISHAGE方法检测外周血及采集物中CD34⁺细胞绝对计数的比较[J]. 首都医科大学学报, 2006(04): 504-508.
- [16] 孙庆国, 赵文静, 匡玉吉, 等. BriCyte E6和FACSCanto II流式细胞仪在淋巴细胞亚群分析中的对比研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(7): 1196-1199.
- [17] Söderström A, Møller BK, Sørensen BS. Evaluation of the Sysmex XN automated hematopoietic progenitor cell enumeration for timing of peripheral blood stem cell harvest. Transfus Apher Sci, 2020, 59(2): 102683.

急性淋巴细胞白血病患者血清TK1及E-cadherin蛋白表达水平及意义

邢东文^{1*} 张余转¹ 林坚¹ 林鲁飞²

[摘要] 目的 探讨急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿血清胸苷激酶1(TK1)及E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达水平及意义。方法 选取本院2017年1月至2019年3月诊治的ALL患儿172例(观察组, $n=175$),同时选取健康儿童30例(对照组, $n=30$),检测血清TK1及E-cadherin水平,分析血清TK1及E-cadherin水平相关性及其与临床特征的关系。结果 观察组血清TK1水平高于对照组($P<0.05$),E-cadherin水平低于对照组($P<0.05$);不同年龄、不同性别、不同ALL类型血清TK1及E-cadherin水平无显著差异($P>0.05$),不同WBC水平及是否发生髓外浸润ALL的血清TK1及E-cadherin水平存在显著差异($P<0.05$),相关分析结果显示,ALL患儿TK1与E-cadherin水平呈现负相关($r=-0.401$, $P<0.05$),TK1水平与WBC呈现正相关($r=0.421$, $P<0.05$),E-cadherin水平与WBC呈现负相关($r=-0.505$, $P<0.05$)。结论 ALL患儿血清TK1高表达而E-cadherin低表达,并且与部分临床特征相关,对其检测有助于白细胞负荷和髓外浸润的评估。

[关键词] 急性淋巴白血病;胸苷激酶1;E-钙黏蛋白;白细胞计数;髓外浸润

Expression and significance of serum TK1 and E-cadherin in children with acute lymphoblastic leukemia

XING Dongwen^{1*}, ZHANG Yuzhuan¹, LIN Jian¹, LIN Lufei²

(1. Department of Pediatrics, Haikou Third People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 571199; 2. Department of Pediatrics, Haikou Fourth People's Hospital, Haikou, Hainan, China, 571199)

[ABSTRACT] Objective To investigate expression and significance of serum TK1 and E-cadherin in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Methods 172 children with ALL were selected in our hospital from Jan 2017 to Mar 2019 (the observation group, $n=175$) and 30 healthy children were selected (the control group, $n=30$). Serum level of TK1 and E-cadherin were measured, and the correlation between TK1 or E-cadherin with clinical characteristics was analyzed. Results The levels of TK1 and E-cadherin in serum were higher in the observation group than those in the control group ($P<0.05$), but no significant difference in different age, gender and ALL types ($P>0.05$). There are significant differences in serum TK1 and E-cadherin levels between different WBC levels and whether extramedullary infiltrating ALL occurs ($P<0.05$). Correlation analysis results show that TK1 and E-cadherin levels in ALL children are negatively correlated ($r=-0.401$, $P<0.05$). TK1 level was positively correlated with WBC count ($r=0.421$, $P<0.05$), E-cadherin level was negatively correlated with WBC count ($r=-0.505$, $P<0.05$). Conclusions The serum TK1 expression in children with ALL is high and E-cadherin expression is low, and it is related to some clinical features. The detection of TK1 and E-cadherin is helpful for the assessment of white blood cell load and extramedullary infiltration.

[KEY WORDS] Acute lymphoblastic leukemia; TK1; E-cadherin; White blood cell count; Extramedullary infiltration

基金项目:海南省自然科学基金项目(2018-8154283)

作者单位:1.海口市第三人民医院儿科,海南,海口 571199

2.海口市第四人民医院儿科,海南,海口 571199

*通信作者:邢东文, E-mail:89304882@qq.com

急性白血病(Acute leukemia, AL)是一种恶性疾病, AL通常可以分为急性淋巴细胞白血病(Acute lymphoblastic leukemia, ALL)和急性髓细胞白血病(Acute myeloid leukemia, AML)两类,其中以ALL为主^[1-2]。ALL患儿骨髓中细胞异常增殖,增殖后的细胞在骨髓中蓄积,影响机体正常的造血功能,这种现象还会进一步延伸至肝、肾、脾等脏器,出现贫血、出血、感染等症状。ALL若不及时地进行有效治疗,患者生存期平均在3个月左右,预后极差。ALL的发病与骨髓的异常增殖有关,胸苷激酶1(Thymidine kinase 1, TK1)能够反映细胞增殖的特征标记物,可用于检测体内细胞异常增殖速度^[3-4]。E-钙粘着蛋白(E-cadherin)是一种Ca²⁺依赖性糖蛋白,粘附在正常上皮细胞中。在上皮起源的肿瘤中,E-钙粘蛋白表达经常减少,这有助于肿瘤侵袭和转移^[5]。正常骨髓中,E-钙粘蛋白在红系祖细胞CD341的干细胞和基质细胞上表达,它可能促进相关细胞间的作用利于造血过程中^[6]。本文就ALL患儿血清TK1及E-cadherin表达的临床意义进行研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2019年3月在本院收治的ALL患儿172例(观察组, $n=172$),其中男97例,女75例,平均年龄(8.18±1.13)岁,平均体重(22.01±5.29)kg,其中未合并髓外浸润患儿102例,合并髓外浸润70例, WBC $17.4 \times 10^6 \sim 117.6 \times 10^6$, 平均(31.7±8.6)×10⁶,其中T-ALL 63例, B-ALL 109例。同时选取健康儿童30例作为对照组,其中男20例,女10例,平均年龄(8.02±1.01)岁,平均体重(21.86±6.10)kg。两组性别、年龄、体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

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

因素	观察组 ($n=172$)	对照组 ($n=30$)	t/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	79/75	20/10	3.559	0.059
年龄(岁)	8.18±1.13	8.02±1.01	1.331	0.184
体重(kg)	22.01±5.29	21.86±6.10	0.236	0.813

纳入标准:①诊断符合《血液病诊断及疗效标准》中的标准^[6];②年龄≤14岁;③均为初治患儿,未经化疗;④患儿监护人知情同意。排除标准:合

并有肝肾等重要脏器功能障碍、免疫系统疾病、先天畸形等其他疾病。

1.2 指标检测

采集空腹静脉血,每个受试者取2份,每份2 mL, 3 500 r/min离心5 min,分离血清于洁净的Eppendorf管中,标记好样本信息后置-80℃冰箱待测,采用ELISA法检测E-cadherin蛋白水平。每个样本设3个复孔。严格按照E-cadherin ELISA试剂盒(海西唐生物科技有限公司)说明书操作。TK1检测采用ELISA法,检测过程及检测仪器同E-Cadherin。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较使用 t 检验,计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验,相关性采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清TK1及E-cadherin水平比较

观察组血清LDH和TK1明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),而血浆E-cadherin水平明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 两组血清TK1及E-cadherin水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of TK1 and E-cadherin in serum in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TK1(pmol/L)	E-cadherin(ng/mL)
观察组	172	7.50±1.33	29.91±8.15
对照组	150	1.10±0.42	55.90±10.10
t 值		56.519	-25.537
P 值		0.000	0.000

2.2 不同临床特征ALL患儿血清TK1及E-cadherin水平比较

ALL患儿血清LDH和TK1明显高于AML患儿,差异有统计学意义($P<0.05$),而血浆E-cadherin水平明显低于AML患儿,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.3 ALL儿童血清LDH、TK1表达水平相互关系及其与WBC的关系

相关分析结果显示,ALL患儿TK1与E-cadherin水平呈现负相关($r=-0.401, P=0.001$),TKA水平与WBC水平呈现正相关($r=0.421, 0.000$),E-cadherin水平与WBC水平呈现负相关($r=-0.505, P=0.000$)。见图1~3。

表3 不同临床特征 ALL 患儿血清 TK1 及 E-cadherin 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of LDH and TK1 in serum in ALL patients with different ($\bar{x} \pm s$)

临床特征		n	TK1 (pmol/L)	t 值	P 值	E-cadherin (ng/mL)	t 值	P 值
性别	男	97	7.52±1.36	0.194	0.742	29.31±7.84	0.214	0.733
	女	75	7.47±1.32			30.64±8.27		
年龄(y)	≤8	88	7.54±1.31	0.229	0.718	30.74±8.21	0.406	0.592
	>8	84	7.38±1.34			28.24±8.09		
WBC(×10 ⁶)	≥32	82	8.64±1.41	6.117	0.000	22.37±6.94	8.074	0.000
	<32	90	6.46±1.09			36.81±8.02		
ALL 类型	T-ALL	63	7.63±1.41	0.352	0.497	30.82±8.22	0.516	0.357
	B-ALL	109	7.42±1.23			29.21±7.94		
髓外浸润	是	70	8.84±1.12	6.716	0.000	24.49±7.20	6.802	0.000
	否	102	6.58±1.06			33.81±11.06		

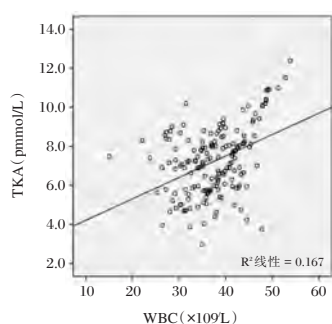


图1 TKA 与 WBC 相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between TKA and WBC

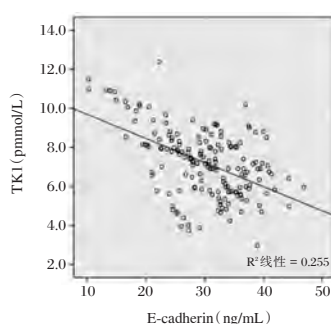


图2 TK1 与 E-cadherin 水平相关性分析

Figure 2 Correlation analysis between TK1 and E-cadherin level

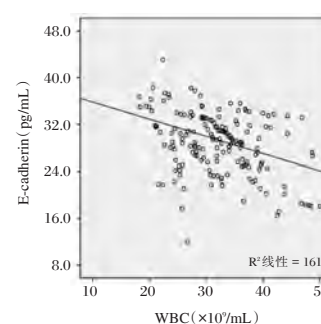


图3 E-cadherin 与 WCB 水平相关性分析

Figure 3 Correlation analysis of E-Cadherin and WCB levels

3 讨论

AL 疾病的显著特征是细胞过度增殖,细胞凋亡受到抑制。许多癌基因、抑癌基因异常,相应蛋白表达发生异常变化,从而导致细胞周期紊乱,导致白血病的发生^[8-9]。AL 死亡率占儿童肿瘤的第一位。AL 分为 ALL 和 AML 两大类,其中 ALL 是 AL 的主要类型,ALL 起源与单个核淋巴祖细胞,可由 B 系或 T 系淋巴细胞大量增殖引起,WBC 极度升高,并且极易发生髓外浸润,如眼、中枢神经系统等,一旦发生髓外浸润,预后极差^[10]。

TK1 是胸苷激酶的一种同工酶,有研究表明 TK1 与细胞的增殖密切相关,可用于衡量肿瘤增殖速度和分期^[11-12]。TK1 作为合成嘧啶中补救途径的一种重要的激酶,与肿瘤的发生密切相关。既往的研究证明^[13],TK1 水平的变化取决于细胞的增殖速度,在细胞分裂的 G1 期含量较低,在 G1 和 S 期交界处开始逐渐升高,直至 S/G2 期达到高峰,其含量与 DNA 的合成成正相关。E-cadherin 与细胞间的粘附作用密切相关,大量研究表明^[14],

E-cadherin 表达降低或缺失参与多种肿瘤的发生^[15],E-cadherin 的丢失会导致髓系细胞粘合力下降^[16],血液中一些整合素介导祖细胞和骨髓血液之间的相互作用从而改变微环境,其可能对细胞的增殖,分化和迁移产生重要影响。本文的研究结果显示,在 ALL 患儿,血清 TK1 的水平明显升高,而 E-cadherin 的水平明显下降,提示其在 ALL 的发病或临床行为中具有重要的作用。

在进一步的研究中发现 TK1 及 E-cadherin 在淋巴细胞增殖及髓外浸润的过程中具有重要的作用。白细胞负荷及髓外浸润与患儿的预后密切相关,白细胞负荷高及发生髓外浸润的 ALL 预后更差,高白细胞负荷及髓外浸润往往提示异常增殖的淋巴细胞具有更强增殖能力和侵袭能力,髓外浸润的发生机制较为复杂,与细胞间粘附能力的下降,细胞迁徙,基底膜的功能降低等多种因素有关,E-cadherin 及 TK1 可能在此过程中发挥重要的作用。而相关分析的结果提示 TK1 与 E-cadherin 在 ALL 的发生与髓外浸润中发挥重要的作用。其也可能通过某个途径相互调控。

综上所述, ALL 患儿血清 TK1 水平明显升高, 而 E-cadherin 水平降低, 其表达水平与 ALL 的白细胞负荷及髓外浸润等生物学行为密切相关, 对其进行检测有助于对 ALL 的临床特性进行评估。

参考文献

- [1] Agaian S, Madhukar M, Chronopoulos AT. Automated Screening System for Acute Myelogenous Leukemia Detection in Blood Microscopic Images [J]. *IEEE Systems J*, 2017, 8(3):995-1004.
- [2] Lichtenegger F S, Krupka C, Haubner S, et al. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):142-144.
- [3] 丁美娟, 杨宇. TK1 与 CTC 检测在恶性实体瘤中的应用 [J]. *中国医师杂志*, 2020, 22(1):155-158.
- [4] Wei Y T, Luo Y Z, Feng Z Q, et al. TK1 overexpression is associated with the poor outcomes of lung cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(5):403-413.
- [5] 张燕. 宫颈癌患者血清骨桥蛋白、可溶性 E-钙黏蛋白含量与肿瘤增殖、侵袭活性的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(18):4562-4564.
- [6] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 科学出版社, 北京, 2007:147-148
- [7] Cepowicz D, Zaręba K, Pryczynicz A, et al. Blood serum levels of E-cadherin in patients with colorectal cancer [J]. *Prz Gastroenterol*, 2017, 12(3):186-191.
- [8] 田新, 王亚丽, 陈晶佩, 等. 儿童急性淋巴细胞及急性髓系白血病基因突变研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(32):176-179.
- [9] 孔庆琳, 安曦洲, 管贤敏, 等. β 整合素家族在儿童急性 T 淋巴细胞白血病的表达及其临床意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(6):620-626.
- [10] Shafat M S, Oellerich T, Mohr S, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment [J]. *Blood*, 2017, 129(10):1320-1332.
- [11] 王辛, 马兰, 杨宗明, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病患儿血清 LDH 及血清铁蛋白检测的临床意义 [J]. *影像研究与医学应用*, 2017, 1(18).
- [12] 裴哲宗, 余红岚, 费樱, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病患者外周血 IL-7、TK1、LDH 水平变化的临床意义及其相关性研究 [J]. *贵州医药*, 2018, 42(4):401-403.
- [13] 王贺孔, 任党利, 靳颖, 等. 急性髓系白血病患者外周血 TK1 和 SPF 的分析 [J]. *检验医学*, 2017, 32(10):59-62.
- [14] 包斌霞, 安曦洲, 李朋飞, 等. E-cadherin 基因在儿童急性白血病中的表达及其临床意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(2):339-347.
- [15] 高吉照, 谭英, 赵继鸥, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病 E-cadherin 表达及与临床指标相关性分析 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2018, 23(2):74-78.
- [16] 杨森果, 毛大华, 杨海松, 等. E-cadherin 与肿瘤侵袭、转移相关性研究进展 [J]. *医学信息(下旬刊)*, 2018, 458(3):11-14.
- (上接第 990 页)
- [20] McReynolds LJ, Zhang Y, Yang Y, et al. Rapid progression to AML in a patient with germline GATA2 mutation and acquired NRAS Q61K mutation [J]. *Leuk Res Rep*, 2019; 12:100176.
- [21] Nie D, Zhang J, Wang F, et al. Comprehensive analysis on phenotype and genetic basis of Chinese Fanconi anemia patients: dismal outcomes call for nationwide studies [J]. *BMC Med Genetics*, 2020, 21:118.
- [22] Nie D, Cao P, Wang F, et al. Analysis of overlapping heterozygous novel submicroscopic CNVs and FANCA-VPS9D1 fusion transcripts in a Fanconi anemia patient [J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(9):899-909.
- [23] Nie D, Zhang J, Xiong M, et al. Complete remission of refractory juvenile acute myeloid leukaemia with RUNX1-PRDM16 in Bloom syndrome after haematopoietic stem cell transplantation [J]. *Br J Haematol*, 2020, 26 may Online.
- [24] Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, et al. A landscape of germline mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients [J]. *Blood*, 2018, 131(7):717-732.
- [25] Kaasinen E, Kuismäki O, Rajamäki K, et al. Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1252. Published, 2019 Mar 19.
- [26] Duployez N, Goursaud L, Fenwarth L, et al. Familial myeloid malignancies with germline TET2 mutation [J]. *Leukemia*, 2020, 34(5):1450-1453.
- [27] 张阳, 陈雪, 王彤, 等. 伴先天易感因素和复杂基因突变的难治复发儿童急性髓系白血病一例并文献复习 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2016, 25(12):743-745.
- [28] 陈雪, 刘红星. 精准理解和探究遗传致病因素:从孟德尔遗传病到遗传易感 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2017; 11(3):516-518.
- [29] 刘红星, 周晓苏, 王芳, 等. 大数据和人工智能技术应用于血液肿瘤研究进展 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2020, 29(1):17-19.
- [30] 刘红星, 王芳, 聂代静. 血液系统疾病基因组学分析及临床应用进展 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2018, 27(2):69-71.
- [31] Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2020, 188(1):36-48.
- [32] Drazer MW, Kadri S, Sukhanova M, et al. Prognostic tumor sequencing panels frequently identify germline variants associated with hereditary hematopoietic malignancies [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(2):146-150.

非小细胞肺癌患者癌组织及血清中 circRNA 的表达水平及临床意义

杨桃权* 张千仕 范习刚 吴飞

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)患者癌组织及血清中环状RNA(circRNA)的表达水平及临床意义。**方法** 收集10例NSCLC患者的病理组织标本,筛选出癌组织和癌旁组织中差异表达显著的circRNA,绘制火山图并进行聚类分析。采集46例NSCLC患者和46例健康志愿者(对照组)血清进行circRNA检测,采用ROC曲线分析血清circRNA对NSCLC的诊断价值,记录曲线下面积(AUC),分析血清circRNA表达水平与临床特征的关系。**结果** 筛选出癌组织和癌旁组织中差异表达显著的circRNA共181个,其中117个表达上调,64个表达下调,火山图和聚类分析结果显示表达差异的circRNA可明显区分NSCLC癌组织和癌旁组织;NSCLC患者血清circRNA表达水平与性别、年龄、吸烟状态、分化程度、病理类型、临床分期均无显著相关性,差异无统计学意义($P>0.05$);ROC曲线分析结果显示,血清circRNA诊断NSCLC的敏感度为80.43%,特异度为58.70%,AUC值为0.752。**结论** NSCLC癌组织和癌旁组织的circRNA表达存在显著差异,血清circRNA对NSCLC有较好的诊断价值,circRNA可能与疾病进展存在一定关联。

[关键词] 非小细胞肺癌;环状RNA;癌组织;血清;ROC曲线

Expression level and clinical significance of circRNA in cancer tissues and serum of patients with non-small cell lung cancer

YANG Guangquan*, ZHANG Qianshi, FAN Xigang, WU Fei

(Department of Oncology, Deyang People's Hospital, Deyang, Sichuan, China, 618000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression level and clinical significance of circular RNA (circRNA) from cancer tissues and serum in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The pathological tissue specimens of 10 NSCLC patients were collected. circRNAs with significant differential expression in cancer tissues and adjacent tissues were screened out. Volcano plot was drawn, and cluster analysis was performed. The sera of 46 NSCLC patients and 46 healthy volunteers (the control group) were collected for circRNA detection. The diagnostic value of serum circRNA on NSCLC was analyzed by ROC curve, and the area under the curve (AUC) was recorded. The relationship between serum circRNA expression level and clinical characteristics was analyzed. **Results** A total of 181 circRNAs with significant differential expression in cancer tissues and adjacent tissues were identified, including 117 of up-regulated expressions and 64 of down-regulated expressions. The results of volcanograph and cluster analysis showed that the differentially expressed circRNA can clearly distinguish NSCLC cancer tissues from adjacent tissues. Serum circRNA expression levels in NSCLC patients have no significant correlation with gender, age, smoking status, degree of differentiation, pathological type, and clinical stage. The difference was not statistically significant ($P>0.05$). ROC curve analysis results showed that the sensitivity of serum circRNA to diagnose NSCLC was 80.43%, the

基金项目:四川省卫计委科研课题(16PJ574)

作者单位:德阳市人民医院肿瘤科,四川,德阳 618000

*通信作者:杨桃权, E-mail: za4oqt@163.com

specificity was 58.70%, and the AUC value was 0.752. **Conclusion** There are significant differences in the expression of circRNA in NSCLC cancer tissues and adjacent tissues. Serum circRNA has a good diagnostic value for NSCLC, and circRNA may be related to disease progression.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; Circular RNA; Cancer tissues; Serum; ROC curve

肺癌作为一种恶性程度较高、发病率高居世界第一位的肿瘤疾病,在世界范围内均为较严重的公共卫生问题,其中非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer, NSCLC)占比最高^[1]。肺癌在我国的发病率较高的原因在于未受控制的烟草消费、日益严重的环境污染和生活习惯改变,虽然疾病诊断和治疗都有较大进步,但其发生、发展、转移机制尚未明确,且早期诊断较为困难,因此患者5年生存率仍较低^[2]。若能在肺癌患者早期予以确诊并实施有效的治疗方式,则可显著延长患者生存期,提高生存质量^[3]。组织病理学作为诊断金标准一般需通过手术或穿刺获取靶组织,对患者有一定的生理、心理创伤,而临床常见的血清肿瘤标记物在早期诊断方面缺乏足够的灵敏度^[4]。因此寻找创伤小、稳定性好、灵敏度高的新型生物标志物对NSCLC的诊断和治疗有积极意义。本研究旨在探讨NSCLC患者癌组织及血清中环状RNA(circRNA)的临床意义,为疾病诊断提供科学依据,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择2019年1月至2019年12月于本院进行手术治疗的56例NSCLC患者为研究对象。收集其中10例患者的病理组织标本,要求癌组织经冰冻切片后组织HE染色显示癌细胞比例 $\geq 70\%$;取癌组织外缘5 cm处的癌旁组织为对照组,要求染色后显示不含癌细胞,且经免疫组化ABC法染色为阴性。10例患者中男性7例,女性3例;年龄(62.13 \pm 8.24)岁;肺鳞癌6例,肺腺癌4例;TNM分期I期4例,II期5例,III期1例;低度分化7例,中度分化3例;吸烟或戒烟者6例,未吸烟者4例。余下46例NSCLC患者进行血清circRNA检测,其中男性32例,女性14例;年龄(60.48 \pm 9.15)岁,收集病理类型、临床分期、分化程度、吸烟状态等资料。按照1:1进行匹配,选择46例健康志愿者为对照组进行血清circRNA检测,均无恶性肿瘤疾病家族史,既往无放疗史,其中男性30例,女性16例;年龄(61.57 \pm 8.85)岁。NSCLC组和对照

组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经我院医学伦理委员会批准。

入组标准①年龄 ≥ 18 岁,性别不限;②经病理组织检查确诊为NSCLC;③术前血常规、心电图、肝肾功能等检查均达治疗要求;④术前无严重合并症,无手术禁忌症;⑤患者自愿签署知情同意书。排除标准①病理资料不全,TNM分期不详者;②合并其他恶性肿瘤者;③术前接受放化疗治疗者;④患者依从性差,不能配合研究者。

1.2 方法

1.2.1 癌组织和癌旁组织检测

①使用TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司提供)分别提取10例患者的癌组织和癌旁组织中的总RNA,测定RNA在260、280、230 nm处的吸光度值,计算浓度并估算纯度,用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法检测RNA的纯度和完整性。②使用RNaseR(美国Epicentre公司提供)除去标本总RNA中的线性RNA,采用Super RNA Labeling(美国Arraystar公司提供)对RNA进行cDNA扩增和荧光标记。③将标记后的样本和Human circRNA Array V2(8 \times 15K)芯片(美国Arraystar公司提供)进行排列杂交,用清洗液试剂盒(美国Agilent公司提供)进行清洗。④上海康成生物公司提供circRNA芯片检测、图像采集、数据分析等。

1.2.2 血清检测

采集肺癌患者和对照组对象清晨空腹肘静脉血5 mL,离心分离血清保存,用TRIzol LS试剂(美国Invitrogen公司提供)提取血清总RNA,分光光度计测定RNA浓度,将RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示目的circRNA的相对表达水平。

1.3 统计学处理

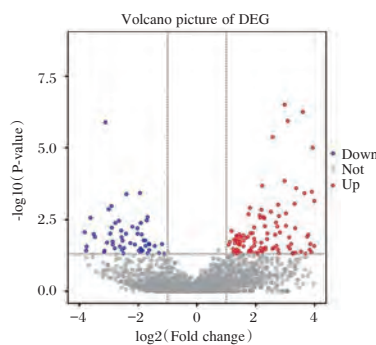
采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;采取受试者工作曲线(ROC)分析血清circRNA对NSCLC的诊断价值,记录曲线下面积(AUC);应用G2505C基因芯片扫描仪(美国Agi-

lent 公司提供)扫描组织标本 Cy3 荧光强度,采用 Agilent Feature Extraction software 进行数据分析,使用 R 平台对数据进行归一化处理,对筛选出的差异表达 circRNA 绘制火山图,进行聚类分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者组织中 circRNA 差异表达分析

R 平台 DESeq2 软件筛选出癌组织和癌旁组织中差异表达显著的 circRNA 共 181 个(Fold change ≥ 2 或 ≤ -2),差异有统计学意义($P < 0.05$),绘制火山图,其中 117 个表达上调(红色区域),64 个表达下调(蓝色区域),见图 1。



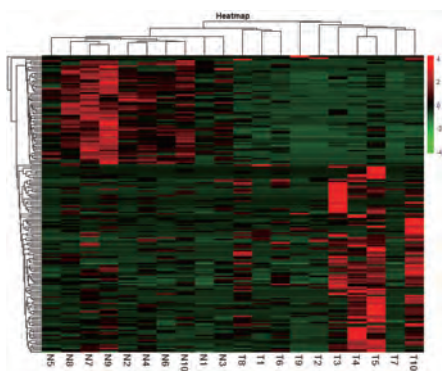
注:DEG 为差异表达基因; Fold change 为癌组织表达水平 vs 癌旁组织表达水平; Down 为表达下调; Up 为表达上调。

图 1 circRNA 差异表达火山图

Figure 1 Volcano plot of circRNA differential expression

2.2 circRNA 聚类分析

根据各组标本 circRNA 表达量的高低不同绘制聚类分析图,图中红色表示 circRNA 表达量相对高,绿色表示表达量相对低,差异表达的 circRNA 可明显区分癌组织和癌旁组织,见图 2。



注:T1-10 为癌组织; N1-10 为癌旁组织。

图 2 circRNA 差异表达聚类分析图

Figure 2 Cluster analysis of circRNA differential expression

2.3 NSCLC 患者血清 circRNA 表达水平与临床特征的关系

NSCLC 患者血清 circRNA 表达水平与性别、年龄、吸烟状态、分化程度、病理类型、临床分期均无显著相关性($P > 0.05$),见表 1。

表 1 NSCLC 患者血清 circRNA 表达水平与临床特征的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征		n	circRNA	t 值	P 值
性别	男	32	2.95±0.50	0.211	0.834
	女	14	2.92±0.60		
年龄(岁)	≤60	15	3.01±0.39	0.652	0.518
	>60	31	2.91±0.58		
吸烟状态	吸烟或戒烟	24	3.06±0.47	1.629	0.111
	不吸烟	22	2.81±0.56		
分化程度	中高度分化	30	2.97±0.51	0.553	0.583
	低分化	16	2.88±0.56		
病理类型	鳞癌	25	3.03±0.49	1.184	0.243
	腺癌	21	2.84±0.55		
临床分期	I~II 期	27	2.98±0.50	0.618	0.539
	III~IV 期	19	2.88±0.56		

2.4 血清 circRNA 对 NSCLC 的诊断价值分析

NSCLC 组患者血清 circRNA 表达水平明显高于对照组($t=5.052, P < 0.05$)。绘制 ROC 曲线,结果显示,血清 circRNA 诊断 NSCLC 的灵敏度为 80.43%,特异度为 58.70%,AUC 值为 0.752(95% CI:0.651~0.836),见图 3。

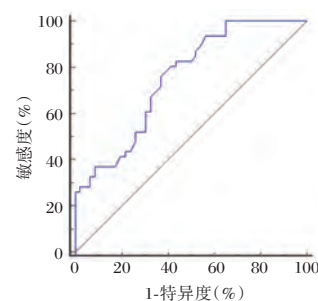


图 3 血清 circRNA 诊断 NSCLC 的 ROC 曲线

Figure 3 ROC curve of serum circRNA for NSCLC diagnosis

3 讨论

肺癌是较为严重的公共卫生问题,临床上十分重视对肺癌发生机制及诊断治疗措施的研究,目前认为基因的表达和调控直接参与到恶性肿瘤的发生发展过程中^[5]。人类基因组中超过 90% 的基因不具有编码蛋白质的能力,可被转录成非编

码 RNA(ncRNA),既往已有研究表明 ncRNA 的异常表达能够影响肺癌的发生和发展^[6]。随着高通量测序技术和生物信息学的不断发展,哺乳动物体内发现大量内源性的 circRNA,不仅扩充了 ncRNA 家族的范畴,也被发现具备特定的生物学功能,可参与多种疾病的发生发展过程中,在多种类别肿瘤细胞(包括直肠癌、肺癌等)的克隆形成、增值、凋亡、侵袭、转移过程中发挥重要作用^[7-8]。

circRNA 作为一种具有特殊结构耐受核酸外切酶降解的内源性 ncRNA,在人体细胞中表达广泛、丰度高,多数在进化上存在高度序列保守性,结构稳定,具有组织特异性表达和时序特异性表达的特征^[9]。ncRNA 多由外显子环化形成,主要位于细胞质中,具备微小 RNA(miRNA)反应元件,可与 miRNA 结合阻碍其与 mRNA 的靶点结合,抑制 miRNA 功能,或参与调节 miRNA 降低活性,从而在疾病中发挥重要作用^[10]。火山图分析发现差异表达显著的 circRNA 中有 117 个表达上调,64 个表达下调,据此推测差异表达的 circRNA 多数在 NSCLC 的发生发展过程中可能起到促癌作用。聚类分析结果显示表达差异的 circRNA 在癌组织和正常组织中表达有显著差异,可用于区分 NSCLC 癌组织和癌旁组织,对火山图分析的结果有较好的补充作用。但本研究筛选的样本数量较少,存在一定局限性,尚需进行大样本的临床研究和基础研究加以证实,并进一步探讨 circRNA 在肺癌发生发展中的作用机制。

本研究结果推测 circRNA 在疾病进展中有一定促进作用,与癌组织检测结果相互印证,具有较高的可靠性。组织细胞坏死死亡后的碎片通过囊泡释放至血液中形成的循环游离 RNA 被认为是血清 circRNA 的主要来源,血清中囊泡存在 circRNA 的富集^[11],分析认为 circRNA 在癌组织和血清中的表达水平存在一定相关性,今后可针对血清 circRNA 的来源问题进行进一步的研究。采取 ROC 曲线结果显示,该血清指标诊断 NSCLC 的效能较高。分析认为,血清 circRNA 具备作为 NSCLC 无创性诊断标志物的潜质,结合癌组织检测结果作出综合判断,可为未来 NSCLC 的临床诊断和靶向治疗提供一定的参考。本研究对 NSCLC 患者血清 circRNA 表达水平与临床特征的关系进行了分析,结果表明,血清 circRNA 水平与性别、年龄、吸烟状态、分化程度、病理类型、临床分期均

无显著相关性,可能与入组病例数过少有关,或与病例选择存在偏倚有关。

综上所述,NSCLC 癌组织和癌旁组织的 circRNA 表达存在显著差异,血清 circRNA 对 NSCLC 有较好的诊断价值,circRNA 可能与疾病进展存在一定关联。临床应进一步深入研究 circRNA 参与 NSCLC 的发生发展过程及作用机制,为该疾病的早期诊断、靶向治疗及预后评估提供新思路。

参考文献

- [1] 李君强,蒋茂芬,唐晶晶,等. LASP-1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及与其临床病理特征的相关性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3):219-223.
- [2] Ayda A, Morteza K, Shiva I, et al. Potential circulating miRNA signature for early detection of NSCLC[J]. *Cancer Genetics*, 2017, 216-217:150.
- [3] Christian R, Philip C. Mack, Giorgio V. Scagliotti, et al. IASLC Statement Paper: Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [J]. *J Thoracic Oncol*, 2018, 13(9):1248-1268.
- [4] Florian L, Raquel Blazquez, Rezan Fahrioglu Yamaci, et al. Isolated metastasis of an EGFR-L858R-mutated NSCLC of the meninges: the potential impact of CXCL12/CXCR4 axis in EGFRmut NSCLC in diagnosis, follow-up and treatment [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27):18844-18857.
- [5] Engin Aynaci, Ender Coskunpinar, Pinar Yildiz. A candidate single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region (rs17878624) of survivin gene for NSCLC[J]. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2018, 64(4):119.
- [6] Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. Abstract 3506: ncRNA regulation of eribulin response in neuroblastoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 Supplement):3506-3506.
- [7] Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer [J]. *Breast Cancer*, 2017, 25(1):1-7.
- [8] Guo XY, Sun F, CVhen JN, et al. CircRNA-0046366 inhibits hepatocellular steatosis by normalization of PPAR signaling [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(3):323-337.
- [9] 郝辰璐,李智,陈彦竹,等. CircRNA 在妇科肿瘤中的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3):259-264+252.
- [10] Li B, Xie F, Zheng FX, et al. Overexpression of CircRNA BCRC4 regulates cell apoptosis and MicroRNA-101/EZH2 signaling in bladder cancer [J]. *J Huazhong University of Sci and Technol (Med Sci)*, 2017, 37(6):886-890.
- [11] Wang HL, Xiao Y, Wu L, et al. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(2):743-754.

CK-MB、cTnI、冠脉造影及心电图联合诊断急性心肌梗死价值研究

常琳^{1*} 常佩云² 刘娟³

【摘要】目的 探讨心肌型肌酸激酶同工酶(CK-MB)、血清肌钙蛋白I(cTnI)、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效果。**方法** 选择2017年1月至2018年10月本院住院的急性心肌梗死患者82例作为对象(观察组),所有患者均行冠状动脉造影检查;选择同期健康体检者40例(对照组)。两组入院后均采用全自动生化分析仪测定CK-MB水平;采用化学发光分析仪测定cTnI水平;观察组所有患者均完成心电图检查,绘制ROC曲线,分析CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效能(敏感性、特异性)。**结果** 冠脉造影下急性心肌梗死患者以前降支为主,占50.98%,其次为右冠,占52.44%、回旋支13.73%、左主干1.96%;病变血管以单支病变为主,占62.75%;心电图检查阳性43例(84.31%);观察组急性心肌梗死患者CK-MB、cTnI水平均高于对照组健康体检者($P<0.05$);ROC曲线结果表明CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死患者中的诊断敏感性、特异性均高于单一CK-MB、cTnI、冠脉造影、心电图($P<0.05$)。**结论** CK-MB、cTnI在急性心肌梗死患者中表达异常,联合心电图、冠脉造影检查能提高急性心肌梗死患者确诊率,可获得较高的诊断敏感性、特异性,值得推广应用。

【关键词】 心肌型肌酸激酶同工酶;血清肌钙蛋白I;冠脉造影;心电图;急性心肌梗死;诊断效果

Study on the value of combined diagnosis of acute myocardial infarction by CK-MB、cTnI、coronary angiography and electrocardiogram

CHANG Lin^{1*}, CHANG Peiyun², LIU Juan³

(1. Electrocardiogram room of bozhou people's hospital, Bozhou, Anhui, China, 236000; 2. Internal medicine of bozhou people's hospital, Bozhou, Anhui, China, 236000; 3. Department of cardiology, bozhou people's hospital, Bozhou, Anhui, China, 236000)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the diagnostic effect of myocardial creatine kinase isoenzyme (CK-MB), serum troponin I (cTnI), coronary angiography and electrocardiogram in patients with acute myocardial infarction. **Methods** From January 2017 to October 2018, 82 patients with suspected acute myocardial infarction were selected as the observation group, and all patients were diagnosed by coronary angiography. 40 healthy patients during the same period were selected as the control group. After admission, both groups were measured the CK-MB level using automatic biochemical analyzer. Chemiluminescence analyzer was used to measure cTnI level. All patients in the observation group completed electrocardiogram examination. The ROC curve was drawn to analyze the diagnostic efficacy (sensitivity, specificity) of CK-MB, cTnI, coronary angiography combined with ECG in patients with acute myocardial infarction. **Results**

基金项目:国家自然科学基金项目(81670332)

作者单位:1.亳州市人民医院心电图室,安徽,亳州 236000

2.亳州市人民医院内科,安徽,亳州 236000

3.亳州市人民医院心内科,安徽,亳州 236000

*通信作者:常琳, E-mail: liuhuawbyy222@163.com

Patients with acute myocardial infarction under coronary angiography were mainly descended, accounting for 50.98%, followed by the right coronary artery 33.33%, circumflex branch 13.73%, left main trunk 1.96%. The diseased blood vessels were mainly single branch lesions, accounting for 62.75%. 43 patients (52.44%) were positive in electrocardiogram. The levels of CK-MB and cTnI were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The ROC curve results showed that the diagnostic sensitivity and specificity of CK-MB, cTnI, coronary angiography and electrocardiogram in patients with acute myocardial infarction were both higher than that of single CK-MB, cTnI, coronary angiography, electrocardiogram ($P < 0.05$). Conclusion CK-MB and cTnI are abnormally expressed in patients with acute myocardial infarction. Combined with electrocardiogram and coronary angiography can improve the diagnosis rate of patients with acute myocardial infarction, and obtain high diagnostic sensitivity and specificity, which is worthy of promotion and application.

[KEY WORDS] Myocardial creatine kinase isoenzyme; Serum troponin I; Coronary angiography; electrocardiogram; Acute myocardial infarction; Diagnostic effect

急性心肌梗死 (Acute myocardial infarction, AMI) 是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧引起的心肌坏死, 临床以剧烈、持久的胸骨后疼痛为主, 且患者经休息、硝酸酯类药物难以完全缓解, 部分患者可伴有心肌酶活性升高、心电图变化等^[1]。同时, 心肌耗氧量剧烈增加、冠状动脉痉挛等亦可诱发 AMI^[2]。冠脉造影是 AMI 患者重要的诊断方法, 并视为“金标准”, 但是冠脉造影是有创检查, 导致患者依从性较差^[3]。心电图属于是一种无创检查方法, 能记录人体正常心脏的电活动, 可帮助诊断心律失常、心肌梗死及部位, 亦可判断人工心脏起搏状况^[4]。心肌型肌酸激酶同工酶 (Myocardial creatine kinase isoenzyme, CK-MB) 是实验室检查重要指标之一, 在正常人体中表达水平较低, 当心肌损伤严重时, 则会造成 CK-MB 水平持续升高; 血清肌钙蛋白 I (Serum troponin I, cTnI) 属于是一种收缩蛋白, 仅存在于心肌组织中, 且正常生理作用下由于缺乏钙, 能抑制肌球蛋白-肌球蛋白复合物中三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 酶活动, 从而阻止肌肉收缩^[5]。本研究探讨 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在 AMI 患者中的诊断效能, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2017 年 1 月至 2018 年 10 月住院的急性心肌梗死患者 82 例 (观察组), 所有患者均完善冠状动脉造影检查, 男 46 例, 女 36 例, 年龄 (43~84) 岁, 平均 (62.7±9.99) 岁; 选择同期健康体检者 40 例 (对照组), 男 21 例, 女 19 例, 年龄 (42~82) 岁, 平均 (60.7±11.5) 岁。

纳入标准: ①观察组患者诊断 AMI, 临床表现

为明显胸痛、发病早期阶段可伴有恶心呕吐、轻度腹泻, 部分患者放射到左肩部、下颌及上腹部; ②均完成 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图检测, 且患者均可耐受; ③所有患者均已签署知情同意书, 并经医院伦理委员会批准。排除标准: ①合并精神异常、血液系统疾病或伴有自身免疫系统疾病者; ②合并恶性肿瘤、认知功能异常者。

1.2 方法

1.2.1 CK-MB、cTnI 测定

①标本采集。观察组入院后取外周静脉血 5 mL, 对照组健康体检取外周静脉血 5 mL, 血清分离后置于 -80℃ 冰箱中; ②检测方法。采用全自动生化分析仪完成两组测定 CK-MB 水平; 采用 BECKMAN 公司 ACCESS 化学发光分析仪测定 cTnI 水平; ③参考值。CK-MB 参考值 <25 U/L; cTnI 水平参考值 <0.034 ng/mL^[6]。

1.2.2 冠脉造影检查

观察组所有患者均完成冠脉造影检查, 采用 Judkins^[7] 造影导管经桡动脉行冠脉造影, 分别取左侧位、正位加头或正位加足体位造影。冠脉狭窄程度分级: 0 级、I 级、II 级。

1.2.3 心电图检查

观察组所有患者均完成心电图检查。采用同步 12 导联图机进行检查, 型号: 日本光电心电图仪, 监测患者心电图变化情况, 纸速为 25 mm/s, 电压 10 mm=1 mv, 测定完毕后完成心电图分析, 各导联 ST 段偏移量, 以 TP 段为基线, J 点后 80 ms 处为测量点, 连续完成 3 个心搏平均值测定^[8-9]。

1.2.4 诊断效能

绘制 ROC 曲线, 分析 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效能

(敏感性、特异性)。

1.3 统计分析

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

2 结果

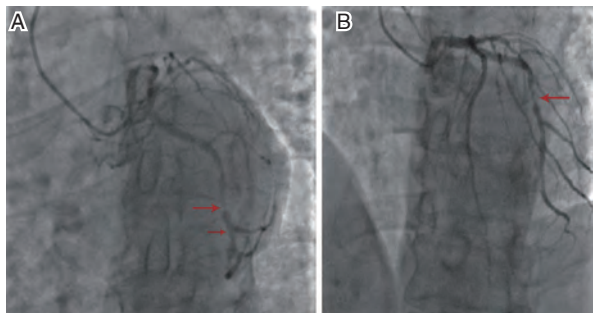
2.1 观察组冠脉造影检查结果分析

疑似急性心肌梗死患者 82 例患者均完成冠脉造影检查结果,见表 1 和图 1。

表 1 观察组冠脉造影检查结果分析

Table 1 Analysis of the results of coronary angiography in the observation group

冠脉造影检查		构成比 (%)
罪犯血管 ($n=51$)	前降支	26 (50.98)
	回旋支	7 (13.73)
	右冠	17 (33.33)
	左主干	1 (1.96)
病变血管数量 ($n=51$)	单支病变	32 (62.75)
	三支病变	15 (29.41)
	左主干病变	4 (7.84)



注:A. 回旋支分叉病变且出现闭塞; B. 前降支闭塞。

图 1 观察组冠脉造影检查图片

Figure 1 Observation group coronary angiography pictures

2.2 心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效果

82 例急性心肌梗死患者均完成心电图检查,心电图阳性 43 例,诊断符合率为 52.44%,见表 2。

2.3 两组 CK-MB、cTnI 水平比较

观察组急性心肌梗死患者 CK-MB、cTnI 水平均高于对照组健康体检者 ($P < 0.05$),见表 3。

2.4 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死诊断效能

ROC 曲线结果表明 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效能(敏感性、特异性)高于 CK-MB、cTnI、冠脉造影、心电图差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4 和图 2。

表 2 心电图在急性心肌梗死患者中的诊断效果

Table 2 Diagnostic effect of electrocardiogram in patients with acute myocardial infarction

心电图检查	构成比 (%)
前壁心肌梗死	15 (34.88)
未见病理性 Q 波, T 波发生倒置, ST 段弓背抬高	3 (6.98)
下后壁合并右室心肌梗死	8 (18.60)
单项曲线下壁心肌梗死	6 (13.95)
病理性 Q 波, T 波发生倒置, ST 段弓背抬高	4 (9.30)
前间壁心肌梗死	3 (6.98)
非 Q 波心肌梗死	4 (9.30)
合计	43 (100.00)

表 3 2 组 CK-MB、cTnI 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of CK-MB and cTnI levels between 2 group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CK-MB (U/L)	cTnI (ng/mL)
观察组	82	45.39 \pm 5.31	0.16 \pm 0.06
对照组	40	17.46 \pm 2.90	0.021 \pm 0.001
t 值	/	7.472	4.598
P 值	/	0.000	0.000

表 4 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死诊断效能

Table 4 CK-MB, cTnI, coronary angiography combined with electrocardiogram in the diagnosis of acute myocardial infarction

肿瘤标志物	AUC	敏感度 (%)	特异度 (%)
CK-MB	0.734	70.16	62.52
cTnI	0.709	72.05	65.09
心电图检查	0.821	82.15	71.34
冠脉造影	0.967	94.25	79.49

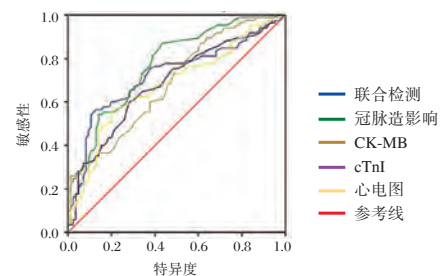


图 2 CK-MB、cTnI、冠脉造影联合心电图在急性心肌梗死诊断 ROC 曲线

Figure 2 CK-MB, cTnI, coronary angiography combined with electrocardiogram in the diagnosis of acute myocardial infarction ROC curve

3 讨论

急性心肌梗死具有发病率高、死亡率高等特

点,且多数患者是在冠状动脉粥样硬化基础上,导致斑块发生破裂,从而引起冠脉内血栓形成、管腔闭塞,进一步引起心肌发生缺血性坏死,影响患者健康、生活^[10]。冠脉造影检查是急性心肌梗死患者中首选方法,视为该疾病诊断金标准,能评价冠状动脉血管走行、数量及畸形情况,亦可评价冠状动脉是否发生病变、病变的严重程度及病变范围等。同时,冠脉造影亦可评价冠状动脉功能性改变,亦可实现左心功能评价,能为临床治疗提供依据^[11]。本研究结果说明冠脉造影用于急性心肌梗死患者中能获得较高检出率,能确定病变血管部位及病变血管数量^[12]。但是,冠脉造影检查亦存在诸多局限性,该方法不宜用于对碘或造影剂过敏、具有严重心肺功能不全及难以耐受手术患者中^[13]。同时,对于严重心律失常、电解质紊乱及肝肾异常者均不宜使用该方法诊断,且该诊断方法可重复性较差,具有一定的风险性、创伤性,导致患者诊断依从性较差。

心电图属于是一种无创检查方法,是诊断急性心肌梗死最快的方法之一,具有金丹、可重复性好等诸多优点^[14]。临床研究表明^[15]:急性心肌梗死患者通过心电图能以最短的时间确定梗死部位、堵塞具体部位,能明确是否需要行血管重建及术后恢复,具有重要的诊治意义。本研究结果说明心电图用于AMI患者中诊断符合率高,能确定病变血管位置、数量。cTnI由T、C、I三种亚单位构成,而cTnI仅存在于心房肌和心室肌中,属于是一种特异性的心肌细胞特异型性标志物。CK-MB亦是心肌梗死患者中辅助诊断指标,具有一定的敏感性、特异性。CK能催化肌酸的磷酸化反应,而CK-MB则属于是同工酶,主要存在于心肌,且在正常人体中表达水平较低,仅当心肌组织损伤后,将会引起CK-MB水平升高^[16]。本研究结果说明CK-MB、cTnI在急性心肌梗死患者中表达异常,能作为急性心肌梗死的辅助诊断指标。因此,临床上对于疑似急性心肌梗死患者应加强患者CK-MB、cTnI、心电图检查,评估患者身体状况,必要时可配合冠脉造影检查,帮助患者早期确诊,为患者后续诊疗提供依据。

综上所述,CK-MB、cTnI在急性心肌梗死患者中表达异常,联合心电图、冠脉造影检查能提高急性心肌梗死患者确诊率,可获得较高的诊断敏感性、特异性,值得推广应用。

参考文献

- [1] 张惠英,曹向红. 斑点追踪成像技术评价急性心肌梗死左心室功能的价值[J]. 中国医师杂志, 2019,21(5):761-763.
- [2] 宋达,贺娜,孟海云. 胰岛素强化治疗应激性高血糖对急性心肌梗死患者急诊PCI术后心肌灌注的影响[J]. 河北医科大学学报, 2018,38(2):206-209.
- [3] Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, et al. Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection[J]. Eng J Med, 2018,378(4):345-353.
- [4] 白颖,丛佳林,程淑莉,等. 急性心肌梗死患者中糖尿病人群的临床特点及随访研究[J]. 中华流行病学杂志, 2019,40(6):692-696.
- [5] 员小利,井海云,王丹,等. H-FABP、CK-MB和NT-proBNP在急性心肌梗死诊断中的价值[J]. 中国实验诊断学, 2018,22(11):1965-1968.
- [6] Tong J, Yu Q, Li C, et al. Successful revascularization of noninfarct related artery with chronic total occlusion among acute myocardial infarction patients: A systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2018,97(3):e9655.
- [7] 彭胡,唐克彬,颜彪,等. 泸州地区冠心病PCI治疗患者CYP2C19基因多态性分布的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019,11(2):41-44.
- [8] 邓湘宁,王新宇,于海奕,等. 急性心肌梗死患者血巨噬细胞移动抑制因子的变化及临床意义[J]. 中国心血管杂志, 2018,23(2):104-109.
- [9] Claire Z, Jonathan C, Marianne Z, et al. Thirty-day rehospitalizations among elderly patients with acute myocardial infarction[J]. medicine, 2018,97(24):e11085.
- [10] 石一夫,梁洁,韩荣丽,等. 替格瑞洛对急性心肌梗死急诊PCI术后患者心肌损伤的影响[J]. 心血管康复医学杂志, 2019,28(3):341-344.
- [11] 马晶,张瀛月,李海燕,等. 融合心脏康复治疗对心肌梗死患者心肺运动功能和心理状态的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2019(10):721-725.
- [12] Jung C, Elsässer A. [Update ESC Guideline 2017 - Acute Myocardial Infarction (STEMI)][J]. Deutsche Med Wochenschrift, 2018,143(11):797.
- [13] 赵喜兰,黎明,刘继终,等. 构建PCI治疗急性心肌梗死发生再灌注心律失常相关风险评估表[J]. 中华现代护理杂志, 2019,25(10):1245-1249.
- [14] Zhang Y, Cao H, Jiang P, et al. Cardiac rehabilitation in acute myocardial infarction patients after percutaneous coronary intervention: A community-based study[J]. Medicine, 2018,97(8):e9785.
- [15] 赵小奎,邹勇,王建刚,等. 外周血清MicroRNA-208a检测诊断急性心肌梗死及评估其预后的价值[J]. 医学临床研究, 2018,35(5):1017-1019.
- [16] Ameloot K, Daemen J, Miegheem NV. PCI Strategies in Acute Myocardial Infarction with Cardiogenic Shock[J]. Eng J Med, 2018,378(14):1360-1361.

miR-126、miR-96与急性心肌梗死患者血小板活化及近期预后相关性

刘汉毅¹ 杜小杰¹ 王金墙¹ 丰贵文^{2*}

[摘要] 目的 探究 miR-126、miR-96 与急性心肌梗死(AMI)患者血小板活化、近期预后相关性。方法 选取2018年1月至2019年9月本院126例行急诊冠脉造影且确诊为AMI患者作为研究组,收集89例冠状动脉造影正常的非AMI患者作为对照组。统计两组 miR-126、miR-96 水平,不同 miR-126、miR-96 水平患者血小板活化指标[血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白(CD62p)、血小板膜糖蛋白Ⅱb/Ⅲa复合物纤维蛋白原受体(PAC-1)、血小板活化因子(PAF)]、90 d不良心血管事件(MACE)发生率,分析 miR-126、miR-96 与血小板活化指标、MACE 发生率关系。结果 研究组 miR-126 水平低于对照组,miR-96 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);低 miR-126、高 miR-96 患者 CD62p、PAC-1、PAF 水平及 90 d MACE 发生率高于高 miR-126、低 miR-96 患者,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman 分析,CD62p、PAC-1、PAF 及 90 d MACE 发生率与 miR-126 呈负相关,与 miR-96 呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 AMI 患者外周血 miR-126、miR-96 水平显著升高,且与血小板活化、近期预后相关性好,可作为鉴别诊断 AMI 标志物,指导临床治疗。

[关键词] 急性心肌梗死; miR-126; miR-96; 血小板活化; CD62p; PAC-1; PAF

Correlation of miR-126 and miR-96 with platelet activation and short-term prognosis in patients with acute myocardial infarction

LIU Hanyi¹, DU Xiaojie¹, WANG Jinqiang¹, FENG Guiwen^{2*}

(1. Department of Critical Care Medicine, Xuchang People's Hospital, Xuchang, Henan, China, 461000;

2. Department of Kidney Transplantation, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450000)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the correlation between miR-126 and miR-96 and platelet activation and short-term prognosis in patients with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** From January 2018 to September 2019, 126 patients undergoing emergency coronary angiography and diagnosed with AMI in our hospital were selected as the study group, 89 non-AMI patients with normal coronary angiography were collected as the control group. The levels of miR-126 and miR-96, platelet activation indicators in patients with different levels of miR-126 and miR-96 [platelet activation-dependent granule surface membrane protein (CD62p), platelet membrane glycoprotein II b/III a complex fibrinogen receptor (PAC-1), platelet activating factor (PAF)], the incidence of adverse cardiovascular events (MACE) at 90 days were counted in two groups, the relationship between miR-126, miR-96, platelet activation index and incidence of MACE was analyzed. **Results** The level of miR-126 in the study group was lower than that in the control group, and the level of miR-96 was higher than the control group ($P<0.05$). The levels of CD62p, PAC-1, PAF and incidence of MACE at 90 days in patients with low miR-126 and high miR-96 were higher than those with high

基金项目:河南省卫生健康委员会,河南省医学科技攻关计划项目(省部共建)(SB201901004)

作者单位:1. 许昌市人民医院重症医学科,河南,许昌 461000

2. 郑州大学附属第一医院肾移植科,河南,郑州 450000

*通信作者:丰贵文, E-mail: i0wfn@163.com

miR-126 and low miR-96 ($P<0.05$). Spearman analysis showed that the incidence of CD62p, PAC-1, PAF and incidence of MACE at 90 days was negatively correlated with miR-126 and positively correlated with miR-96 ($P<0.05$). Conclusion The levels of miR-126 and miR-96 in peripheral blood of patients with AMI are significantly increased, and they have a good correlation with platelet activation and short-term prognosis, which can be used as a differential diagnosis marker for AMI and guide clinical treatment.

[KEY WORDS] Acute myocardial infarction; miR-126; miR-96; Platelet activation; CD62p; PAC-1; PAF

急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)具有高发病率、高致死率等特点,早期正确鉴别诊断AMI对确定治疗方案,改善患者预后意义重大。近年研究发现,微小核糖核酸(MicroRNAs, miRNAs)在冠状动脉粥样硬化血管壁炎性反应、胆固醇代谢方面起着关键作用,其中微小RNA-96(miR-96)证实参与冠心病发生发展^[1-2]。亦有学者指出,miR96可在上游调控血小板形成和功能,激活血小板,加剧疾病进展,影响预后改善^[3]。微小RNA-126(miR-126)主要分布于内皮细胞及内皮相细胞,其水平变化与冠心病严重程度及预后密切相关^[4]。前期研究表明上述两种miRNAs与冠心病密切相关,但其能否成为诊断AMI的生物标记物、诊断价值如何仍缺乏大量循证支持,鉴于此,本研究检测AMI患者miR96、miR-126含量变化,分析其与血小板活化、近期预后相关性,旨在为临床诊治工作提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2018年1月至2019年9月本院126例行急诊冠脉造影且确诊为AMI患者作为研究组,其中男71例,女55例,平均年龄(49.11±13.38);收集89例冠状动脉造影正常的非AMI患者作为对照组,其中男50例,女39例,平均年龄(50.02±12.74)。两组性别、年龄、体质量指数(Body mass index, BMI)、吸烟、饮酒、合并疾病等临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

纳入标准:①符合《内科学》中AMI诊断标准^[5];②属美国纽约心脏病学会(New York Heart Association, NYHA)分级^[6] I~III级;发病至入院时间<3h;③成功施行PCI;具备一定沟通、交流能力;④患者及家属知晓本研究,自愿签署知情同意书;排除标准:①肾、肝等实质性脏器器质性病变;②恶性肿瘤;③现症感染;④既往有AMI病史;

表1 两组临床资料 [$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]

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

临床资料	研究组 ($n=126$)	对照组 ($n=89$)	t/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	71/55	50/39	0.000	0.980
年龄(岁)	49.11±13.38	50.02±12.74	0.501	0.617
BMI(kg/m^2)	21.47±1.11	21.05±1.41	2.441	0.016
吸烟	20(15.87)	15(16.85)	0.037	0.848
饮酒	18(14.28)	12(13.48)	0.028	0.867
合并疾病				
高血压	13(10.32)	10(11.24)	0.046	0.830
糖尿病	11(8.73)	8(8.99)	0.004	0.948
高脂血症	15(11.91)	13(14.61)	0.336	0.562

⑤不愿参加本研究或随访受限。本研究经医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

①标本采集:早晨8:00~9:00,采集4 mL空腹肘静脉血,置于3.2%枸橼酸钠真空抗凝管(1:9抗凝),分为2份(各2 mL),分别用于miRNAs及血小板活化指标检测。②miR-126、miR-96检测:取2 mL血液标本放入离心机,4℃下离心15 min(4 000 r/min),分离血浆,转移至无RNA酶试管,参照Ambion公司生产的TRIzol试剂操作说明书分离miR,采用miR cDNA第一链合成试剂盒将分离miR逆转录为单链cDNA,反应体系10 μL ,逆转录引物购自广州锐博生物科技有限公司,以每孔1 μL 的cDNA为模板,U6作为内参照,应用美国ABI 7500 PCR仪检测2个miRNAs表达情况,每个样本设置3个复孔,反应条件为:95℃ 10 min预变性,40个循环,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 10 s,绘制扩增曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算miR-126、miR-96表达量。③血小板活化指标:取1 mL血液标本,选取Santa Cruz公司生产血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白(CD62p)、血小板膜糖蛋白IIb/IIIa复合物纤维蛋白原受体(PAC-1)的荧光抗体进行

标记,应用赛默飞世尔科技(中国)有限公司生产 Attune NxT 流式细胞仪测定 CD62p、PAC-1 含量,以阳性标记血小板百分率表示;另取 1 mL 血液标本,以酶联免疫吸附法测定血小板活化因子(PAF),试剂盒购自合肥莱尔生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.2 评估方法

以 miR-126、miR-96 平均水平作为分界线,分为高 miR-126、低 miR-126 和高 miR-96、低 miR-96。

1.2.3 随访方法

对出院患者每 3 个月进行 1 次门诊或住院随访,记录不良心血管事件(MACE),包含非致死性心肌梗死、心力衰竭、心绞痛、血运重建。

1.3 观察指标

①两组 miR-126、miR-96 水平。②不同 miR-126、miR-96 水平患者 CD62p、PAC-1、PAF 及 90 d MACE 发生率。③miR-126、miR-96 与血小板活化指标(CD62p、PAC-1、PAF)、90 d MACE 发生率相关性。

1.4 统计学处理

通过 SPSS 22.0 软件进行处理数据,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,行 *t* 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验,采用 Spearman 进行相关性分析, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 miR-126、miR-96 水平

研究组 miR-126 水平低于对照组,miR-96 水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 miR-126、miR-96 水平 $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	miR-96	miR-126
研究组	126	158.89±47.38	86.61±24.52
对照组	89	70.29±20.42	342.18±75.66
<i>t</i> 值		10.179	35.404
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 不同 miR-126、miR-96 水平患者血小板活化指标

低 miR-126、高 miR-96 患者 CD62p、PAC-1、PAF 水平高于高 miR-126、低 miR-96 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 miR-126、miR-96 与血小板活化指标相关性

Spearman 分析,CD62p、PAC-1、PAF 与 miR-126 呈负相关,与 miR-96 呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 不同 miR-126、miR-96 水平患者血小板活化指标 $(\bar{x} \pm s)$

Table 3 platelet activation indexes in patients with different miR-126 and mir-96 levels $(\bar{x} \pm s)$

组别	<i>n</i>	CD62p(%)	PAC-1(%)	PAF(ng/mL)
高 miR-126	84	4.16±2.32	26.68±11.24	2.38±0.26
低 miR-126	42	6.33±3.18	40.55±10.57	3.01±0.42
<i>t</i> 值		4.357	6.658	10.358
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001
高 miR-96	80	6.29±2.53	41.08±9.56	2.99±0.37
低 miR-96	46	4.31±2.02	27.46±10.71	2.31±0.33
<i>t</i> 值		4.539	7.366	10.323
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 4 miR-126、miR-96 与血小板活化指标相关性

Table 4 correlation between miR-126, mir-96 and platelet activation index

血小板活化指标	miR-126		miR-96	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
CD62p	-0.622	<0.05	0.597	<0.05
PAC-1	-0.715	<0.001	0.668	<0.05
PAF	-0.734	<0.001	0.542	<0.05

2.4 不同 miR-126、miR-96 水平患者 90 d MACE 发生率

低 miR-126、高 miR-96 患者 90 d MACE 发生率高于高 miR-126、低 miR-96 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

2.5 miR-126、miR-96 与 90 d MACE 发生率相关性

Spearman 分析,90 d MACE 发生率与 miR-126 呈负相关,与 miR-96 呈正相关($r_1 = -0.853, P_1 < 0.001; r_2 = 0.752, P_2 < 0.001$)。

3 结论

miRNAs 是一类高度保守的内源性短序列非编码小分子 RNA,广泛参与细胞增殖、发育、分化、凋亡、代谢等生理活动,其表达水平对生命体正常机能发挥及维持新陈代谢的动态平衡尤为重要。新近研究发现,miRNAs 是高血压、心力衰竭、AMI 等心血管疾病的潜在生物学标记物,其中最关注的是 AMI^[7]。周立宾等^[8]指出,AMI 患者 miR-126 表达量低于不稳定性及稳定性心绞痛患者。李翠如等^[9]发现,AMI 早期血浆 miR-126 变化显著,可作为早期鉴别诊断 AMI 标记物。可见不同类型冠心病患者循环血中 miR-126 存在差异性,以 AMI 患者变化最为显著。miR-126 是目前唯一已知在内皮细胞系特异表达的 miRNA,其可通过调节血管内皮病变、脂质代谢及促进血管形成等途径参与 AMI 发生

表5 不同miR-126、miR-96水平患者90 d MACE发生率 [n(%)]

Table 5 incidence of mace at 90 days in patients with different miR-126 and mir-96 levels [n(%)]

组别	n	非致死性心肌梗死	心力衰竭	心绞痛	血运重建	总发生率
高 miR-126	84	1(1.19)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.38)	3(3.57)
低 miR-126	42	3(7.14)	2(4.76)	2(4.76)	1(2.38)	8(19.04)
χ^2 值						6.586
P值						0.010
高 miR-96	80	5(6.25)	1(1.25)	3(3.75)	1(1.25)	10(12.50)
低 miR-96	46	0(0.00)	1(2.17)	0(0.00)	0(0.00)	1(2.17)
χ^2 值						3.908
P值						0.048

发展^[10]。本研究数据与上述研究结果相似。miR-96是微小RNA-183(miR-183)家族重要成员之一,其可通过调控肿瘤细胞分裂、凋亡基因参与肿瘤发生发展过程。随临床对miR-96的研究不断深入,彭国顺等^[11]学者对比急性冠脉综合征、稳定性心绞痛及健康体检者miR-96水平变化,结果发现急性冠脉综合征患者miR-96水平明显增高。Parahulevadeng等^[12]发现miR-96在心肌梗死患者中存在异常表达,其机制可能与炎症反应、血小板活化等原因有关。本研究结果进一步证实上述研究观点,并为这一观点的深入研究提供临床证据。

AMI发病与血小板活化密切相关,检测体内有无血小板活化及其程度对本病鉴别诊断具有现实意义^[13]。PAC-1是GPIIb/IIIa复合物纤维蛋白原受体,而GPIIb/IIIa受体活性表达是导致血小板聚集最后通路,故检测血小板表面PAC-1表达能及时且准确反映血小板活化。CD62p是依赖血小板活化的颗粒外膜蛋白,生理状态下呈低表达或不表达,一旦血小板受刺激活化,便可与血小板膜融合,持久存在于血小板质膜表面。PAF是目前发现最强血小板聚集诱导剂,可促进血小板活化与聚集。由此可见,PAC-1、CD62p、PAF反映血小板活化途径存在差异,三者共同检测能更为准确反映血小板功能状态。近年研究发现,miRNAs在血小板基因调控期间起着关键作用,其可作用于靶mRNA,促使靶蛋白表达,以此调节血小板活化^[14]。当前研究报道,冠心病患者血小板内存在大量miR-96,且血小板高反应者miR-96表达水平是低反应者的2.6倍,从侧面证实miR-96可通过参与血小板产生及激活过程影响AMI、心绞痛等冠心病发生发展^[15]。由此推测,miR-126表达上调是心肌梗死后血管新生恢复梗死组织血流供应的关键环节。

目前对miR-126、miR-96与AMI预后的相关研究略显不足,故本研究对成功施行PCI术的AMI患者进行90 d随访,记录MACE发生情况,结果发现两者之前存在显著相关性,可见AMI患者miR-126、miR-96水平与近期预后密切相关。推测原因为,miR-96、miR-126可从不同途径参与血小板活化,促进AMI发生发展,进而影响预后改善。

综上所述,AMI患者外周血miR-126、miR-96水平显著升高,且与血小板活化、近期预后相关性好,可作为鉴别诊断AMI标志物,指导临床治疗。

参考文献

- [1] 赵雷,关添允,赵佳怡,等. MicroRNA在心血管疾病中的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(9): 1659-1661.
- [2] Ubhi K, Rockenstein E, Kragh C, et al. Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy: disease-related alteration in miR-96[J]. Eur J Neurosci, 2014, 39(6): 1026-1041.
- [3] Zhang H, Zhang S, Zhang J, et al. Zo-1 expression is suppressed by gm-csf via mir-96/erg in brain microvascular endothelial cells[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(5): 809-822.
- [4] 冯晓敏,刘玉薇,万楠,等. miR-126与冠心病关系研究进展[J]. 临床军医杂志, 2018, 46(7): 848-850.
- [5] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社, 2013:236-242.
- [6] Caccamo MA, Eckman PM. Pharmacologic therapy for new york heart association class IV heart failure [J]. Congest Heart Fail, 2011, 17(5): 213-219.
- [7] Zhang W, Liu D, Han X, et al. MicroRNA-451 inhibits vascular smooth muscle cell migration and intimal hyperplasia after vascular injury via ywhaz/p38 mapk pathway [J]. Exp Cell Res, 2019, 379(2): 214-224.
- [8] 周立宾,薛红,刘娟,等. 冠心病患者外周血miR-126与sVCAM-1表达及相关性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(9): 923-926.

(下转第1038页)

RDW对高血压并发房颤的诊断预测

裘存新* 胡剑平 余琳 周恩平

[摘要] 目的 探析红细胞分布宽度(RDW)对原发性高血压(EH)并发房颤的诊断预测价值。方法 收集本院2018年3月至2020年3月收治的EH患者208例,其中143例并发房颤(房颤组),并细化亚组,阵发性房颤患者61例(A组),持续性房颤患者53例(B组),永久性房颤患者29例(C组);单纯EH患者65例(非房颤组),比较各组基线资料(年龄、性别、吸烟史、饮酒史),合并症(糖尿病、冠心病),药物应用(使用ACEI/ARB药物、使用他汀类药物)及相关的实验室指标。记录左房内径(LAD)、左室射血分数(LVEF)变化。结果 房颤组实验室指标与非房颤组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。房颤A、B、C亚组实验室指标、LVEF比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。将AF作为因变量,以实验室指标为自变量,经多因素Logistic分析,RDW、LAD属EH患者并发AF高危因素。根据RDW水平绘制ROC工作曲线,曲线下面积(ACU)为0.631,(95% CI: 0.519~0.731),约登指数1.243,RDW相对诊断值为13.3%,诊断AF的敏感度为70.9%,特异性47.1%。结论 RDW为临床基础性检测指标之一,EH患者并发AF与RDW增高相关,高RDW可预测AF发病及反映病情程度,为AF早期防控及风险评估发挥积极作用。

[关键词] 高血压;心房颤动;红细胞分布宽度;诊断预测

Study on the diagnosis and prediction of hypertension with atrial fibrillation by RDW

QIU Cunxin*, HU Jianping, YU Lin, ZHOU Enping

(Department of Cardiology, Huangshan People's Hospital, Huangshan, Anhui, China, 245000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the predictive value of red blood cell distribution width (RDW) in diagnosis of essential hypertension (EH) complicated with atrial fibrillation. **Methods** A total of 208 EH patients admitted to our hospital from March 2018 to March 2020 were collected, of which 143 were complicated with atrial fibrillation (atrial fibrillation group), and subgroups were refined, and 61 patients with paroxysmal atrial fibrillation (group A), 53 patients with persistent atrial fibrillation (group B), 29 patients with permanent atrial fibrillation (group C); 65 patients with simple EH (non-atrial fibrillation group), compare baseline data (age, gender, smoking history, Drinking history), comorbidities (diabetes, coronary heart disease), drug application (using ACEI / ARB drugs, using statins) and related laboratory indicators. The changes of left atrium inner diameter (LAD) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were recorded. **Results** Compared with the non-atrial fibrillation group, the laboratory indexes of the atrial fibrillation group were statistically significant ($P<0.05$). The laboratory indexes and LVEF of A, B, and C subgroups were statistically significant ($P<0.05$). Taking AF as the dependent variable and using laboratory indicators as independent variables, RDW and LAD were EH patients with high risk factors of AF after multivariate logistic analysis. According to the RDW level, the ROC working curve is drawn. The area under the curve (ACU) is 0.631, (95% CI: 0.519~0.731), the Youden index is 1.243, the relative diagnostic value of RDW is 13.3%, and the sensitivity of diagnosis AF is 70.9%. Sex 47.1%. **Conclusion** RDW is one of the basic clinical detection indicators. EH patients

基金项目:黄山市社会发展科技专项(HS1736)

作者单位:黄山市人民医院 心内科,安徽,黄山 245000

*通信作者:裘存新, E-mail: zhi56223390@163.com

complicated with AF are associated with increased RDW. High RDW can predict the incidence of AF and reflect the degree of the disease, and play an active role in early prevention and control of AF and risk assessment.

[KEY WORDS] Hypertension; Atrial fibrillation; Red blood cell distribution width; Diagnosis prediction

心房颤动(Atrial fibrillation, AF)属临床较常见且频发的心律失常症状,易造成血流动力学紊乱及动脉栓塞等并发症,诱发不良心血管事件^[1]。原发性高血压(Essential hypertension, EH)则是诱发AF的高危因素之一,亦是心脑血管疾病影响因素^[2]。研究发现,EH合并AF将显著增加不良心血管事件风险,严重影响患者生存质量。故早期预测EH患者并发AF风险意义重大。研究认为^[3],EH病情进展及AF心室重塑过程均有炎症反应、氧化应激参与。新进研究认为^[4],红细胞分布宽度(Red blood cell distribution width, RDW)C反应蛋白、肿瘤坏死因子等密切相关;同时RDW亦受氧化应激影响,导致红细胞变性,诱导RDW异常增高。张红博等^[5]研究,RDW与缺血性脑卒中、心力衰竭发病相关,为不良心血管事件预后预测因子。对此,本研究将探析EH患者RDW水平变化与AF的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

收集本院2018年3月至2020年3月收治的EH患者208例,年龄39~74岁,平均年龄(60.56±6.51)岁,男性122例,女性86例。基于EH患者是否并发AF分组,房颤组(EH+AF)143例,并细化亚组,阵发性房颤患者96例(A组),合并持续性房颤患者28例,永久性房颤患者19例(C组)。非房颤组(单纯EH)65例。本研究经医院伦理委员会讨论批准。

纳入标准:EH、AF符合相关诊断标准^[6-7];临床资料齐全,患者知情同意。排除标准:合并恶性肿瘤者;严重感染者;肝肾功能不全;重度贫血;血液系统疾病;甲状腺功能亢进;心脏瓣膜病;免疫性疾病;风湿病活动期;近期外伤或手术史。

1.2 方法

统计入组病例基线资料,合并症,药物应用。于患者入院第2天取外周血(晨间、空腹)5 mL,应用迈瑞BC6900和BC5390全自动血细胞分析仪检测RDW,白细胞(white blood cells, WBC),中性粒细胞(neutrophil, N),淋巴细胞(lymphocyte, L)。

采用贝克曼库尔特AU5800全自动化分析仪检测天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、尿酸(uric acid, UA)、血肌酐(serum creatinine, SCr)。行超声心动图检测左房内径(left atrial diameter, LAD)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件分析数据,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较使用 t 检验,多组间的比较使用单因素的方差分析进行;计数资料用 $n(\%)$ 表示,比较组间的计数资料用 χ^2 ,采用多因素Logistic回归分析EH并发AF危险因素,用Graphpad软件制作ROC曲线,分析RDW预测EH患者发生AF诊断价值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

两组年龄、性别、吸烟史、饮酒史、糖尿病、冠心病、WBC、N、AST、TG、HDL-C、LDL-C、使用ACEI/ARB药物、使用他汀类药物等因素比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);房颤组RDW、L、ALT、SCr、TC、LAD、LVEF、UA等指标与非房颤组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 房颤患者亚组临床资料比较

房颤A、B、C亚组年龄、性别、吸烟史、饮酒史、糖尿病、冠心病、WBC、N、AST、ALT、TC、TG、HDL-C、LDL-C等指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);各亚组L、RDW、SCr、LAD、LVEF比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.3 EH并发AF的危险因素Logistic分析

将AF作为因变量,以L、RDW、ALT、SCr、TC、LAD、LVEF、UA为自变量,经多因素Logistic分析,RDW、LAD属EH患者并发AF高危因素,见表3。

表1 两组临床资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

指标	房颤组(n=143)	非房颤组(n=65)	t/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	60.98±6.37	59.63±6.81	1.386	0.167
男/女	83/60	39/26	0.153	0.696
吸烟史	15(10.49)	11(16.92)	1.691	0.193
饮酒史	9(6.29)	7(10.77)	1.261	0.262
糖尿病	34(23.78)	13(20.00)	0.364	0.546
冠心病	49(34.27)	19(29.23)	0.515	0.473
WBC($\times 10^9/L$)	6.70±1.17	6.75±1.26	0.279	0.781
中性粒细胞(N)($\times 10^9/L$)	4.83±1.95	4.39±2.01	1.494	0.137
淋巴细胞(L)($\times 10^9/L$)	1.73±0.37	2.01±0.35	5.143	<0.05
RDW(%)	13.48±1.05	12.27±0.59	8.681	<0.05
AST(U/L)	24.63±13.66	21.33±12.52	1.656	0.099
ALT(U/L)	29.19±12.79	18.97±9.76	5.726	<0.05
SCr(mmol/L)	78.61±23.08	65.78±21.49	3.795	<0.05
TC(mmol/L)	3.67±1.07	2.74±0.85	6.174	<0.05
TG(mmol/L)	1.46±0.95	1.61±0.83	1.097	0.274
HDL-C(mmol/L)	1.14±0.39	1.15±0.42	0.167	0.867
LDL-C(mmol/L)	2.13±1.15	1.98±1.04	0.898	0.370
LAD(cm)	4.34±0.28	3.47±0.31	20.078	<0.05
LVEF(%)	48.59±3.44	59.16±4.52	18.553	<0.05
尿酸(UA)(mmol/L)	335.60±88.05	277.52±64.18	4.771	<0.05
使用ACEI/ARB药物	19(13.29)	8(12.31)	0.038	0.846
使用他汀类药物	39(27.27)	11(16.92)	2.621	0.105

表2 房颤患者亚组临床资料比较 [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Comparison of clinical data of subgroups of patients with atrial fibrillation [n(%), ($\bar{x} \pm s$)]

指标	A组(n=96)	B组(n=28)	C组(n=19)	F/ χ^2 值	P值
年龄(岁)	60.25±5.26	62.02±6.63	63.15±6.88	2.56	0.081
男/女	55/41	17/11	11/8	0.105	0.949
吸烟史	8(8.33)	4(14.29)	3(15.79)	1.474	0.479
饮酒史	5(5.21)	2(7.14)	2(10.53)	0.803	0.669
糖尿病	23(23.96)	6(21.43)	5(26.32)	0.155	0.926
冠心病	31(32.29)	10(35.71)	8(42.11)	0.711	0.701
WBC($\times 10^9/L$)	6.86±1.25	6.45±1.19	6.28±1.18	2.50	0.086
N($\times 10^9/L$)	4.57±1.83	5.08±2.05	5.74±2.76	1.33	0.269
L($\times 10^9/L$)	1.86±0.41	1.58±0.39 ^a	1.33±0.34 ^{ab}	16.71	<0.05
RDW(%)	13.07±1.19	14.28±0.85 ^a	15.62±0.97 ^{ab}	47.96	<0.05
AST(U/L)	23.97±12.85	25.19±13.66	27.14±14.36	0.49	0.615
ALT(U/L)	27.86±10.58	30.45±11.65	34.08±13.95	2.63	0.076
SCr(mmol/L)	74.19±17.62	81.08±20.34 ^a	97.33±25.76 ^{ab}	11.58	<0.05
TC(mmol/L)	3.61±1.18	3.75±1.22	3.85±0.96	0.42	0.656
TG(mmol/L)	1.51±0.87	1.39±0.82	1.34±0.71	0.46	0.634
HDL-C(mmol/L)	1.15±0.41	1.08±0.39	1.19±0.37	0.49	0.614
LDL-C(mmol/L)	2.09±0.96	2.25±1.08	2.14±1.17	0.27	0.762
LAD(cm)	4.26±0.26	4.41±0.24 ^a	4.66±0.29 ^{ab}	19.89	<0.05
LVEF(%)	49.68±3.15	47.04±2.96 ^a	45.33±3.87 ^{ab}	18.52	<0.05
UA(mmol/L)	325.28±73.69	347.82±85.16	369.75±91.04	2.97	0.054
使用ACEI/ARB药物	12(12.50)	4(14.29)	3(15.79)	0.179	0.914
使用他汀类药物	26(27.08)	7(25.00)	6(31.58)	0.252	0.882

注:与A组比较^aP<0.05,与B组比较^bP<0.05。

2.4 RDW预测EH并发AF的ROC工作曲线
 根据RDW水平绘制ROC工作曲线,曲线下面积(ACU)为0.631,(95%CI: 0.519~0.731),

约登指数1.243, RDW相对诊断值为13.3%,
 诊断AF的敏感度为70.9%,特异性47.1%,
 图1。

表3 EH并发AF的危险因素 Logistic 分析

Table 3 Logistic analysis of risk factors of EH complicated with AF

指标	β 值	S.E. 值	Wald 值	OR 值	95%CI	P 值
淋巴细胞(L)	0.928	0.261	2.712	2.574	0.827~7.355	0.127
RDW	1.069	0.385	6.613	2.329	1.159~6.847	0.013
ALT	-0.143	0.105	2.119	0.863	0.778~1.029	0.147
SCr	-2.736	2.892	1.045	0.881	0.629~1.204	0.305
TC	-0.235	0.138	2.762	0.749	0.618~9.056	0.095
LAD	0.279	0.115	7.468	1.225	1.075~1.552	0.007
LVEF	-0.572	0.207	1.113	0.979	0.618~1.425	0.085
尿酸(UA)	0.558	0.125	2.157	0.576	0.224~1.269	0.146

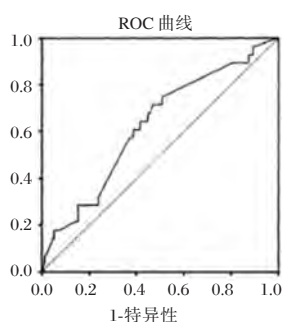


图1 RDW 预测EH并发AF的ROC工作曲线

Figure 1 RDW predicts the ROC working curve of EH concurrent AF

3 讨论

流行病学研究^[8],国内AF发病率不断上升,已然属临床最为常见的心律失常症状。Sethi等^[9]研究,AF有极高风险诱发缺血性脑卒中,导致患者致残致死率增高。但目前临床针对AF病理机制尚未明晰,众学者认为AF发病与心肌结构异常、细胞因子基因多态性及分子构成等因素相关^[10]。研究证实^[11],EH属AF发病始动因素,同时亦为AF防控可干预因素之一。Verdecchia等^[12]指出,EH可导致患者并发AF风险提高60%以上,且较高风险增加阵发性房颤进展为永久性房颤。长期高血压环境可致左心室负荷过载,导致心肌细胞纤维化,造成左室肥大,增加AF风险。本研究结果发现,房颤组患者LAD明显增大,且针对EH+AF患者做亚组分析明确,永久性房颤LAD明显高于持续性(阵发性)房颤者,LAD为AF预测指标之一,与既往研究结果相符。

近年众研究指出^[13],AF与炎症反应密切相关,且机体炎症反应参与心房结构重塑。而RDW则是临床基础检测指标之一,可准确反映红细胞异质性参数变化。相关研究发现^[14],RDW与心血

管疾病患者炎症、氧化应激密切相关。Turcato等^[15]研究,RDW水平可预测心力衰竭;Liu等^[16]认为,非瓣膜性房颤患者RDW与CHA2DS2-VASc评分呈正相关,且能够评估AF患者预后状况。但RDW与AF之间的潜在机制尚未明晰。有学者推测高血压患者慢性炎症反应可导致红细胞活性降低,诱导红细胞体积异变,同时高血压与AF均可诱导肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin system, RAS)病生理反应过度激活,引起心房重构,刺激红细胞增殖。

本研究观察EH患者RDW与AF的发生关系,结果证实,EH+AF患者RDW明显高于单纯EH患者,且阵发性、持续性、永久性房颤RDW比较均有明显差异。提示RDW水平与EH患者AF发生明显关联。通过多因素Logistic回归分析可知,EH患者RDW增高为AF强烈预测指标。

综上所述,RDW为临床基础性检测指标之一,EH患者并发AF与RDW增高相关,高RDW可预测AF发病及反映病情程度,为AF早期防控及风险评估发挥积极作用。

参考文献

- [1] 张维贞,向丽,黄山. 分子诊断技术在心房颤动临床诊疗中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(4): 283-288.
- [2] Verdecchia P, Angeli F, Reboldi G. Hypertension and Atrial Fibrillation: Doubts and Certainties From Basic and Clinical Studies[J]. *circ res*, 2018, 122(2): 352-368.
- [3] 王海军,司全金,李开亮,等. 老年原发性高血压患者血压变异性对新发心房颤动的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(3): 700-700.
- [4] Baggen VJM, van den Bosch AE, van Kimmenade RR, et al. Red cell distribution width in adults with congenital heart disease: A worldwide available and low-cost predictor of cardiovascular events[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 1(260): 60-65.

(下转第1043页)

颈动脉粥样硬化患者中血清 Lp-PLA₂、CD147 的表达及意义

谭红^{1*} 朱红霞² 张可帅³

[摘要] 目的 探讨脂蛋白相关磷脂酶 A₂(Lp-PLA₂)、CD147 在颈动脉粥样硬化患者血清中的表达及意义。方法 选取 2018 年 1 月至 2019 年 2 月在本院治疗的颈动脉粥样硬化患者 87 例为观察组,按粥样斑块超声特点分为稳定斑块组($n=42$)及不稳定斑块组($n=45$);同时选取健康志愿者 50 例作为对照组,检测血清血清 Lp-PLA₂ 和 CD147 水平,比较各组血清 Lp-PLA₂ 和 CD147 水平差异。采用 Pearson 检验分析颈动脉粥样硬化患者血清 Lp-PLA₂、CD147 表达的相关性;绘制 ROC 曲线,评估 Lp-PLA₂、CD147 对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的评估价值。结果 不稳定斑块组血清 Lp-PLA₂、血清 CD147 水平高于稳定斑块组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);稳定斑块组血清 Lp-PLA₂、CD147 水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关分析显示,颈动脉粥样硬化患者血浆 Lp-PLA₂ 和血清 CD147 呈正相关($r=0.443, P<0.05$);ROC 曲线显示,血清 Lp-PLA₂ 和 CD147 联合检测对颈动脉粥样斑块不稳定的 AUC 值为 0.874,高于 Lp-PLA₂ 和 CD147 单独检测 AUC 值。结论 颈动脉粥样硬化斑块患者血清 Lp-PLA₂、CD147 明显升高,Lp-PLA₂、CD147 联合检测有助于评估斑块的稳定性。

[关键词] 脂蛋白相关磷脂酶 A₂; CD147; 颈动脉粥样硬化斑块

The expression and significance of serum Lp-PLA₂ and CD147 in patients with carotid atherosclerosis

TAN Hong^{1*}, ZHU Hongxia², ZHANG Keshuai³

(1. Department of Neurology, The Second Hospital, Chaoyang, Liaoning, China, 122000; 2. Department of Internal Medicine, Liaoning Provincial Corps Hospital, Shenyang, Liaoning, China, 110034; 3. Department of Neurosurgery, Air Force Hospital, Northern Theater, PLA, Shenyang, Liaoning, China, 110042)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and significance of serum Lp-PLA₂ and CD147 in patients with carotid atherosclerosis. Method 87 patients with carotid atherosclerotic stenosis who were treated in our hospital from Jan 2018 to Feb 2019 were divided into the stable plaque group ($n=42$) and unstable plaque group ($n=45$) according to ultrasonic characteristics of atherosclerotic plaque. 50 healthy volunteers were selected as the control group, The serum levels of Lp-PLA₂ and CD147 were detected and compared among three groups. The expressive correlation between Lp-PLA₂ and CD147 were analyzed by Pearson. The ROC curve was drawn, and evaluated. Result The serum levels of Lp-PLA₂ and CD147 were higher in the unstable plaque group than that in the stable plaque group and control group. The difference was statistically significant ($P<0.05$), and the levels of Lp-PLA₂ and CD147 was higher in the stable plaque group than in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The correlation analysis showed

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2013225049)

作者单位:1. 辽宁省朝阳市第二医院神经内科,辽宁,朝阳 122000

2. 武警辽宁省总队医院内二科,辽宁,沈阳 110034

3. 中国人民解放军北部战区空军医院神经外科,辽宁,沈阳 110042

*通信作者:谭红, E-mail:26372856@qq.com

that the levels of Lp-PLA2 and CD147 in the carotid atherosclerosis patients were positively correlated ($r=0.443$, $P<0.05$). The ROC curve showed that the combined detection of serum Lp-PLA2 and CD147 had a change of 0.874 in the AUC of carotid atherosclerotic plaque, which was higher than the AUC value of Lp-PLA2 and CD147 alone. **Conclusion** Serum Lp-PLA2 and CD147 in patients with carotid atherosclerotic plaque are significantly increased. The combined detection of Lp-PLA2 and CD147 is helpful to assess the stability of plaque.

[KEY WORDS] Lipoprotein-associated phospholipase A2; CD147; Carotid atherosclerotic plaque

脑血管病是我国临床发病率最高的疾病之一,其中约4/5是缺血性脑卒中,而颈动脉粥样硬化斑块溃疡、破裂及脱落是诱发缺血性脑卒中的主要原因^[1]。因而,对颈动脉粥样硬化斑块破裂风险的评估及合理的干预对改善患者的预后具有重要意义。既往研究显示^[2-3],动脉粥样硬化斑块发生、发展与炎症反应关系密切,炎症反应是导致斑块不稳定的原因之一。脂蛋白相关磷脂酶A2(Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)是新发现的炎症因子,可参与血栓形成及动脉粥样硬化斑块的发生、发展^[4]。CD147为高糖基化的跨膜蛋白,归属于免疫球蛋白超家族;研究^[5]提示动脉硬化标本检测到CD147高表达,能够在动脉粥样硬化过程中分泌及活化MMP,进而降解细胞外基质,造成斑块的易损性,但具体临床意义研究资料缺乏。因此,本文以Lp-PLA2、CD147为切入点,探讨它们在颈动脉粥样硬化患者血清中的表达,并进一步研究它们对斑块稳定性的评估价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018年1月至2019年2月在本院治疗的颈动脉粥样硬化狭窄患者87例。纳入标准:①颈动脉粥样硬化斑块形成及狭窄经超声诊断明确;②患者及家属知情同意。排除标准:①合并有其他系统恶性肿瘤;②合并有免疫系统疾病、血液系统疾病、急慢性感染等;③既往脑卒中病史;④不能规律治疗或随访。患者入选后按颈动脉粥样硬化斑块特点分为稳定斑块组($n=42$)及不稳定斑块组($n=45$)。另外,同时选取健康志愿者50例作为对照组,各组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

1.2 颈动脉粥样硬化斑块评估方法

颈动脉采用西门子ACUSON X150彩色多普

表1 3组一般资料比较

Table 1 Comparison of general data between 3 groups

[$n(\%)$, ($\bar{x}\pm s$)]					
组别	n	男/女	年龄(岁)	高血压	糖尿病
稳定斑块组	42	22/20	60.12±9.46	21(50.0)	8(19.1)
不稳定斑块组	45	23/22	59.84±9.17	23(51.1)	9(20.0)
对照组	50	26/24	59.06±8.12	24(48.0)	10(21.4)
F/χ^2 值		0.217	0.632	1.452	0.090
P 值		0.897	0.729	0.484	0.956

勒超声诊断仪进行颈动脉扫描,患者仰卧位,头偏向对侧,分别自前位、侧位、侧后位和后侧位进行扫描,探头自颈根部向头侧移动,分别扫描颈总动脉、分叉部及颈内动脉、颈外动脉,并测量管径、血流特点、斑块形态、回升特点进行分类(扁平斑:管壁偏心性增厚,血管壁结构原有三层结构破坏,内膜光滑,斑块回声较为均匀;软斑:斑块表现为混合型回声,内膜表面存在连续光滑纤维帽回声;硬斑:斑块出现纤维化或钙化,部分回声增强或强回声,后方回声衰减或伴声影;溃疡斑:斑块超声形态不规则,表面不光滑。扁平斑块及硬斑块为稳定型斑块,软斑及溃疡斑为不稳定型斑块)^[6]。

1.3 Lp-PLA2及CD147检测

患者及对照组入选后,采集空腹静脉血4 mL置于Ep管中,3 000 r/min离心10 min后取上清,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清Lp-PLA2和血清CD147水平。采用Lp-PLA2试剂盒(南京建成生物研究所,规格:48T/96T,批号:20151206)、人CD147 ELISA试剂盒(上海科顺生物科技有限公司,规格:96T/48T,批号:20170913)。检测仪器为Thermo Multiskan FC酶标仪(赛默飞世尔公司,型号:Multiskan FC),检测波长为450 nm,实验操作严格按照说明书进行。

1.4 统计学处理

统计分析采用SPSS 22.0软件,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较使用 t 检验,三组间比较采

用方差分析,两两比较采用LSD-t检验;计数资料采用 χ^2 检验;相关性采用Pearson相关分析,绘制ROC曲线评估指标预测小效能, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 观察组和对照组Lp-PLA2、CD147水平比较

观察组血清Lp-PLA2、CD147明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),不稳定斑块组血清Lp-PLA2、CD147明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 三组Lp-PLA2、CD147水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of Lp-PLA2 and CD147 levels in 3 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Lp-PLA2(g/L)	CD147(ng/L)
不稳定斑块组	42	14.86±4.22	115.63±32.21
稳定斑块组	45	9.46±3.27	79.54±18.76
对照组	50	6.12±1.30	51.12±13.15
F值		19.074	14.285
P值		0.000	0.000

2.2 颈动脉粥样硬化患者血清Lp-PLA2及CD147水平相关性分析

颈动脉粥样硬化患者血清Lp-PLA2与CD147水平呈现正相关关系($r=0.443, P<0.05$)。见图1。

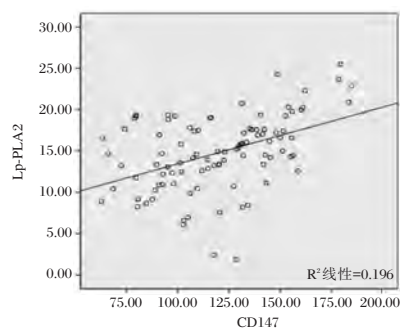


图1 颈动脉粥样硬化患者血清Lp-PLA2与CD147相关性分析

Figure 1 Correlation Analysis of Lp-PLA2 and CD147 in patients with carotid atherosclerosis

2.3 血清Lp-PLA2及CD147对颈动脉粥样硬化斑块不稳定的评估价值

ROC曲线显示Lp-PLA2+CD147评估颈动脉粥样硬化斑块不稳定的AUC值最高,提示Lp-PLA2、CD147联合检测优于单独检测。见表3、图1。

表3 血清Lp-PLA2及CD147对颈动脉粥样硬化斑块不稳定的评估

Table 3 Evaluation of serum Lp-PLA2 and CD147 on carotid atherosclerotic plaque instability

指标	AUC	灵敏度(%)	特异度(%)
CD147	0.714	89.6	92.3
Lp-PLA2	0.739	92.0	87.5
CD147+Lp-PLA2	0.874	94.3	92.7

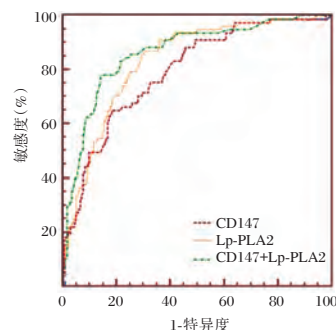


图1 ROC曲线分析图

Figure 1 ROC curve analysis

3 讨论

动脉粥样硬化与脑卒中的关系极为密切^[7-8],约半数脑卒中患者发病是由动脉粥样硬化斑块不稳定引起的。因此对颈动脉粥样硬化斑块稳定性进行充分的评估在脑血管疾病防治中具有极为重要的意义。颈动脉粥样硬化斑块的形成与高血压、免疫反应等因素有关,但斑块不稳定的机制目前尚不完全清楚。有研究提示^[9-10],斑块内新生血管形成是造成斑块不稳定的主要原因。新生血管由于血流速度慢、管腔详细且位于斑块深部,常规的超声检查检测新生血管较为困难。因而探寻高准确度、灵敏度和特异性的相关因子对颈动脉粥样硬化斑块的诊断、预防和病情评估具有重要意义。

Lp-PLA2是重要的炎症标志物,是脑血管疾病和冠心病的独立危险因素^[11]。国外研究^[12]发现冠心病患者多存在CD147的高表达,认为高水平的CD147能够刺激成纤维细胞或平滑肌细胞分泌和释放MMP,进而加速动脉硬化的发展。国内的研究^[13]也发现了急性心血管事件与CD147具有相关性并通过他汀类药物的干预能够降低颈动脉粥样硬化斑块患者机体CD147水平。本研究结果提示Lp-PLA2、CD147在颈动脉粥样硬化斑块的形成及进展过程中具有重要的作用。在ROC曲线分析中发

现, Lp-PLA2、CD147 及 Lp-PLA2+CD147 对粥样斑块具有良好的预测价值, 说明联合检测血清 Lp-PLA2 和 CD147, 能够有效的对颈动脉粥样斑块不稳定进行评估和预测。

研究发现^[14], Lp-PLA2 能够增强单核巨噬细胞介导炎症反应作用, 降低低密度脂蛋白胆固醇氧化磷脂水平, 进而造成机体氧化应激水平升高和血管内皮损伤, 可能导致粥样斑块的破裂。Lp-PLA2 与相关产物代谢后能够产生血小板源性生长因子、白细胞介素等多种炎症介质, 上述因子相互促进、相互联系, 形成 Lp-PLA2 介导的信号通路, 进而参与形成颈动脉粥样硬化斑块^[15]。相关文献^[16]提示 CD147 参与动脉硬化的机制可能加快单核细胞的黏附和趋化、介导血管生成, 进而促进平滑肌的增殖, 本研究发现不同性质斑块的 CD147 存在差异, 斑块易损性升高后血清 CD147 水平升高, 因而 CD147 可在一定程度上反映斑块的稳定性。

本研究结果显示, 血浆 Lp-PLA2 和血清 CD147 呈正相关。该结果说明颈动脉粥样硬化斑块患者血清 Lp-PLA2、CD147 存在关联性, 可通过某种机制相互作用。Lp-PLA2 可介导细胞因子使颈动脉粥样硬化斑块表达基质金属蛋白酶, 降解的纤维帽的胶原基质和平滑肌细胞, 使斑块更易破裂、脆弱^[17]。一方面, CD147 能够促进白细胞和血小板的聚集, 激活炎症反应并促进炎症介质的分泌; 另一方面, CD147 作为细胞金属蛋白酶诱导因子, 能够降解细胞基质, 产生金属蛋白酶, 使内皮下纤维帽的溶解, 增加斑块易损性^[18]。因而, 血清 Lp-PLA2 和 CD147 相互作用, 形成一个正反馈, 进一步加重颈动脉粥样硬化斑块的易损性。

综上所述, 颈动脉粥样硬化斑块患者血清 Lp-PLA2、CD147 明显升高, 与斑块性质有一定关系, 两者间存在正相关性。

参考文献

- [1] 招树涛, 甘智涛, 黄丽霜. 血清 salusin- α 及脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与颈动脉粥样硬化不稳定斑块患者并发脑梗死的相关性[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 26(11): 54-56.
- [2] 皮红泉, 李德华, 卢盛祥, 等. 心脏型脂肪酸结合蛋白和 D-二聚体及高敏肌钙蛋白 T 在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3): 182-187.
- [3] 袁萌, 刘露露, 董红霖. 常见炎症因子与颈动脉粥样斑块的相关性研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(3): 258-261.
- [4] 陈丽. 急性缺血性脑卒中血清 SAA、Lp-PLA2、Hcy 水平变化及临床意义[J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(8): 66-67.
- [5] 冯真真, 马建群. 血清 CD147 在急性冠脉综合征发病中的重要作用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(2): 238-240.
- [6] 国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会. 中国脑卒中血管超声检查指导规范[J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2015, 12(8): 599-610.
- [7] 顾汉沛, 葛剑青, 王光胜. 血浆 Lp-PLA2、HCY、尿酸与血脂对稳定大动脉粥样硬化性脑梗死病人颈动脉斑块的临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(5): 613-616.
- [8] 高锦雄, 彭海军, 严炳存, 等. 冠心病患者血清中晚期糖基化终产物与动脉硬化的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1): 38-43.
- [9] 张云华, 李杰. 颈动脉斑块内新生血管显影程度及血浆 Lp-PLA2 水平对急性脑梗死的临床诊断价值[J]. 山东大学学报: 医学版, 2017, 55(55): 116.
- [10] 高锦雄, 彭海军, 严炳存, 等. 冠心病患者血清中晚期糖基化终产物与动脉硬化的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(1): 38-43.
- [11] Qu C, Gao S, Shao H, et al. Identification of an HLA-A2-restricted CD147 epitope that can induce specific CTL cytotoxicity against drug resistant MCF-7/Adr cells[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 6050-6056.
- [12] Wei L, Ke Z, Zhao Y, et al. The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction[J]. Neuroreport, 2017, 28(6): 325.
- [13] 殷永军, 杜大勇, 李运田, 等. 同型半胱氨酸对巨噬细胞 CD147 表达的影响及瑞舒伐他汀的干预作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(3): 254-258.
- [14] 黄立纲, 刘炼华, 刘航齐, 等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 表达与动脉粥样硬化进程相关性研究[J]. 中国医药生物技术, 2018, 13(2): 151-156.
- [15] Xu B, Chan W, Wu W, et al. Study of Serum CD147 Level in Patients with Transient Ischemic Attack and CD147 Expression in Atherosclerotic Plaque[J]. J Cardiovasc Transl, 2018, 11(1): 1-7.
- [16] 陈潇祎, 庄仲, 赵锡海. 颈动脉粥样硬化斑块进展与脑缺血事件相关性的影像学研究进展[J]. 中国卒中杂志, 2017, 12(6): 538-543.
- [17] 张军, 卢祖能. 脑梗死患者血清 ox-LDL IL-18 Lp-PLA2 水平与颈动脉硬化斑块的相关性分析[J]. 河北医学, 2020, 26(1): 1-4.
- [18] 范雪松, 王恩世, 贺建勋, 等. 小而密低密度脂蛋白胆固醇及其与低密度脂蛋白胆固醇之比与颈动脉粥样硬化斑块的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(3): 219-226.

hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1 与缺血性脑血管病病情及预后关系

李占增^{1*} 任英巧² 伍淑玲¹ 陆艳卉¹ 郭佳¹

[摘要] 目的 探究超敏C-反应蛋白(hs-CRP)、核转录因子(NF- κ B)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)与缺血性脑血管病(ICD)病情及预后的关系。方法 选取唐山市人民医院2018年1月至2019年9月118例ICD患者作为观察组,包括急性脑梗死(ACI)患者82例、短暂性脑缺血发作(TIA)患者36例,另选取同期健康体检者115例作为对照组。对比两组、不同病情患者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平,分析三者鉴别ACI与TIA的诊断价值,评价三者与ICD病情的关系,观察组均给予相关治疗,随访3个月,根据预后情况分为生存者、死亡者,比较不同预后患者治疗前后血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平,并采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。结果 观察组入院时血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);ACI患者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平高于TIA患者,差异有统计学意义($P<0.05$);血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1联合鉴别诊断ACI、TIA的AUC值 $0.874>$ NF- κ B的AUC值 $0.807>$ hs-CRP的AUC值 $0.794>$ VCAM-1的AUC值 0.779 ;血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1的高表达与病情严重程度成正相关($P<0.05$);生存者治疗3d后血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平低于治疗前及死亡者,差异有统计学意义($P<0.05$);血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1高表达者生存率低于低表达者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平与ICD发病发展关系密切,且ACI患者升高更显著,临床可根据上述血清因子表达进行鉴别诊断及预后评价,以针对性完善治疗方案。

[关键词] 超敏C-反应蛋白;核转录因子;血管细胞粘附分子-1;缺血性脑血管病;急性脑梗死;血管内介入治疗

Relationship between hs - CRP, NF - κ B, VCAM - 1 and the condition and prognosis of ischemic cerebrovascular disease

LI Zhanzeng^{1*}, REN Yingqiao², WU Shuling¹, LU Yanhui¹, GUO Jia¹

(1. Neurology Dept, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000; 2. Neurology Dept, Tangshan Likang Hospital, Tangshan, Hebei, China, 063000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the relationship between hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP), nuclear transcription factor (NF- κ B), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the condition and prognosis of ischemic cerebrovascular disease (ICD). Methods 118 patients with ICD from January 2018 to September 2019 in our hospital were selected as the observation group, including 82 patients with acute cerebral infarction (ACI), 36 patients with transient ischemic attack (TIA), and 115 healthy people in the same period as the control group. The serum hs-CRP, NF- κ B, and VCAM-1 levels of the two groups and patients with different conditions were compared, and the diagnostic value of the three in distinguishing ACI from TIA was analyzed, and the relationship between the three and ICD was evaluated. The observation group was given relevant treatment and followed up 3 months. According to the prognosis, the patients were divided

基金项目:河北省卫生和计划生育委员会科研基金重点科技研究计划(20191610)

作者单位:1.唐山市人民医院神经内科,河北,唐山063000

2.唐山利康医院神经内科,河北,唐山063000

*通信作者:李占增, E-mail:lnzyzs@163.com

into survivors and dead. The serum hs-CRP, NF- κ B, and VCAM-1 levels of patients with different prognosis were compared before and after treatment, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** The serum levels of hs-CRP, NF- κ B and VCAM-1 in the observation group were higher than those in the control group when they were admitted to the hospital, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of serum hs-CRP, NF- κ B, and VCAM-1 in ACI patients were higher than those in TIA patients, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum hs-CRP, NF- κ B, VCAM-1 combined differential diagnosis of ACI, TIA AUC value 0.874 > NF- κ B AUC value 0.807 > hs-CRP AUC value 0.794 > VCAM-1 AUC value 0.779; serum hs- The high expression of CRP, NF- κ B and VCAM-1 is positively correlated with the severity of the disease ($P<0.05$). The high expression of serum hs-CRP, NF- κ B and VCAM-1 was positively correlated with the severity of the disease ($P<0.05$). Serum hs-CRP, NF- κ B, and VCAM-1 levels of survivors were lower than those before treatment and those who died after 3 days of treatment, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The survival rate of patients with high serum hs-CRP, NF- κ B and VCAM-1 expression was lower than that of low expression patients, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Serum hs-CRP, NF- κ B, VCAM-1 levels are closely related to the onset and development of ICD, and the increase in ACI patients is more significant. Clinically, differential diagnosis and prognostic evaluation can be made based on the expression of the above serum factors to improve the treatment plan.

[KEY WORDS] Hypersensitive C-reactive protein; Nuclear transcription factor; Vascular cell adhesion molecule-1; Ischemic cerebrovascular disease; Acute cerebral infarction; Intravascular interventional therapy

缺血性脑血管病(Ischemic cerebrovascular disease, ICD)是中老年群体常见神经系统疾病,其致死率、病死率较高,超过50%患者预后存在不同程度神经系统后遗症^[1]。ICD主要包括急性脑梗死(Acute cerebral infarction, ACI)、短暂性脑缺血发作(Transient ischemic attack, TIA)两种类型,前者多需行血管内介入治疗,而后者常规保守治疗即可痊愈,但二者早期症状近似且常规影像学无显著特征^[2]。近年随深入研究发现,炎症及免疫反应参与ICD发病发展过程,从二者分子层面或可为临床鉴别诊断提供参考^[3]。核转录因子(NF- κ B)是中枢免疫链式反应的启动点,具有炎症反应及免疫反应等多重调节作用^[4];血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)在正常情况下基本无表达,但炎性刺激下可在内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞中高表达,可能参与血管内皮发生的病理过程^[5];超敏C-反应蛋白(hs-CRP)是机体炎症刺激时肝脏产生的一种急性时相反应蛋白,临床已广泛证实,其在ICD发生发展中起重要作用,但鲜见鉴别ACI、TIA层面报道^[6]。本研究尝试探究hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1与ICD病情及预后的关系,为临床完善诊疗机制提供参考。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取唐山市人民医院2018年1月至2019年9

月118例ICD患者作为观察组,其中男69例,女49例,年龄41~74岁,平均(57.06 \pm 5.35)岁,体质指数19~24 kg/m²,平均(21.03 \pm 1.02) kg/m²,饮食偏好:喜素食31例,喜肉食49例,均衡饮食38例,其中急性脑梗死(ACI)患者82例、短暂性脑缺血发作(TIA)患者36例;另选取同期健康体检者115例作为对照组,其中男64例,女51例,年龄40~75岁,平均(56.11 \pm 5.03)岁,体质指数18~24 kg/m²,平均(20.92 \pm 1.01) kg/m²,饮食偏好:喜素食36例,喜肉食45例,均衡饮食34例。两组性别、年龄、体质指数、饮食偏好等基础资料均衡可比($P>0.05$)。

入选标准:①符合ICD诊断标准^[7];②经血管造影诊断确诊;③首次发病,发病时间<3 d;④对照组无缺血性疾病,体健;⑤患者、家属知情研究,签署同意书。排除标准:①伴出血性疾病、感染性疾病者;②合并严重肝肾功能缺陷者;③阿尔茨海默病、自身免疫性疾病者;④头颅外伤、肿瘤等引起ICD者。

1.2 方法

1.2.1 检测方法

入院当日晨及观察组治疗3 d后以非抗凝管取肘空腹静脉血2 mL,离心10 min(半径8 cm,转速3 500 r/min)取上层血清,以酶联免疫法测hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平。试剂盒购自珠海丽

珠生物科技有限公司,相同资深专科检验医师参考试剂盒说明书步骤规范完成。

1.2.2 治疗方法

ACI患者术前3 d口服阿司匹林、氯吡格雷,术前6 h禁饮食,肌注射鲁米那、阿托品,股动脉穿刺置8F(椎动脉6F)血管鞘,全身肝素化,导丝辅助导管入病变血管近端,造影,明确狭窄部位;路径图指导微导丝穿越狭窄处,导丝头端置颈内动脉远端,固定,保护装置送至狭窄远端释放,撤微导丝,球囊置狭窄段,注射造影剂,扩张满意即减压。术后规范应用双联抗血小板治疗;TIA患者常规予以抗凝、溶栓,针对动脉硬化、高血压、颈椎病等病因保守治疗。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计分析软件,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,两组间比较采用 χ^2 检验。Logistic回归分析血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1与病情关系。ROC曲线分析诊断价值。Kaplan-Meier曲线进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清因子水平

观察组血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 两组血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum hs-CRP, NF- κ B and VCAM-1 levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hs-CRP (mg/L)	NF- κ B (pg/mL)	VCAM-1 (mg/L)
观察组	118	7.36 \pm 1.27	217.14 \pm 57.36	4.15 \pm 1.02
对照组	115	2.18 \pm 0.63	107.82 \pm 26.09	2.57 \pm 0.71
t 值		39.281	18.644	13.690
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ACI与TIA患者血清因子水平比较

ACI患者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平高于TIA患者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 ACI与TIA患者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum hs-CRP, NF- κ B and VCAM-1 levels in patients with ACI and TIA ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hs-CRP (mg/L)	NF- κ B (pg/mL)	VCAM-1 (mg/L)
ACI患者	82	8.86 \pm 2.04	252.03 \pm 63.39	4.57 \pm 1.14
TIA患者	36	3.94 \pm 1.17	137.67 \pm 29.15	3.19 \pm 0.82
t 值		13.508	10.336	6.550
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 拟合曲线

分别绘制血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1单一及联合鉴别诊断ACI、TIA的ROC曲线,得到AUC值三者联合>NF- κ B>hs-CRP>VCAM-1,见表3、图1。

表3 血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1对ACI与TIA鉴别诊断价值

Table 3 Serum hs-CRP, NF- κ B, VCAM-1 in the differential diagnosis of ACI and TIA

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
hs-CRP	0.794	0.710~0.863	7.048	>6.66	65.85	91.67	<0.001
NF- κ B	0.807	0.724~0.874	7.694	>233.77	53.66	94.44	<0.001
VCAM-1	0.779	0.694~0.850	6.112	>3.33	95.12	47.22	<0.001
三者联合	0.874	0.801~0.928	11.550	-	78.05	94.44	<0.001

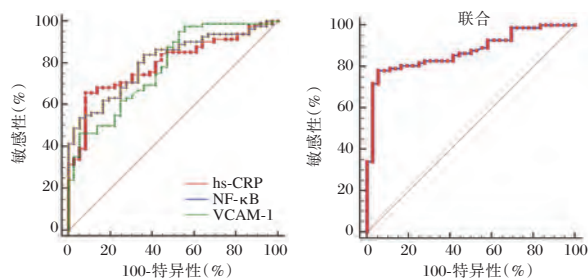


图1 血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1对ACI与TIA鉴别诊断价值

Figure 1 Serum hs-CRP, NF- κ B, VCAM-1 in the differential diagnosis of ACI and TIA

2.4 血清因子与ICD病情的关系

Logistic回归分析,血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1与ICD病情显著相关($P < 0.05$),见表4。

2.5 不同预后患者治疗前后血清因子水平

随访3个月,治疗前,不同预后患者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗3 d后,生存者血清hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1水平低于治疗前及死亡者($P < 0.05$),见表5。

表4 血清hs-CRP、NF-κB、VCAM-1与ICD病情的关系

Table 4 Relationship between serum hs-CRP, NF-κB, VCAM-1 and ICD

变量	β值	S.E值	Wald/ χ ² 值	R值	95%CI	P值
hs-CRP	1.704	0.538	10.301	5.496	3.720~8.119	<0.001
NF-κB	1.795	0.496	13.097	6.020	2.916~12.427	<0.001
VCAM-1	1.338	0.375	12.734	3.812	2.258~6.436	<0.001

表5 不同预后患者治疗前后血清hs-CRP、NF-κB、VCAM-1水平

Table 5 Serum hs-CRP, NF-κB and VCAM-1 levels before and after treatment in patients with different prognosis

时间	组别	n	hs-CRP (mg/L)	NF-κB (pg/mL)	VCAM-1 (mg/L)
入院时	生存者	97	7.32±1.31	216.58±59.04	4.17±1.51
	死亡者	21	7.54±1.40	219.73±61.17	4.06±1.42
	t值		0.689	0.220	0.306
	P值		0.492	0.826	0.760
治疗3d后	生存者	97	3.39±1.03 ^a	142.26±30.65 ^a	2.62±0.64 ^a
	死亡者	21	7.04±1.48	213.57±47.71	4.01±1.15
	t值		13.534	8.662	7.670
	P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与本组治疗前相比,^aP<0.05

2.6 生存分析

根据观察组治疗3d后血清hs-CRP、NF-κB、VCAM-1表达均数分为高表达、低表达。随访3个月,Kaplan-Meier曲线分析,血清hs-CRP、NF-κB、VCAM-1高表达者生存率低于低表达者(χ²=4.712、5.722、4.435,P=0.030、0.017、0.035),见图2。

3 讨论

ACI、TIA是ICD常见类型,ACI病情严重,进展快,而TIA若未及时治疗可进展至ACI。血管造影是临床诊断脑血管疾病“金标准”,但部分患者造影剂过敏,而检测ICD相关炎症、免疫反应层面因子变化可为临床病情评价及了解病理生理变化提供诊疗信息^[8]。

NF-κB是调控基因,机体细胞受刺激后,可移位至细胞核结合对应靶基因而发挥调控作用,病理实验显示,活化的NF-κB可放大炎症反应,通过介导hs-CRP等炎症因子基因表达以强化、释放其偶联因子过程^[9]。TIA作为脑脊髓、视网膜局灶性缺血引起的炎症反应,NF-κB在其发病发展过程

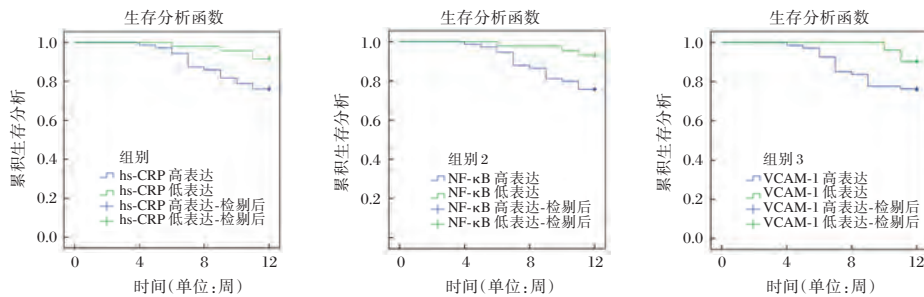


图2 生存曲线

Figure 2 Survival curve

中发挥重要作用;而ACI作为因大脑急性缺血所诱发的炎症反应,NF-κB也在此过程中扮演重要角色^[10]。推测,NF-κB可通过多层次调节炎症反应。TIA作为局部炎症反应过程,NF-κB的异常激活可能是其病情的发动者。TIA发病初始环节局部脑组织缺氧缺血损伤,而炎症反应作为机体对损伤的自保防御性反应,启动NF-κB炎症调控功能,此时若未及时治疗,损伤刺激持续存在可激发NF-κB的级联反应,加重病情,此生理过程演变与TIA可进展至ACI的病理过程相符。

hs-CRP是机体主要炎症标志物。Mansori K等^[11]研究显示,外周血hs-CRP水平在ICD患者中

呈高表达状态。结合学者Falck RS等^[12]研究分析hs-CRP介导ICD病情进展的过程可能是脑组织、脑血管损害致血管内皮炎症及血液流变学改变,对应细胞膜发生分离并为hs-CRP提供附着点,同时在NF-κB等信号传导作用下活性hs-CRP随即产生,侵袭血管内膜形成泡沫细胞在脑血管病变进展中发挥促进作用,因此血清hs-CRP水平可反映ICD病情进展情况。但有研究显示,TIA进展至ACI是一个多环节参与的复杂病理过程,受患者年龄、合并症等多重因素影响^[13]。本研究Logistic回归模型提示hs-CRP可能作为独立因素参与ICD发病发展过程,可为临床评价病情提供参考依据。

血管内皮特异性分子与内皮细胞活动关系密切,可能在内皮细胞病理生理改变中发挥一定作用。正常情况 VCAM-1 对细胞自噬能力的调控是其修复损害内皮细胞的主要机制,可促进细胞增殖,通过调控细胞周期,参与血管内皮细胞损害后的修复过程,但其表达与炎症反应相辅相成,随炎症诱发生源持续刺激,可加重血管损伤及粥样硬化的形成,介导 ICD 进展过程^[14]。

综上所述,血清 hs-CRP、NF- κ B、VCAM-1 水平与 ICD 发病发展关系密切,且 ACI 患者升高更显著,临床可根据上述血清因子表达进行鉴别诊断及预后评价,以针对性完善治疗方案。

参考文献

- [1] 任英巧,李占增,伍淑玲,等. IL-8、IL-6、hs-CRP 在缺血性脑血管病手术前后表达变化及临床价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 923-927.
- [2] 崔勇,郑智艳,黄玲,等. 磁共振弥散加权成像和三维时间飞跃法血管成像及三维动脉自旋标记在老年人缺血性脑血管病中的应用[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(8): 847-850.
- [3] 郭爽,肖伟,罗艺. IL-33/ST2 信号通路在缺血性脑卒中的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 029(012): 43-47.
- [4] 王静,李馨筱,吴琳娜,等. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织 NF- κ B/p65、Bcl-2 和 Bax 表达及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1): 33-38.
- [5] Scalici JM, Arapovic S, Saks EJ, et al. Mesothelium expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is associated with an unfavorable prognosis in epithelial ovarian cancer (EOC)[J]. *Cancer*, 2017, 123(6): 977-984.
- [6] Cai Z, He W, Zhuang FJ, et al. The role of high high-sensitivity C-reactive protein levels at admission on poor prognosis after acute ischemic stroke[J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(5): 423-429.
- [7] 中国卒中学会,中国脑血管病临床管理指南撰写委员会. 中国脑血管病临床管理指南(节选版)—缺血性脑血管病临床管理[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14(7): 709-726.
- [8] Wu Y, Fu X. Comprehensive analysis of predictive factors for rapid angiographic stenotic progression and restenosis risk in coronary artery disease patients underwent percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents implantation [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(2): e22666.
- [9] 刘新强,温妙云,李旭声,等. β 1 受体阻滞剂通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脓毒症心肌炎症反应[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(2): 193-197.
- [10] 史冬,赵建玉,闫振宇,等. NF- κ B 调节 TNF- α 表达减轻大鼠缺血性脑血管病脑组织损伤[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(10): 2403-2405.
- [11] Mansori K, Ayubi E. Association of sST2 and hs-CRP levels with new-onset atrial fibrillation in coronary artery disease [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 257(1): 32.
- [12] Falck RS, Davis JC, Best JR, et al. Buying time: a proof-of-concept randomized controlled trial to improve sleep quality and cognitive function among older adults with mild cognitive impairment[J]. *Trials*, 2018, 19(1): 445.
- [13] Li W, Lou J, Wei L, et al. Ethyl pyruvate protects PC12 cells from oxygen-glucose deprivation: A potential role in ischemic cerebrovascular disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92(1): 168-174.
- [14] Lancelot M, White J, Sarnaik S, et al. Low molecular weight heparin inhibits sickle erythrocyte adhesion to VCAM-1 through VLA-4 blockade in a standardized microfluidic flow adhesion assay[J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(3): 479-481.
- [9] 李翠如,赵春霞. 血浆 miR-1、miR-133a 以及 miR-126—急性心肌梗死的新生物学标记物[J]. 山西职工医学院学报, 2017, 27(3): 4-8.
- [10] Lin DC, Lin JB, Chen Z, et al. Independent and combined effects of environmental factors and mir-126, mir-143, and miR-145 on the risk of coronary heart disease [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2017, 14(11): 688-695.
- [11] 彭国顺,王振坤,林晓虹,等. 冠心病患者血浆微小核糖核酸表达与血小板活化水平及其相关性[J]. 广西医学, 2017, 39(9): 1367-1370.
- [12] Parahuleva MS, Euler G, Mardini A, et al. Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15974.
- [13] 皮红泉,李德华,卢盛祥,等. 心脏型脂肪酸结合蛋白和 D-二聚体及高敏肌钙蛋白 T 在急性冠状动脉综合征早期诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(3): 182-187.
- [14] Khodadi E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules [J]. *Card Tox*, 2020, 20(1): 1-10.
- [15] Xie X, Liu C, Lin W, et al. Deep vein thrombosis is accurately predicted by comprehensive analysis of the levels of microRNA-96 and plasma d-dimer [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1896-1900.

(上接第 1025 页)

前白蛋白和降钙素原在新生儿高胆红素血症中的表达及与心肌酶谱的相关性

汪灵芝^{1*} 贾文婷¹ 张苗苗²

[摘要] 目的 探究前白蛋白(PA)、降钙素原(PCT)在新生儿高胆红素血症中的表达及与心肌酶谱的相关性。方法 选取2017年1月至2019年12月本院112例新生儿高胆红素血症患儿作为研究组,按1:1比例随机抽取同期112例健康新生儿作为对照组。比较两组外周血PA、PCT水平,并对比研究组不同病情程度患儿外周血PA、PCT水平及心肌酶谱[乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶MB型同工酶(CK-MB)]水平,探究外周血PA、PCT水平与新生儿高胆红素血症病情程度的关系,及与心肌酶谱的相关性。结果 研究组外周血PA水平低于对照组,PCT水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);新生儿高胆红素血症病情程度与外周血PA、PCT水平显著相关($P<0.05$);进一步控制胎龄、出生体重、胎便排出时间、喂养不当等其他因素后,新生儿高胆红素血症病情程度仍与外周血PA、PCT水平显著相关($P<0.05$);新生儿高胆红素血症LDH、CK、CK-MB与外周血PA间存在负相关关系,与外周血PCT间存在正相关关系($P<0.05$)。结论 新生儿高胆红素血症患儿外周血PA表达明显降低,PCT表达异常升高,其均与患儿病情程度呈独立、显著相关性,且与心肌酶谱指标密切相关。其有助于辅助临床评估患儿病情及胆红素心肌损伤。

[关键词] 新生儿高胆红素血症;前白蛋白;降钙素原;心肌酶谱;病情程度

Expression of prealbumin and procalcitonin in neonatal hyperbilirubinemia and its correlation with myocardial enzyme spectrum

WANG Lingzhi^{1*}, JIA Wenting¹, ZHANG Miaomiao²

(1. Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China, 233000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression of prealbumin (PA) and procalcitonin (PCT) in neonatal hyperbilirubinemia and its correlation with myocardial enzyme spectrum. Methods A total of 112 cases of neonatal hyperbilirubinemia in our hospital from January 2017 to December 2019 were selected as the research group, 112 healthy newborns in the same period were randomly selected as a control group at a 1:1 ratio. The levels of PA and PCT in the peripheral blood of the two groups were compared, and the levels of PA and PCT in the peripheral blood and myocardial enzyme spectrum of children with different disease levels in the study group were compared [lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), creatine kinase MB type Isoenzyme (CK-MB)] levels to explore the relationship between the levels of PA and PCT in peripheral blood and the degree of neonatal hyperbilirubinemia, and the correlation with myocardial enzyme spectrum. Results The PA level in the study group was lower than that in the control group, and the

基金项目:2019年度蚌埠医学院自然科学重点项目(BYKY2019155ZD)

作者单位:1. 蚌埠医学院第二附属医院儿科,安徽,蚌埠 233000

2. 蚌埠医学院第二附属医院妇产科,安徽,蚌埠 233000

*通信作者:汪灵芝, E-mail: wlz20812@163.com

PCT level was higher than the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The degree of neonatal hyperbilirubinemia was significantly correlated with peripheral blood PA and PCT levels ($P < 0.05$). After further controlling for other factors such as gestational age, birth weight, fecal discharge time, and improper feeding, the degree of neonatal hyperbilirubinemia was still significantly correlated with peripheral blood PA and PCT levels ($P < 0.05$). Neonatal hyperbilirubinemia LDH, CK, CK-MB had a negative correlation with peripheral blood PA, and a positive correlation with peripheral blood PCT ($P < 0.05$).
Conclusion The expression of PA in the peripheral blood of neonates with hyperbilirubinemia was significantly decreased, and the expression of PCT was abnormally increased, which were independently and significantly correlated with the disease degree of the child, and were closely related to the myocardial enzyme spectrum index. It helps to assist in clinical assessment of children's condition and bilirubin myocardial injury.

[KEY WORDS] Neonatal hyperbilirubinemia; Prealbumin; Procalcitonin; Myocardial enzyme spectrum; Condition

新生儿高胆红素血症属于新生儿常见疾病之一,患儿胆红素代谢异常,进而引起血液中胆红素水平过高,严重者会有后遗症甚至危及生命^[1-2]。近年研究发现,血浆前白蛋白(Prealbumin, PA)与胆红素联结合降低体内游离胆红素水平,胆红素水平越高,血浆PA水平越低,有助于评估患儿病情^[3-4]。降钙素原(Procalcitonin, PCT)是近年来研究发现的具有高特异性、高灵敏度的炎症指标,在高胆红素血症发生时可显著升高^[5]。此外,有报道指出,新生儿高胆红素血症可引起心肌酶谱升高,可高达正常值的15倍以上^[6]。鉴于此,本研究尝试探究PA、PCT在新生儿高胆红素血症中的表达及与心肌酶谱的相关性,旨在为更全面认识新生儿高胆红素血症提供循证依据。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料及选例标准

选取2017年1月至2019年12月本院112例新生儿高胆红素血症患儿作为研究组,纳入标准:①符合新生儿病理性黄疸诊断标准^[7];②日龄 < 28 d;③无先天性心脏病、发育畸形、遗传疾病;④胎龄37~42周;⑤出生体质量2.5~4.0 kg;⑥患儿家属均知晓本研究,已签署同意书。排除标准:①出生窒息患儿;②多胎妊娠;③母亲人工受孕;④母亲为高龄产妇、妊娠期高血压疾病、糖尿病等;⑤缺氧缺血性脑病患儿;⑥乙型肝炎病毒感染患儿;⑦严重溶血性贫血患儿。本实验经院伦理委员会审批通过。按1:1比例随机抽取同期112例健康新生儿作为对照组,日龄 < 28 d,新生儿家属均知晓本研究,已签署同意书。对比两组性

别、胎龄、日龄、出生体重、分娩方式,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

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

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

项目	研究组 ($n=112$)	对照组 ($n=112$)	t/χ^2 值	P 值
性别(女/男)	50/62	45/67	0.457	0.499
胎龄(周)	38.95 \pm 0.97	39.14 \pm 1.06	1.399	0.163
日龄(d)	8.75 \pm 2.12	9.01 \pm 2.49	0.841	0.401
出生体重(kg)	3.26 \pm 0.36	3.31 \pm 0.25	1.207	0.229
分娩方式(例)			0.760	0.383
自然分娩	75(66.96)	81(72.32)		
剖宫产	37(33.04)	31(27.68)		

1.2 方法

实验室指标检测方法:新生儿入组后6 h内采集外周静脉血3~5 mL,仪器选用CS系列全自动生化分析仪(长春迪瑞医疗科技股份有限公司,批号:20150306,型号CS-800B),采用免疫比浊法检测外周血PA水平,试剂盒购自广州科方生物技术股份有限公司,采用胶体金免疫层析法测定外周血PCT水平,试剂盒购自南京诺尔曼生物技术有限公司[批号:20160421,规格:25 mL(R1:20 mL;R2:5 mL)],以荧光免疫层析法测定心肌酶谱指标,包括乳酸脱氢酶(Lactate dehydro-genase, LDH)、肌酸激酶(Creatine kinase, CK)、肌酸激酶MB型同工酶(Creatine kinase isoenzymes, CK-MB)水平,心肌酶检测试剂盒购自南京基蛋生物科技股份有限公司(批号:20161225,规格:100人份/盒)。

新生儿高胆红素血症病情评估方法^[8]。根据患儿胆红素水平升高情况进行分级,轻度、重度、极重度。

1.3 观察指标

①两组外周血 PA、PCT 水平。②研究组不同病情程度患儿外周血 PA、PCT 水平。③探究外周血 PA、PCT 水平与新生儿高胆红素血症病情程度的关系。④研究组不同病情程度患儿心肌酶谱(LDH、CK、CK-MB)水平。⑤探究外周血 PA、PCT 水平与心肌酶谱的相关性。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 22.0 软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验,通过 Logistic 进行回归分析,采用 Pearson 进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 PA、PCT 水平比较

研究组外周血 PA 水平较对照组低, PCT 水平较对照组高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 两组外周血 PA、PCT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PA (mg/L)	PCT (ng/mL)
研究组	112	121.34±26.19	0.37±0.05
对照组	112	168.03±42.17	0.08±0.02
<i>t</i> 值		9.954	56.991
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 不同病情程度患儿外周血 PA、PCT 水平比较

不同病情程度患儿外周血 PA、PCT 水平相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 极重度患儿外周血

PA 水平低于重度患儿、轻度患儿, PCT 水平高于重度患儿、轻度患儿, 见表 3。

表 3 不同病情程度患儿外周血 PA、PCT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

病情程度	<i>n</i>	PA (mg/L)	PCT (ng/mL)
轻度	45	146.23±33.41	0.18±0.03
重度	41	115.37±27.25	0.40±0.08
极重度	26	87.68±20.04	0.65±0.12
<i>F</i> 值		36.063	307.563
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 外周血 PA、PCT 与病情程度的关系

外周血 PA、PCT 与新生儿高胆红素血症病情程度显著相关($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 外周血 PA、PCT 与病情程度的关系

Table 4 Correlation between peripheral blood PA、PCT and disease degree

变量	χ^2 值	<i>S.E.</i> 值	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI	<i>P</i> 值
PA	-0.763	0.215	12.594	0.466	0.244~0.891	<0.001
PCT	1.451	0.472	9.454	4.269	2.246~8.113	<0.001

2.4 多元线性逐步回归分析

控制胎龄、出生体重、胎便排出时间、喂养不当等其他因素后, 外周血 PA、PCT 仍与新生儿高胆红素血症病情程度显著相关($P < 0.05$), 见表 5。

2.5 不同病情程度患儿心肌酶谱水平比较

不同病情程度患儿外周血 LDH、CK、CK-MB 水平相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 极重度患儿外周血 LDH、CK、CK-MB 水平高于重度患儿、轻度患儿, 见表 6。

表 5 多元线性逐步回归分析

Table 5 Multiple linear stepwise regression analysis

因变量	自变量	偏回归系数	标准误	偏回归系数(标准化)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
新生儿高胆红素血症病情程度	常量	12.214	1.406	-	9.568	<0.001
	PA	-0.611	0.052	0.713	8.243	<0.001
	PCT	0.539	0.041	0.598	9.031	<0.001

表 6 不同病情程度患儿心肌酶谱水平比较 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Table 6 Myocardial enzymatic levels in children with different conditions ($\bar{x} \pm s$, U/L)

病情程度	例数	LDH	CK	CK-MB
轻度	45	517.43±105.54	233.50±72.64	46.12±9.81
重度	41	682.29±128.20	341.18±105.39	64.06±11.43
极重度	26	821.56±143.06	492.35±131.80	81.77±15.68
<i>F</i> 值		52.510	63.854	75.302
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 外周血 PA、PCT 与心肌酶谱相关性

外周血 PA 与 LDH、CK、CK-MB 呈负相关, PCT 与 LDH、CK、CK-MB 呈正相关($P < 0.05$), 见图 1、图 2。

3 讨论

PA 是肝脏合成的一种糖蛋白, 具有分子量小、半衰期很短的特点, 能反映肝脏合成和分解、

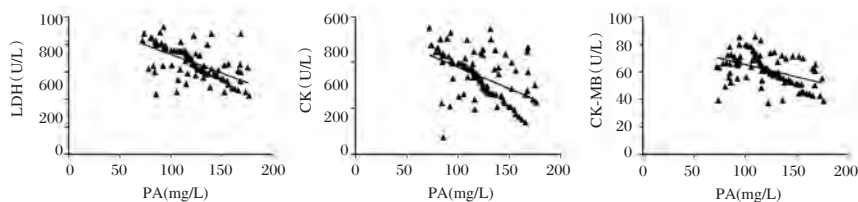


图1 外周血PA与LDH、CK、CK-MB的相关性

Figure 1 Correlation between peripheral blood PA and LDH、CK、CK-MB

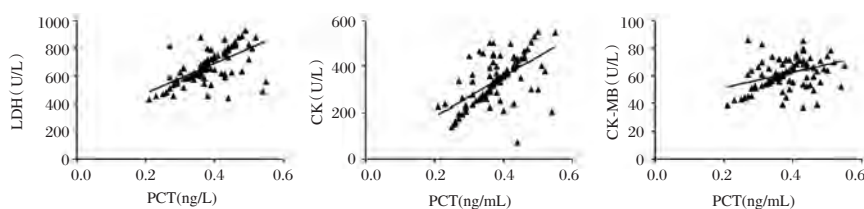


图2 外周血PCT与LDH、CK、CK-MB的相关性

Figure 2 Correlation between peripheral blood PCT and

代谢的轻微改变^[9-10]。且已有研究证实PA含量的改变与肝实质损害呈正相关^[11]。本研究结果显示,新生儿高胆红素血症可导致患儿外周血PA水平明显降低,与钱力等^[12]研究结果一致,且本研究发现随着患儿病情加重,外周血PA表达逐渐降低,二者表现为负相关关系。提示外周血PA可在一定程度上反映新生儿高胆红素血症病情程度。随着患儿病情加重,其血液中胆红素水平升高,对肝细胞的损伤增加,导致肝功能降低,合成、分泌PA的能力减弱,最终引起外周血PA水平降低。

本研究结果发现,新生儿高胆红素血症患儿外周血PCT呈异常高表达状态,与上述报道相符。PCT是一种无激素活性的蛋白质因子,属于降钙素前肽物质,由甲状腺C细胞分泌,当机体发生细菌、真菌或寄生虫感染时,在病原菌及其毒性代谢产物刺激下,机体大量合成、释放PCT,而病毒感染、自身免疫性疾病等则不会引起PCT发生明显变化^[13]。本研究发现,新生儿高胆红素血症患儿的外周血PCT表达水平与病情程度间存在明显正相关关系,提示通过检测外周血PCT表达将有助于临床对患儿病情程度进行评估。此外,本研究在进一步控制胎龄、出生体重、胎便排出时间、喂养不当等其他因素影响后,发现新生儿高胆红素血症病情程度仍与外周血PA、PCT水平显著相关,进一步证实外周血PA、PCT水平在新

生儿高胆红素血症病情评估方面具有重要应用价值。

心肌损伤是新生儿高胆红素血症常见的严重并发症之一,新生儿的心肌在结构、代谢和功能上称为未成熟心肌,储备力、代偿调节能力低,胆红素升高对心肌细胞的氧化磷酸化、环磷酸腺苷合成、氨基酸代谢等均有影响,从而引起心肌受损^[14-15]。由于高胆红素引起的心肌损伤早期临床症状和体征不明显,仅依靠临床症状及体征难以作出准确判断,加强此方面研究对尽早发现心肌损伤及早期治疗具有重要意义。本研究发现,新生儿高胆红素血症患儿外周血LDH、CK、CK-MB水平异常升高,且随着病情加重逐渐增加,提示随着外周血LDH、CK、CK-MB水平升高,心肌细胞损伤程度逐渐增加,与Chen ZH等^[16]研究结果相近,进一步证实新生儿高胆红素血症可引起心肌损伤。本研究结果显示,新生儿高胆红素血症外周血PA与LDH、CK、CK-MB间存在负相关关系,而外周血PCT与LDH、CK、CK-MB间存在正相关关系。外周血PA降低,PCT表达增加,提示患儿病情加重,血液中胆红素水平增高,对心肌细胞损伤加重,最终引起LDH、CK、CK-MB表达升高。提示通过检测外周血PA、PCT表达水平,将有助于临床评估患儿胆红素心肌损伤情况,尽早进行心肌保护,且可能在胆红素心肌损伤诊断方面具有一定应用价值。

参考文献

- [1] 肖奇志,郭洪创,李恋湘,等. G6PD活性、UGT1A1、SLCO1B1、ABCC2基因多态性和新生儿高胆红素血症的关系研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3): 25-30.
- [2] Wang JM, Mao GP, Zhao HJ. The changes of bilirubin in neonatal hyperbilirubinemia and the clinical study of secondary thrombocytopenia and coagulation abnormality[J]. Chin J Birth Health Heredity, 2018, 26(4): 61-63.
- [3] 陈淑芳,王六燕,俞静云,等. PA和 γ -GT在新生儿高胆红素血症中的诊断价值[J]. 中国妇幼健康研究, 2018, 29(9): 1076-1079.
- [4] 张微,史军梅,王倩. 新生儿发生高胆红素血症危险因素分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4): 534-536.
- [5] 张梅花,于海丽,苏艾云,等. 血清PCT与hs-CRP对低出生体重儿高胆红素血症并发感染的联合诊断效果研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(7): 1099-1101.
- [6] 梁健伟,周玮,李万莎,等. 新生儿高胆红素血症检测肝、肾功能及心肌酶谱的效果[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(8): 1153-1155.
- [7] 中华医学会儿科学分会新生儿学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 新生儿高胆红素血症诊断和治疗的专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(10): 745-748.
- [8] 石天霄. 血清心肌酶谱及肌钙蛋白检测在新生儿高胆红素血症患者中的临床意义[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(5): 846-847+856.
- [9] 邹芸苏,郭艳,程锐,等. 前白蛋白及视黄醇结合蛋白对不同窒息程度新生儿肝功能损害的诊断意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(3): 337-341.
- [10] 王孝平,汤善宏,杨德会,等. 前白蛋白变化对慢加急性肝衰竭肝功能评估的价值[J]. 西南国防医药, 2019, 29(7): 760-762.
- [11] 林广民. 肝硬化患者血清前白蛋白、胆碱酯酶含量检测及其与肝功能、肝纤维化程度的相关性研究[J]. 肝脏, 2018, 23(4): 43-45.
- [12] 钱力,程锐,王崇伟,等. 血清胱抑素C在诊断足月新生儿高胆红素血症相关急性肾损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(2): 165-168.
- [13] Zhao R, Dong S. Clinical value of serum endocan and procalcitonin in early diagnosis and prognosis evaluation of sepsis[J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29(4): 321-326.
- [14] Dong L, Sun J, Zeng L, et al. Study of the correlation between neonatal hyperbilirubinemia complicating cardiac damage and blood rheology[J]. Chin J Diffic Compl Cas, 2017, 16(7): 706-708, 712.
- [15] 阴崇娟,阴怀清,栗红,等. 新生儿高胆红素血症不同水平胆红素对心肌标志物的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(12): 1780-1781.
- [16] Chen ZH, Cheng JG, Ou MF. Clinical Significance of Hyperbilirubinemia Newborns Received Myocardial Enzymes and Troponin Joint Detection[J]. J Mathemat Med, 2017, 30(2): 172-174.
- [5] 张红博,王欣,张青娜,等. 老年脑梗死患者红细胞分布宽度水平变化及其与急性左心衰竭发生的相关性[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(12): 1213-1216.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会,高血压联盟(中国),中华医学会儿科学分会中国医师协会高血压专业委员会,等. 中国高血压防治指南(2018年修订版)[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(1): 24-56.
- [7] Craig T, January L, Samuel W, et al. 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation [J]. Heart Rhythm, 2019, 16(8): e66-e93.
- [8] 张增辉,郭军. 青年非瓣膜性房颤患者危险因素分析研究进展[J]. 心脏杂志, 2018, 30(5): 600-603.
- [9] Sethi NJ, Nielsen EE, Safi S, et al. Digoxin for atrial fibrillation and atrial flutter: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomised clinical trials [J]. Plos One, 2018, 13(3): e0193924.
- [10] 廖一夫,曹裕民,黄俊,等. 心房颤动患者29495例缺血性卒中危险因素回顾性分析[J]. 岭南心血管病杂志, 2018, 24(2): 175-179.
- [11] Wioletta DC, Miroslaw W, Pawel K, et al. Detecting cerebrovascular changes in the brain caused by hypertension in atrial fibrillation group using acoustocerebrography [J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0199999.
- [12] Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, et al. Impact of Chamber Dilatation on the Prognostic Value of Left Ventricular Geometry in Hypertension [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(6): e005948.
- [13] 王山山,梁兆光. 炎症反应与心房颤动的关系[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(5): 770-773.
- [14] 肖莉. 红细胞分布宽度和脑钠肽水平与急性心肌梗死患者并发心房颤动的相关性[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(6): 578-581.
- [15] Turcato G, Zorzi E, Prati D, et al. Early in-hospital variation of red blood cell distribution width predicts mortality in patients with acute heart failure [J]. Int J Cardiol, 2017, 15(243): 306-310.
- [16] Liu T, Shao Q, Korantzopoulos P, et al. Relation of red blood cell distribution width with CHADS 2 and CHA 2 DS 2 - VASc score in Chinese patients with non-valvular atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2017, 1(228): 861-864.

(上接第1029页)

孕妇血清抑制素 A 联合胎盘生长因子在孕早期唐氏综合征产前筛查中的预测价值

黄雪珍 陈倩岚 蔡锦梅 孙丽丽*

[摘要] 目的 探究孕妇血清抑制素 A 联合胎盘生长因子在孕早期唐氏综合征(DS)产前筛查中的应用。方法 选取2017年6月至2019年6月于本院进行孕早期DS筛查的11 W~13 W⁶孕周190例孕妇,根据诊断结果分为实验组(胎儿患DS孕妇, $n=25$)和正常组(正常孕妇, $n=165$)。检测并对比两组血清抑制素 A (Inhibin-A, Ih-A)、胎盘生长因子(PLGF)、妊娠相关蛋白 A (PAPP-A)和游离人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位 (free β -hCG)水平。结果 孕早期实验组血清 Ih-A、free β -hCG 水平显著高于正常组, PLGF、PAPP-A 水平均显著低于正常组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);根据 ROC 曲线分析结果显示,血清二联筛查(PAPP-A+free β -hCG)诊断孕早期胎儿 DS 的敏感度为 72.22%、特异度为 93%、准确性为 83.16%;四联筛查(Ih-A+PLGF+PAPP-A+free β -hCG)诊断孕早期胎儿 DS 的敏感度为 93.33%、特异度为 95%、准确性为 94.21%;四联筛查的敏感度及特异性均明显高于二联筛查,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 Ih-A、PLGF 均是孕早期筛查 DS 胎儿的有效血清指标, Ih-A+PLGF+PAPP-A+free β -hCG 联合检测对 DS 的筛查效果更佳,有助于提高孕早期胎儿 DS 的筛查准确性。

[关键词] 孕早期;唐氏综合征;血清抑制素 A;胎盘生长因子筛查

Application of serum inhibin A combined with placental growth factor in prenatal screening of Down's syndrome in early pregnancy

HUANG Xuezheng, CHEN Qianlan, CAI Jinmei, SUN Lili*

(Department of Inspection, Xiaolan Affiliated Hospital of Southern Medical, Zhongshan, Guangdong, China, 528415)

[ABSTRACT] Objective To explore the application of serum inhibin A combined with placental growth factor in prenatal screening of Down's syndrome (DS) in early pregnancy. Methods 90 pregnant women of 11W-13W+6 gestational weeks who underwent DS screening in our hospital from June 2017 to June 2019 were divided into the experimental group (pregnant women with DS, $n=25$) and the normal group (normal pregnant women, $n=165$) according to the diagnosis results. Serum inhibin A (Inhibin-A, Ih-A), placental growth factor (PLGF), pregnancy-related protein A (PAPP-A) and free human chorionic gonadotropin beta subunit (free beta-hCG) levels were measured and compared between the two groups. Results The serum levels of Ih-A and free beta-hCG in the early pregnancy group were significantly higher than those in the normal group, and the levels of PLGF and PAPP-A were significantly lower than those in the normal group ($P<0.05$). According to the analysis of ROC curve, the sensitivity of PAPP-A + free beta-hCG in diagnosing fetal DS in the early pregnancy was 72.22%, especially in the early pregnancy group. The sensitivity, specificity and accuracy of quadruple screening (Ih-A + PLGF + PAPP-A + free beta-hCG) were 93.33%, 95% and 94.21%, respectively. The sensitivity and specificity of quadruple screening were significantly higher than those in double screening ($P<0.05$). Conclusion Both Ih-A and PLGF are effective serum indexes for screening DS fetus in early pregnancy. The combination of Ih-A + PLGF + PAPP-A + free β -hCG has better screening effect on DS and helps to improve the screening accuracy of DS fetus in early pregnancy.

[KEY WORDS] Early pregnancy; Down syndrome; Inhibin A; Placental growth factor screening

基金项目:中山市科技局科研项目(2017B1062)

作者单位:南方医科大学附属小榄医院检验科,广东,中山 528415

*通信作者:孙丽丽, E-mail:476126164@qq.com

唐氏综合征(Down's syndrome, DS)是妇产科常见的胎儿畸形疾病,致病原因是先天性染色体异常,其患病率为1.5%^[1]。当前临床对DS尚无针对性治疗,而进行孕期筛查,降低DS胎儿出生率是最有效的应对手段^[2]。国内以孕妇血清妊娠相关蛋白A(Pregnancy-related protein A, PAPP-A)和游离人绒毛膜促性腺激素β亚单位(free human chorionic gonadotropin beta subunit, free β-hCG)二联筛查法为主要筛查手段,但该方法诊断敏感度和检出率都不理想,同时妊娠中后期指标改变较大,早期检出率相对较低^[3]。因此,还需增加新的血清指标进行联合筛查,提高DS胎儿的筛查准确性。近年来有较多研究将血清抑制素A(Inhibin-A, Ih-A)纳入DS筛查,发现Ih-A可有效提高检出率,降低假阳性率^[4]。同时有研究显示,胎盘生长因子(Placental growth factor, PLGF)有利于新生血管生成,该因子水平在孕早期有显著变化,可能是孕妇早期胎儿有关病变的一个敏感指标^[5]。本文将探究四联筛查(Ih-A+PLGF+PAPP-A+free β-hCG)在诊断孕早期胎儿DS上的临床价值,具体报告如下。

1 资料与分析

1.1 一般资料

选取2017年6月至2019年6月于本院进行孕早期DS筛查的11 W~13 W⁺孕周190例孕妇,根据诊断结果分为实验组(胎儿患DS孕妇)和正常组(正常孕妇)。纳入标准:①孕周为11 W~13 W⁺周,通过头臀径计算孕周;②单胎妊娠;③年龄18~43岁。排除标准:①人工受孕及有既往DS婴儿生育史者;②有高血压、糖尿病或甲状腺功能障碍者;③代谢异常疾病患者。

1.2 方法

选择孕早期血清Ih-A、PLGF、PAPP-A和free β-hCG。抽取孕周11 W~13 W⁺周孕妇静脉血3 mL,分离血清并将其存放于-20℃。Ih-A应用ELISA方

法检测,试剂生产公司是美国Diagnostic systems labortonics(批号:20181103,试剂规格:96人份/盒)。PLGF、PAPP-A和free β-hCG应用时间分辨荧光免疫法检测,检测仪器为Wallac Auto DELFIA 1235型全自动时间分辨免疫荧光检测仪,原装配套试剂盒由芬兰Perkin Elmer公司提供[规格:96人份/盒,批号:PLGF(667023)、PAPP-A(669897)和free β-hCG(668063)]。

1.3 观察指标

①对比两组孕妇的一般资料,包括年龄、孕周及体质量等;②对比两组孕妇血清指标水平,包括Ih-A、PLGF、PAPP-A、free β-hCG;③对比二联筛查和四联筛查诊断孕早期胎儿DS的ROC曲线分析结果。

1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0统计学软件处理数据,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以(%)表示,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组孕妇的一般资料比较

两组孕妇的年龄、孕周及体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 两组孕妇的一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of clinical data between 2 groups of pregnant women ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	孕周(周)	体质量(kg)
实验组	25	27.23±1.67	11.25±1.21	54.17±5.28
正常组	165	26.81±1.73	11.14±1.47	53.64±5.76
<i>t</i> 值		1.699	0.559	0.659
<i>P</i> 值		0.091	0.577	0.511

2.2 两组孕妇血清指标水平比较

孕早期实验组血清Ih-A、free β-hCG水平显著高于正常组,PLGF、PAPP-A水平均显著低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组孕妇血清指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serology levels between 2 groups of pregnant women ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Ih-A(pg/mL)	PLGF(pg/mL)	PAPP-A(mU/mL)	free -hCG(pg/mL)
实验组	25	873.18±358.42	67.24±4.75	1758.16±164.85	9.48±1.57
正常组	165	304.51±152.64	112.14±8.37	3986.54±317.92	5.61±1.35
<i>t</i> 值		14.477	44.803	59.658	18.265
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 二联筛查和四联筛查诊断孕早期胎儿DS的ROC曲线分析

ROC曲线显示四联筛查的敏感度和准确性明

显高于二联筛查,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3、图1。

表3 二联筛查和四联筛查诊断孕早期胎儿DS的ROC曲线分析结果

Table 3 ROC curve analysis of the diagnosis of fetal DS in the first trimester by the double screening and the quadruple screening

项目	敏感度(%)	特异度(%)	准确性(%)
二联筛查(PAPP-A+free β -hCG)	72.22(65/90)	93(93/100)	83.16(153/190)
四联筛查(Ih-A+PLGF+PAPP-A+free β -hCG)	93.33(84/90)	95(95/100)	94.21(179/190)
χ^2 值	14.068	0.355	11.564
P值	<0.001	0.552	0.001

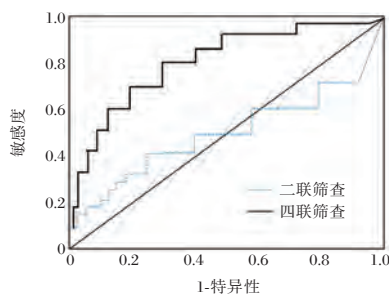


图1 二联筛查和四联筛查诊断孕早期胎儿DS的ROC曲线分析结果

Figure 1 ROC curve analysis of the diagnosis of fetal DS in the first trimester by the double screening and the quadruple screening

3 讨论

DS即21-三体综合征,又称先天愚型或Down综合征,是由先天性染色体数目异常(多了一条21号染色体)而引发的疾病^[6]。60%患儿在胎内早期即流产,存活者有明显的智力落后、特殊面容、生长发育缓慢和多发畸形^[7]。DS严重影响了患儿的健康成长,也给家庭带来了沉重压力,是我国新生儿缺陷预防的重要疾病之一。当前,国外许多发达国家及国内科技发展水平较高的城市主要应用唐氏筛查法,即孕早期血清PAPP-A+free β -hCG+B超检查颈项透明层(NT)厚度,该方法对DS检出率在86%~92%^[8-9]。然而国内大多中小城市的B超检测技术水平较低,难以实施唐氏筛查法,因此多采用PAPP-A+free β -hCG+B检测,从而导致了较高的假阳性率及较低的检出率^[10]。本文通过对比孕早期胎儿血清Ih-A、PLGF水平,以及四联筛查法和二联筛查法的诊断效能,探究孕妇血清Ih-A、PLGF在诊断孕早期胎儿DS上的临床价值。

抑制素是一种由女性卵巢颗粒细胞及男性睾丸支持细胞分泌的异二聚体蛋白质激素,有Ih-A

和Ih-B2两种形式^[11]。Ih-A可抑制卵泡刺激素基因转录和促性腺激素释放激素受体,从而减少垂体促卵泡素生成和分泌^[12]。Ih-A由胎盘合体滋养层细胞合成分泌,有助于子宫内膜蜕膜化,调节妊娠期内分泌代谢,可反映胎盘功能,对维持正常妊娠、胎儿正常发育具有重要作用^[13]。有文献指出,孕育DS胎儿孕妇血清Ih-A水平明显高于正常孕妇,且该因子相对独立,不受其他血清标志物影响^[14]。本文研究结果与上述研究结果一致,实验组血清Ih-A水平明显较高,提示Ih-A可作为孕早期筛查DS的有效指标。PLGF是血管内皮生长因子(VEGF)家族中的一员,主要由合体滋养层细胞生成,可与位于滋养层细胞和血管内皮细胞的酪氨酸酶受体结合,是一个对滋养层细胞功能有自分泌作用和对血管生长有旁分泌作用的蛋白^[15]。有文献报道,孕育DS胎儿孕妇血清PLGF水平较正常孕妇低,且联合检测PLGF可增加产前DS胎儿的检出率,提高筛查效能^[16]。DS孕妇血清PLGF降低的原因可能是滋养层细胞分化障碍,造成胎盘合体滋养层细胞发育缓慢^[17]。本研究结果显示,四联筛查的敏感度和准确性明显高于二联筛查。提示Ih-A、PLGF可有效提高胎儿DS的诊断准确性。

综上所述,Ih-A、PLGF对孕早期筛查DS胎儿具有重要意义,Ih-A+PLGF+PAPP-A+free β -hCG四者联合检测可更大程度提高对DS胎儿的筛查检出率,有助于提高孕早期胎儿DS的筛查准确性,更有效预防DS患儿的出生。但本研究存在不足之处,即选取的病例数较少,因此还需增加样本量,对Ih-A、PLGF应用于孕早期筛查DS胎儿做进一步探究。

参考文献

- [1] 徐婷,刘彤.唐氏综合征产前筛查研究进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2019,35(2):247-250.

(下转第1055页)

鼻咽癌组织中 SATB1 表达与化疗耐药及预后的关系分析

杨和强 刘文峰* 胡玥

[摘要] 目的 探讨鼻咽癌(NPC)组织中富含 AT 序列的特异性结合蛋白 1(SATB1)表达情况,分析其与化疗耐药及预后的关系。方法 选取 78 例石蜡组织标本和新鲜癌组织作为 NPC 组,另 40 例石蜡组织标本作为对照组。比较 2 组 SATB1 表达情况;并分析 NPC 组织细胞对化疗药物的耐药性、SATB1 表达与 NPC 临床病理特征、化疗耐药及预后的关系。结果 NPC 组中 SATB1 蛋白阳性率为 52.56%,对照组中 SATB1 蛋白阳性率为 12.50%,NPC 组 SATB1 蛋白阳性率与定量表达水平明显高于对照组($P<0.05$);NPC N1~N3 期、M1 期 SATB1 蛋白阳性表达率与定量表达水平分别高于 N0 期、M0 期,差异有统计学意义($P<0.05$);SATB1 蛋白阳性表达组对顺铂耐药率和紫杉醇耐药率高于 SATB1 蛋白阴性表达组,差异有统计学意义($P<0.05$);生存曲线分析发现,SATB1 蛋白阳性表达组生存率为 29.64%,SATB1 蛋白阴性表达组生存率为 12.50%,差异有统计学意义($P<0.05$);生存者 SATB1 定量表达水平明显低于死亡者,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 NPC 组织中 SATB1 表达上调,高表达的 SATB1 可使肿瘤细胞对顺铂与紫杉醇产生耐药性,对预后产生不利影响。

[关键词] 鼻咽癌; SATB1; 化疗; 耐药性

Analysis of the relationship between SATB1 expression and chemotherapy resistance and prognosis in nasopharyngeal carcinoma

YANG Heqiang, LIU Wenfeng*, HU Yue

(The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan, China, 610083)

[ABSTRACT] Objective To explore the expression of special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues, and analyze its relationship with clinico-pathological features, chemotherapy resistance and prognosis. Methods 78 paraffin-embedded tissue specimens and fresh cancer tissues were selected as the NPC group, and another 40 paraffin-embedded tissue specimens were used as the control group. The expression of SATB1 was compared between the two groups. The relationship between drug resistance of NPC cells to chemotherapy drugs, the expression of SATB1 and clinico-pathological features, chemotherapy resistance and prognosis of NPC was analyzed. Results The positive rate and quantitative expression level of SATB1 protein in the NPC group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The positive expression rate and quantitative expression level of SATB1 protein at the stages of N1-N3 and M1 of NPC was higher than that at the stages of N0 and M0 ($P<0.05$). The cisplatin resistance rate and paclitaxel resistance rate in SATB1 protein positive expression group were higher than those in SATB1 protein negative expression group ($P<0.05$). Survival curve analysis showed that the survival rate in SATB1 protein positive expression group was 29.64%. Compared with the survival rate in SATB1 protein negative ex-

基金项目:四川省科技厅应用基础重点项目(2018JY0440)

作者单位:西部战区总医院耳鼻喉科,四川,成都 610083

*通信作者:刘文峰, E-mail:458099718@qq.com

pression group, there was a significant difference ($P<0.05$). The quantitative expression levels of *SATB1* in survivors were significantly lower than those in the dead ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of *SATB1* in NPC tissues is up-regulated. The high expression of *SATB1* can make tumor cells resistant to cisplatin and paclitaxel, which has an adverse effect on the prognosis.

[KEY WORDS] Nasopharyngeal carcinoma; *SATB1*; Chemotherapy; Drug resistance

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国最常见的耳鼻咽喉恶性肿瘤,中晚期NPC患者5年生存率不超过30%^[1]。NPC转移、放化疗抵抗是其治疗失败的主要原因,所以寻找与NPC侵袭转移密切相关,并能预测放化疗敏感性的基因是当前亟需解决的问题。富含AT序列的特异性结合蛋白1(special AT-rich sequence binding protein 1, *SATB1*)是核基质重要成分之一,主要表达于胸腺细胞^[2]。有研究报道^[3-4],*SATB1*在胃癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中高度表达,且与肿瘤细胞侵袭转移有关,但NPC中*SATB1*表达情况相关研究较少。本研究旨在分析鼻咽癌组织中*SATB1*表达与NPC临床特征、化疗耐药及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

以78例石蜡组织标本和新鲜癌组织(2013年1月至2015年1月本院NPC患者)作为NPC组,其中男50例,女28例,年龄20~79岁,中位年龄51岁;依据鼻咽癌TNM分期标准^[5]可知:I~II期27例,III~IV期51例,病理类型:未分化型非角化性鳞状细胞癌41例,分化型非角化性鳞状细胞癌30例,角化性鳞状细胞癌7例。另40例石蜡组织标本(取自同期鼻咽部慢性炎症患者)作为对照组,其中男23例,女17例,年龄18~77岁,中位年龄48岁。2组性别、年龄等一般资料比较无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:①NPC均经病理学检查确诊;②术前未行放化疗;③患者对本研究充分知情,并签署病人知情同意书。排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②石蜡切片质量欠佳。

1.2 主要仪器与试剂

切片机购自美国Thermo公司;TK-218型恒温摊片烤片机购自湖北孝感市泰准电子设备有限公司;倒置显微镜购自日本Olympus公司;荧光检测仪购自深圳市策谱科技有限公司。

鼠抗人*SATB1*单克隆抗体购自上海沪震实业有限公司;生物素标记的羊抗鼠IgG购自上海远慕生物科技有限公司;DAB酶底物显色试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司;ATP生物荧光肿瘤体外药敏检测(ATP-TCA)试剂盒购自北京金紫晶生物医药技术有限公司。

1.3 免疫组织化学检测

组织中*SATB1*蛋白表达情况采用免疫组织化学Envision二步法检测。石蜡组织标本进行连续切片,切片厚度控制在4 μm ,切片脱蜡、水化处理后,进行高压抗原修复,采用3%甲醇- H_2O_2 溶液封闭10 min, PBS充分淋洗。滴加山羊血清封闭10 min,然后滴加鼠抗人*SATB1*单克隆抗体(1:100稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS充分淋洗后,滴加二抗,室温孵育1 h, PBS充分淋洗。DAB显色后,苏木精染色10 s左右,冲洗干净,在不同浓度酒精(90%、95%、100%)中脱水各2 min,烘干,封片。

结果判定^[6]:细胞核染色呈棕黄色的细胞为阳性细胞,根据阳性细胞比例及细胞染色程度判断*SATB1*蛋白表达程度,无细胞染色为阴性;中等染色细胞数 $\leq 50\%$ 或强染色细胞数 $\leq 5\%$ 为弱阳性;中等染色细胞数 $> 50\%$ 或强染色细胞数 $> 5\%$ 为强阳性。

1.4 *SATB1*表达水平相对定量分析

采取实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测*SATB1*表达水平,按照 $\text{Ct}_{\text{SATB1}} = \text{Ct}_{\text{SATB1}} / \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$,算出*SATB1*相对于*GAPDH*具体相对值。

1.5 肿瘤体外药敏检测

将新鲜的瘤体组织剪碎后进行消化,在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养2~3 h,肿瘤细胞悬浮生长,制备成浓度为 $(2\sim 4) \times 10^4$ 个/孔的单细胞悬液,于96孔板中接种(进行平行重复实验),12 h后按照待测药物临床应用剂量和其相对应血浆峰值浓度(peak plasma concentration, PPC),对7种化疗药物(顺铂、卡铂、氟尿嘧啶、紫杉醇、环磷酰胺、多西他赛、

吉西他赛)分别设置5个检测浓度的培养液:200.0%、100.0%、50.0%、25%、12.5%等,对照孔不加入任何药物。将96孔板放置在温箱内(5% CO₂、37℃)静置5 d后取出,每孔加入50 μL ATP提取液,吹打混匀后,取50 μL混合液于微孔板中,并将50 μL荧光酶-荧光素工作液加入其中混合均匀,在荧光检测仪下读取数据。

耐药性评价标准^[7]:90%抑制浓度(90% inhibitory concentration, IC₉₀)>100% PPC和50%抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀)>25% PPC。IC₉₀和IC₅₀分别是90%和50%肿瘤细胞生长被抑制时的血浆峰值浓度。

1.6 随访

采用门诊或电话方式随访4个月至36个月,记录患者生存情况。

1.7 观察指标

比较NPC组和对照组中SATB1表达情况,分析SATB1表达与NPC临床病理特征(性别、年龄、病理类型、临床分期)、化疗耐药(顺铂、卡铂、氟尿

嘧啶、紫杉醇、环磷酰胺、多西他赛、吉西他赛)及预后的关系。

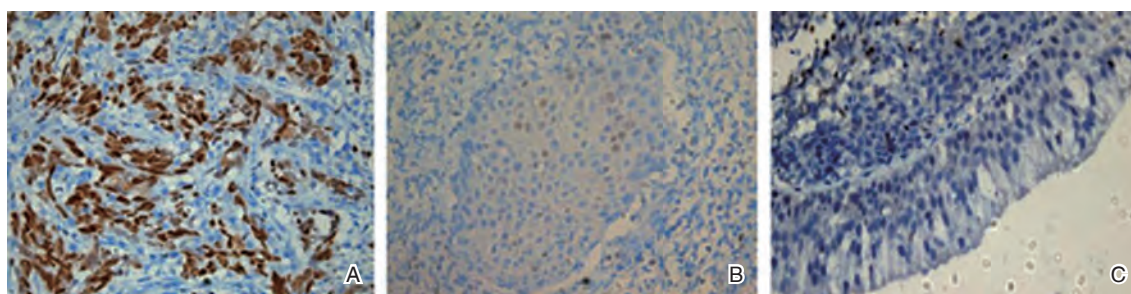
1.8 统计学分析

采用SPSS 20.0软件处理数据。计数数据以 n (%)表示,行 χ^2 检验;计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两比较使用 t 检验,多项比较使用方差分析法,生存分析采用Kaplan Merier法,组间比较采用Log-rank检验。 $P < 0.05$ 为比较有统计学意义。

2 结果

2.1 NPC组和对照组SATB1蛋白表达情况

NPC组中SATB1蛋白阳性率为52.56%(41/78)(强阳性与弱阳性表达为19例、22例),表达水平 (0.198 ± 0.036) ,鼻咽部慢性炎症组中SATB1蛋白阳性率为12.50%(5/40)(强阳性与弱阳性表达为1例、4例),表达水平 (0.051 ± 0.032) ,NPC组SATB1蛋白阳性率与定量表达水平均明显高于鼻咽部慢性炎症组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。



注:A为NPC组织中SATB1蛋白呈强阳性表达(IHC, ×400); B为NPC组织中SATB1蛋白呈弱阳性表达(IHC, ×100); C:鼻咽部慢性炎症组织中SATB1蛋白呈阴性表达(IHC, ×200)。

图1 SATB1蛋白表达情况

Figure 1 Expression of SATB1 protein

2.2 NPC组织中SATB1蛋白表达与NPC病理特征关系

NPC III~IV期、T₃~T₄期的SATB1蛋白阳性表达率与定量表达水平分别高于I~II期、T₁~T₂期,差异无统计学意义($P > 0.05$),NPC N₁~N₃期、M₁期SATB1蛋白阳性表达率与定量表达水平分别高于N₀期、M₀期,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 NPC组织中SATB1蛋白表达与化疗耐药的关系

SATB1蛋白阳性表达组对顺铂耐药率和紫杉醇耐药率高于SATB1蛋白阴性表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。顺铂与紫杉醇耐药组

SATB1定量表达水平明显高于非耐药组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

2.4 NPC组织中SATB1蛋白表达与预后的关系

SATB1蛋白阳性表达组生存率为29.64%,SATB1蛋白阴性表达组生存率为78.20%,两组生存曲线比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),生存者SATB1定量表达水平明显低于死亡者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。

3 讨论

SATB1参与多种恶性肿瘤的发生发展,其能诱导许多血管形成或转移相关蛋白上调表达,并

表1 NPC组织中SATB1蛋白表达与NPC病理特征关系 [n, (x̄±s)]

Table 1 Relationship between the expression of SATB1 protein in NPC tissues and pathological features [n, (x̄±s)]

临床特征		例数 (n=78)	SATB1 阳性 (n=41)	SATB1 阴性 (n=37)	χ ² 值	P 值	SATB1 定量 表达水平	t/F 值	P 值
性别	男	50	26	24	0.018	0.894	0.192±0.034	1.286	0.202
	女	28	15	13					
年龄(岁)	≥50	42	21	21	0.240	0.624	0.193±0.034	1.074	0.286
	<50	36	20	16					
病理类型	非角化未分化型癌	41	20	21	3.251	0.197	0.192±0.031	0.732	0.484
	非角化分化型癌	30	19	11					
	角化型鳞状细胞癌	7	2	5					
临床分期	I~II期	27	11	16	2.315	0.128	0.195±0.034	0.573	0.569
	III~IV期	51	30	21					
T分期	T1~T2	33	16	17	0.382	0.537	0.196±0.038	0.488	0.627
	T3~T4	45	25	20					
N分期	N0	32	11	21	7.200	0.007	0.186±0.031	2.566	0.012
	N1~N3	46	30	16					
M分期	M0	65	30	35	6.427	0.011	0.184±0.030	2.658	0.010
	M1	13	11	2					

表2 SATB1蛋白表达对不同化疗药物耐药性的影响

[n(%)]

Table 2 Effects of the expression of SATB1 protein on resistance to different chemotherapy drugs [n(%)]

化疗药物	SATB1 阳性 (n=41)	SATB1 阴性 (n=37)	χ ² 值	P 值
顺铂	7(17.07)	3(8.11)	4.662	0.031
卡铂	5(12.20)	5(13.51)	0.101	0.751
氟尿嘧啶	6(14.63)	7(18.92)	1.114	0.291
紫杉醇	13(31.71)	6(16.22)	16.043	0.000
环磷酰胺	10(24.39)	8(21.62)	0.504	0.478
多西他赛	20(48.78)	16(43.24)	2.879	0.090
吉西他赛	17(41.46)	12(32.43)	1.103	0.294

表3 耐药与非耐药患者SATB1定量表达水平比较

(x̄±s)

Table 3 Quantitative expression levels of SATB1 in patients with drug resistance and those without (x̄±s)

化疗药物	耐药	非耐药	t 值	P 值
顺铂	0.211±0.033	0.184±0.035	2.293	0.025
卡铂	0.203±0.041	0.193±0.031	0.913	0.364
氟尿嘧啶	0.204±0.039	0.192±0.033	1.161	0.249
紫杉醇	0.215±0.042	0.181±0.030	3.878	0.000
环磷酰胺	0.201±0.040	0.195±0.036	0.605	0.547
多西他赛	0.199±0.036	0.197±0.036	0.245	0.807
吉西他赛	0.202±0.037	0.194±0.035	0.955	0.343

抑制 CD82、BRMS1、KISS1、NME1 等抑癌基因表达^[8]。以往研究大多关于 SATB1 在乳腺癌、胃癌、肺癌、喉癌等恶性肿瘤组织中异常高表达^[9]，然而在 NPC 组织中相关报道较少。

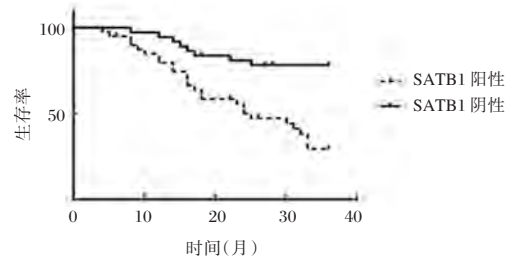


图2 Kaplan Merier 分析 SATB1 蛋白表达对 NPC 患者生存率的影响

Figure 2 Kaplan Merier analysis of the effects of SATB1 protein expression on survival rates of patients with NPC

有研究发现,肿瘤发展过程中存在一种基因调节模式,SATB1 扮演着“基因组组织者”角色,可诱导侵袭性表型出现以促进肿瘤细胞侵袭转移^[10]。有细胞实验发现,SATB1 的下调表达可抑制肿瘤细胞的侵袭转移能力^[11]。本研究发现,SATB1 表达与 N 分期和 M 分期密切相关,提示 SATB1 表达不会影响 NPC 局部浸润部位,但可能与 NPC 侵袭和转移有关,与上述研究观点相符,从侧面证实高表达 SATB1 可能是 NPC 发生转移的机制之一。另外实验结果中提示 SATB1 蛋白表达情况可一定程度上评估 NPC 预后。

多药耐药是指肿瘤细胞出现对单种化疗药物抵抗后,相继出现对其他结构功能不同化疗药物的抵抗,从而导致化疗失败。多药耐药现象与多药耐药基因、酶、肿瘤干细胞、凋亡调控基因等多

种因素相关^[12-14]。本研究结果发现,NPC对临床常用化疗药物耐药率均较低,所以临床上采用紫杉醇+氟尿嘧啶+顺铂、吉西他滨+顺铂等治疗方案对NPC患者远处转移和局部复发有一定疗效。有研究中,SATB1表达下调可增加Caspase活性,Caspase作为调控细胞凋亡的关键蛋白,可通过级联反应,增加肿瘤细胞凋亡比例^[15]。SATB1若过量表达,则会抑制Caspase的凋亡作用,导致肿瘤细胞耐药。本研究结果提示SATB1的高表达会使顺铂和紫杉醇耐药率升高。SATB1蛋白介导肿瘤细胞耐药的机制可能与其抑制凋亡和诱导P-gp表达升高有关。P-gp作为ABC转运蛋白家族成员,在ATP功能下,通过排出细胞内药物,使细胞内药物浓度降低,是公认的多药耐药产生原因之一。而有研究发现,高表达SATB1的恶性肿瘤细胞株,其P-gp表达水平明显升高,提示SATB1可诱导P-gp过量表达,从而引起耐药。

综上,SATB1在NPC组织中呈上调表达,并且与NPC侵袭转移、化疗耐药性、预后相关,高表达SATB1可促进NPC侵袭转移,引起对顺铂和紫杉醇产生耐药。然而SATB1能否可作为分子治疗靶点以降低NPC患者对顺铂和紫杉醇耐药性,还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 朱旭,曾江辉,韦强,等. 蛋白磷酸酶2A的癌性抑制因子与c-Myc在鼻咽癌组织中的表达及其相关性研究[J]. 广西医学, 2017, 39(4):457-459.
- [2] Torkildsen S, Brunetti M, Gorunova L, et al. Rearrangement of the Chromatin Organizer Special AT-rich Binding Protein 1 Gene, SATB1, Resulting from a t(3;5)(p24;q14) Chromosomal Translocation in Acute Myeloid Leukemia[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(2):693-698.
- [3] 杨飞,薛玉保. 缺氧诱导因子-1 α 与特异AT序列结合蛋白1在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 安徽医学, 2017, 38(3):345-347.
- [4] 祁洪刚. AT富集序列特异性结合蛋白1促进前列腺癌细胞增殖和侵袭的实验研究[D]. 广东:南方医科大学, 2016.
- [5] 王纾宜,朱莉,李诗敏,等. 2005年WHO鼻咽部肿瘤的分类及鼻咽癌的TNM分期[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 42(8):638-640.
- [6] Ding M, Pan J, Guo Z, et al. SATB1 is a Novel Molecular Target for Cancer Therapy[J]. *Cancer Investigation*, 2018, 36(1):1-9.
- [7] Fredholm S, Willerslev-Olsen A, Özcan Met, et al. Special AT rich-binding1 protein (SATB1) in malignant T cells[J]. *J Investigative Dermatol*, 2018, 138(8):1805-1815.
- [8] Zhang Y, Zheng L, Le M, et al. SATB1 establishes ameloblast cell polarity and regulates directional amelogenin secretion for enamel formation[J]. *BMC Biol*, 2019, 17(1):104-104.
- [9] Ptitsyna N, Boughorbel S, Anbari ME, et al. The role of alternative Polyadenylation in regulation of rhythmic gene expression[J]. *Bmc Genomics*, 2017, 18(1):576-576.
- [10] Kobierzycki C, Grzegorzolka J, Glatzelpucinska N, et al. Expression of p16 and SATB1 in Invasive Ductal Breast Cancer-A Preliminary Study[J]. *In Vivo*, 2018, 32(4):731-736.
- [11] Liao B, Wang Z, Zhu Y, et al. Long noncoding RNA DRAIC acts as a microRNA-122 sponge to facilitate nasopharyngeal carcinoma cell proliferation, migration and invasion via regulating SATB1[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):3585-3597.
- [12] 孙冰洁. 人參多糖对耐顺铂人鼻咽癌细胞耐药的逆转作用及其机制[J]. 山东医药, 2017, 57(20):31-33.
- [13] 司远征,李海朋,王建新,等. 鼻咽癌患者感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(23):5445-5448.
- [14] You Y, Li H, Chen J, et al. Zoledronic acid reverses cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma cells by activating the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Oncol Letters*, 2017, 13(3):1840-1846.
- [15] Huang B, Xiong F, Wang S, et al. Effect of SATB1 silencing on the proliferation, invasion and apoptosis of TE-1 esophageal cancer cells[J]. *Oncol Letters*, 2017, 13(5):2915-2920.

脐血 TGF- β 1、Treg 细胞数量水平对早产儿支气管肺发育不良的预测价值

林晴晴 谭卉晗 吴永芳 朱炜 黄英*

[摘要] 目的 研究脐血转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、调节性T细胞(Treg)数量水平对早产儿支气管肺发育不良(BPD)的预测价值。方法 选取本院2016年4月至2019年8月诊治的186例早产BPD患儿作为研究组,另选择同期出生的健康早产儿318例作为对照组,分析比较不同程度BPD、健康早产儿之间脐血TGF- β 1、Treg细胞水平。Spearman分析脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平与疾病严重程度相关性。结果 轻、中、重度BPD患儿脐血TGF- β 1水平比较,重度BPD>中度BPD>轻度BPD,差异有统计学意义($P<0.05$)。Treg细胞数量水平比较,轻度BPD>中度BPD>重度BPD,差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman分析显示TGF- β 1水平与BPD严重程度呈正相关,Treg细胞数量与BPD严重程度呈负相关($P<0.05$)。结论 脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平可作为早产儿发生BPD的预测指标,TGF- β 1水平升高和Treg细胞数量减少均可能增加BPD的发生风险。

[关键词] 脐血转化生长因子- β 1; 调节性T细胞; 早产儿; 支气管肺发育不良

Predictive value of TGF- β 1 and Treg cell count in umbilical cord blood for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants

LIN Qingqing, TAN Huihan, WU Yongfang, ZHU Wei, HUANG Ying*

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

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive value of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and regulatory T cell (Treg) count in umbilical cord blood (UCB) for bronchopulmonary dysplasia (BPD) in preterm infants. **Methods** 186 preterm infants with BPD who were diagnosed and treated in the hospital from April 2016 to August 2019 were selected and included in the study group. 318 healthy preterm infants who were born during the same period were selected as the control group. The TGF- β 1 and Treg cell count in UCB were compared between children with different degrees of BPD in the study group, and compared between the study group and the control group. Spearman analysis was performed to analyze the correlation between cord blood TGF- β 1, Treg cell count and severity of the disease. **Results** The order of TGF- β 1 levels in children with different degrees of BPD from high to low was as follows: severe BPD, moderate BPD, mild BPD ($P<0.05$), while the order of Treg cell count from high to low was as follows: mild BPD, moderate BPD, severe BPD ($P<0.05$). Spearman analysis showed that the TGF- β 1 level was positively correlated with the severity of BPD, and the Treg cell count was negatively correlated with the severity of BPD ($P<0.05$). **Conclusion** Cord blood TGF- β 1 and the number of Treg cells can be used as predictors of BPD in premature infants. Elevated TGF- β 1 levels and decrease in the number of Treg cells may increase the risk of BPD.

[KEY WORDS] Transforming growth factor- β 1 in umbilical cord blood; Regulatory T cell; Preterm infant; Bronchopulmonary dysplasia

基金项目:厦门市儿童医院1125人才工程项目

作者单位:厦门市儿童医院新生儿科,福建,厦门361006

*通信作者:黄英, E-mail: huangyin2912@sina.com

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是一种慢性肺部疾病,是由围产期或者分娩前生殖感染、炎症反应等因素共同作用于尚未发育成熟的肺部引起的损伤^[1]。该病多发于早产儿,近年来发生率逐渐上升,研究表明BPD在胎龄为28周以下早产儿中发生率高达40%,其发生会对患儿呼吸系统、神经系统等造成严重损害,影响患儿生存质量^[2]。故早期预测BPD发生风险对于改善患儿预后和生存质量至关重要。随着临床对于BPD的深入研究,有学者^[3]发现BPD的发生发展与生长因子信号传导以及炎症反应密切相关,转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)主要作用是促进纤维化的发生,而肺组织纤维化是BPD病理生理过程中的重要过程,也是影响人体肺部功能的关键因素^[4];而调节性T细胞(Regulatory T cells, Treg)主要通过分泌炎症因子和TGF- β 1调控机体的免疫稳态^[5]。因此本研究通过检测早产儿上述血清因子水平,旨在探讨其对BPD的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择本院2016年4月至2019年8月诊治的186例早产BPD患儿作为研究组。根据病情情况分为轻度BPD组(81例),中度BPD组(63例),重度BPD组(42例)。另选择同期在本院出生的318例健康早产儿作为对照组。其中研究组男114例,女72例;平均胎龄(30.45±0.74)周;平均出生体质量(1.34±0.03)kg;出生方式:顺产78例,剖宫产108例;新生儿评分(Apgar评分)为(5.23±1.04)分。对照组男195例,女123例;平均胎龄(30.50±0.76)周;平均出生体质量(1.32±0.04)kg;出生方式:顺产135例,剖宫产183例;Apgar评分为(5.11±1.08)分。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:①患儿出生胎龄为28~32周;②患儿临床资料完整;③出生体质量不超过1.5kg;④均在本院产科出生,且在出生后24h内进入重症监护室;⑤预计患儿生存时间在28d以上。排除先天性严重畸形患儿。研究方案已经本院伦理委员会审核通过。

BPD诊断标准^[6]。严重程度分级标准:以患儿矫正胎龄36周或出院时需要维持的氧浓度(FiO_2)为依据,其中未给予氧治疗的患儿为轻度BPD;给

予的 FiO_2 不超过30%的患儿为中度BPD;给予 FiO_2 在30%以上或则需要进行机械通气治疗患儿为重度BPD。

1.2 方法

抽取患儿脐血,离心分离取上层血清,采用酶联免疫吸附法检测各组患儿脐血TGF- β 1水平,试剂盒均由武汉中帆生物科技有限公司提供,操作步骤严格按照仪器和试剂盒使用说明书进行。采用流式细胞仪(贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司,型号为CytoFLEX)检测各组患儿Treg细胞数量。比较研究组和对照组、不同疾病严重程度BPD患儿脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平,并分析脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平与疾病严重程度之间的关系。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行数据分析。计数资料用 n 表示,采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较用 t 检验;多组间比较行 F 检验,血清指标与疾病严重程度关系采用Spearman相关性分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本资料比较

两组患儿性别、平均胎龄、出生方式、体质量以及新生儿评分比较无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

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

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

基本资料	研究组	对照组	t/χ^2 值	P 值
性别(例)	男	114(61.29)	195(61.32)	0.000 0.995
	女	72(38.71)	123(38.68)	
平均胎龄(周)	30.45±0.74	30.50±0.76	0.720	0.472
平均出生体质量(kg)	1.34±0.03	1.33±0.09	1.468	0.143
出生方式(例)	顺产	78(41.94)	135(42.45)	0.013 0.910
	剖宫产	108(58.06)	183(57.55)	
新生儿评分(分)	5.23±1.04	5.11±1.08	1.220	0.223

2.2 两组患儿TGF- β 1、Treg细胞水平比较

研究组患儿脐血TGF- β 1水平明显高于对照组,Treg细胞数量水平明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.3 不同疾病严重程度脐血TGF- β 1、Treg细胞数量水平

轻、中、重度BPD患儿脐血TGF- β 1水平比较,重度BPD>中度BPD>轻度BPD,差异有统计学意义($P<0.05$)。Treg细胞数量水平比较,轻度BPD>

中度 BPD>重度 BPD, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 2 两组 TGF- β 1、Treg 细胞水平对比 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of TGF- β 1 and Treg cell levels between the 2 groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- β 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Treg 细胞数量 ($\times 10^5$ 个/mL)
研究组	186	46.79 \pm 12.76	1.95 \pm 0.12
对照组	318	35.16 \pm 11.47	2.56 \pm 0.11
<i>t</i> 值		10.533	58.075
<i>P</i> 值		0.000	0.000

表 3 不同疾病程度 TGF- β 1、Treg 细胞水平对比 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of TGF- β 1 and Treg cell levels in cases with different severities of BPD ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- β 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Treg 细胞数量 ($\times 10^5$ 个/mL)
轻度 BPD	81	40.12 \pm 11.51	2.21 \pm 0.13
中度 BPD	63	47.52 \pm 12.37	1.84 \pm 0.11
重度 BPD	42	56.18 \pm 13.62	1.63 \pm 0.15
<i>F</i> 值		24.078	318.728
<i>P</i> 值		0.001	0.000

2.4 脐血 TGF- β 1、Treg 细胞数量水平与疾病严重程度相关性

Spearman 相关性分析显示, TGF- β 1 水平与 BPD 严重程度呈正相关 ($r=0.645, P<0.05$), Treg 细胞数量与 BPD 严重程度呈负相关 ($r=-0.768, P<0.05$)。

3 讨论

早产儿由于过早的脱离母体, 其各个器官组织发育相比于正常足月新生儿较为落后, 出生后易患多种疾病, 其中 BPD 是影响早产儿健康成长的重大疾病之一。BPD 发生受影响因素较多, 研究表明肺部发育不成熟、炎症反应、氧化应激、高浓度氧等均可能是诱因^[7], 早期给予手术治疗可有效减少患儿肺部损伤, 缓解症状。临床确诊以依赖氧治疗时间超过 28 d 为标准, 但是 BPD 患儿病理生理改变在出生后即有所变化, 因此, BPD 患儿确诊早期可能存在较为敏感血清生物标志物, 可以作为预测 BPD 发生的重要指标。

TGF- β 1 主要分布于机体肺部、肾等组织器官中, 是细胞生长、增殖等过程的重要调节生长因子, 对于肺部组织发育以及肺部功能的正常进行具有重要作用^[8]。BPD 的发生会伴随着机体肺组织的异常修复和纤维化, 与其他组织纤维化一样,

肺纤维化涉及到细胞、细胞因子等因素的共同参与, TGF- β 1 是迄今为止致纤维化作用能力最强的因子, 主要是通过促进成纤维细胞的生长增殖、分化、抑制上皮和内皮细胞的增殖, 在增加胶原蛋白合成的同时减少其降解, 达到促进肺纤维化的结果^[9]。本研究结果显示研究组患者脐血 TGF- β 1 水平明显高于对照组, 提示 TGF- β 1 参与 BPD 的发生发展过程。王慧杰^[10]等人研究也显示 BPD 早产儿 TGF- β 1 水平高于非 BPD 早产儿, 与本研究的结果一致。此外, 高阳^[11]等人通过对暴露于高氧环境下新生老鼠给予外源性 TGF- β 1 干预, 结果显示可明显阻断肺纤维化的进一步发展, 提示 TGF- β 1 因子在 BPD 患儿肺间质纤维化中具有重要作用。本研究结果提示早产儿出生时 TGF- β 1 水平越高, 发生 BPD 的可能性越高且越严重。早产儿出生后大多需要进行机械通气、吸氧等治疗, 高氧暴露会增加肺组织氧自由基水平, 一方面会直接刺激肺泡巨噬细胞, 增加 TGF- β 1 水平; 另一方面会导致组织中细胞膜过氧化物的发生, 对肺泡中多种细胞造成损伤, 增加 TGF- β 1 等细胞因子和炎性介质的释放, 促进肺纤维化的形成^[12]。

Treg 细胞是一群具有免疫调节效应的 T 细胞, 在人体内具有独特的免疫抑制作用, 随着临床对该因子的深入研究, 发现其在多种疾病的免疫学发病机制中均发挥着重要作用^[13]。BPD 发病机制中炎症反应也是重要部分, 主要是由长期用氧化导致的脂质过氧化, 从而引起机体免疫细胞、细胞因子发生变化, 而 Treg 细胞通过白细胞介素-10、TGF- β 的分泌间接的抑制机体免疫反应过高或过低状态, 保持免疫平衡^[14]。本研究结果提示 Treg 细胞数量越低, 早产儿发生 BPD 的可能性越高且越严重。引发 BPD 的炎症反应大多是由感染导致的, Treg 细胞数目减少可能与其浸润在已存在损伤的肺组织中导致, 故该因子可作为 BPD 发生的预测指标。

综上所述, 脐血 TGF- β 1、Treg 细胞数量水平可作为早产儿发生 BPD 的预测指标, TGF- β 1 水平升高和 Treg 细胞数量减少均可能增加 BPD 的发生风险, 为 BPD 的预测提供了新方法。但本研究仍存在不足之处, 因本次研究条件有限, 样本量相对较小, 患者仅局限于本院, 可能对结果造成一定偏倚, 后期还需扩大样本数目以及样本选取范围, 以提高结果准确性和可靠性。

参考文献

- [1] 赵堃, 农绍汉. 早产儿支气管肺发育不良易感基因研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(6): 476-478.
- [2] 李春杰, 肖志辉. 极低体质量早产儿支气管肺发育不良的发生率及其影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(10): 1165-1167.
- [3] 梁莹莹, 邹卉, 韩梅盈, 等. 支气管肺发育不良的病因及发病机制研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(42): 98-100.
- [4] 张丹, 于晓岩, 富建华. 转化生长因子- β 1 诱导新生大鼠肺成纤维细胞增殖的细胞周期调控研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(14): 1102-1106.
- [5] 陆云杰, 高骥, 王学浩. 调节性T细胞(Treg)中 miRNA 信号通路的研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(1): 10-14.
- [6] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学[M]. 4版, 北京: 人民卫生出版社, 2014: 416-422.
- [7] 黄静兰, 王华, 唐军, 等. 不同胎龄早产儿支气管肺发育不良的影响因素[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(14): 1073-1075.
- [8] 田新瑞, 田新利, 王慧芳, 等. β -连环素通路对转化生长因子 β 1 致肺纤维化的调控作用[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(24): 1929-1933.
- [9] 刘振中, 姜笃银, 王魏, 等. 转化生长因子- β 1 噬菌体模拟肽促进成纤维细胞增殖的效果[J]. 山东大学学报: 医学版, 2015, 53(3): 50-55.
- [10] 王慧杰, 徐艳, 王军. TGF- β 1 与 BMP-7 对早产儿支气管肺发育不良早期预测作用[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(6): 405-408.
- [11] 高阳, 刘冬云, 孔祥斌, 等. 环氧合酶2抑制剂对高氧环境下新生大鼠肺组织肺表面活性物质相关蛋白B、转化生长因子- β 1 表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(14): 1081-1085.
- [12] 张金凤, 黄润忠, 黄冠芬, 等. TGF- β 1 和 PAI-1 在早产儿支气管肺发育不良中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(08): 810-813.
- [13] 肖天津, 张乐平, 古中东, 等. Treg 细胞和 IL-12 在肺结核合并老年慢性支气管炎患者外周血中的表达及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2016, 8(03): 188-191.
- [14] 薛立军, 杜桂莲, 李思涛, 等. 脐血调节性T细胞检测在早产儿支气管肺发育不良中的预测价值[J]. 中华新生儿科杂志, 2019, 34(5): 353-357.
- [2] Lou S, Petersen OB, Kjaergaard S. National screening guidelines and developments in prenatal diagnoses and live births of Down syndrome in 1973-2016 in Denmark [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2018, 97(2): 195-203.
- [3] 杨岚, 石锦平, 吴晓, 等. 早孕期血清 PAPP-A 检测联合中孕期血清 AFP、free β -HCG、uE₃ 检测对 DS、ES 的筛查效果[J]. 山东医药, 2017, 57(35): 18-21.
- [4] Wilson G, Sairanen M, Spencer K. A technical and clinical evaluation of a new assay for inhibin A and its use in second trimester Down syndrome screening [J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(9): 1473-1479.
- [5] 黎小花, 邢娟, 张晓赞, 等. 产前唐氏综合征孕妇血清胎盘生长因子的表达及与健康孕妇孕周的关系[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(8): 1818-1821.
- [6] 谢晓媛, 刘霞, 辛力, 等. 无创DNA检测在双胎唐氏综合征产前筛查中应用价值研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(6): 650-653.
- [7] 李冬秀, 吴学威, 黄湘, 等. 中山市孕中期产前筛查指标中位数的建立及临床价值研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(4): 278-282.
- [8] 杨苑香, 曾敏, 何倩云, 等. 189例唐氏综合征产前超声表现的临床特征[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(3): 182-185.
- [9] Lambert-Messerlian GM, Eklund EE, Neveux LM, et al. Measuring maternal serum screening markers for Down's syndrome in plasma collected for cell-free DNA testing [J]. J Med Screen, 2017, 24(3): 113-119.
- [10] 赵予韬, 刘举珍, 赵新明, 等. 孕妇唐氏筛查结果中人绒毛膜促性腺激素增高与妊娠结局的关系分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(1): 26-28.
- [11] 陈益明, 褚雪莲, 卢莎, 等. 早孕期母血清 PAPP-A 联合中孕期二联产前筛查唐氏综合征和开放性神经管缺陷效率[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(7): 961-964.
- [12] Singnoi W, Wanapirak C, Sekararathi R, et al. A cohort study of the association between maternal serum Inhibin-A and adverse pregnancy outcomes: a population-based study [J]. BMC Pregnancy Child, 2019, 19(1): 124.
- [13] 张敏波, 汪锋平, 王小红. 抑制素A在孕中期唐氏综合征产前筛查中的参考价值分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(1): 38-40.
- [14] 张利, 陈咏玫, 马瑶, 等. 超声NT检查联合孕妇血清uE₃、Inhibin-A检测用于21-三体综合征筛查的意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(15): 3603-3606.
- [15] Huang T, Dennis A, Meschino WS, et al. First trimester screening for Down syndrome using nuchal translucency, maternal serum pregnancy-associated plasma protein A, free- β human chorionic gonadotrophin, placental growth factor, and α -fetoprotein [J]. Prenat Diagn, 2015, 35(7): 709-716.
- [16] Huang T, Dennis A, Meschino WS, et al. First trimester screening for Down syndrome using nuchal translucency, maternal serum pregnancy-associated plasma protein A, free- β human chorionic gonadotrophin, placental growth factor, and α -fetoprotein [J]. Prenat Diagn, 2015, 35(7): 709-716.
- [17] 许遵鹏, 孙茜, 韩瑾, 等. 11~13~(+6)孕周唐氏综合征与正常妊娠孕妇血清胎盘生长因子水平对比分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12): 1595-1597.

(上接第 1046 页)

轴突生长抑制因子 A、核因子-kB p65 对急性高血压脑出血患者病情及预后的评估

尹艳霞¹ 尚文俊^{2*} 郭华² 高桢³ 孙雪¹

[摘要] **目的** 探究轴突生长抑制因子 A(Nogo-A)、核因子-kB p65(NF-kB p65)对急性高血压脑出血(AHCH)患者病情及预后的评估价值。**方法** 选取本院2017年4月至2019年7月收治的108例AHCH患者作为研究组,另随机选取同期健康体检者108例作为对照组。检测对比两组、研究组不同病情患者血清Nogo-A、NF-kB p65水平,分析血清Nogo-A、NF-kB p65与AHCH患者病情程度的关系。研究组随访3个月,比较不同预后患者血清Nogo-A、NF-kB p65水平,分析血清Nogo-A、NF-kB p65对预后的预测价值,并采用卡普兰-迈耶曲线进行生存分析。**结果** 研究组重度患者血清Nogo-A、NF-kB p65水平>中度患者>轻度患者>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);AHCH患者病情程度与血清Nogo-A、NF-kB p65表达水平显著相关($P<0.05$);研究组预后不良患者血清Nogo-A、NF-kB p65高于预后良好患者,差异有统计学意义($P<0.05$);AHCH患者GOS评分与血清Nogo-A、NF-kB p65间存在负相关关系($P<0.05$);血清Nogo-A、NF-kB p65联合预测AHCH患者预后的曲线下面积(AUC)为0.842,大于血清Nogo-A、NF-kB p65单独预测的AUC(0.790、0.772),联合预测的最佳敏感度为72.73%,特异度为88.00%($P<0.05$);研究组血清Nogo-A、NF-kB p65高危者生存率低于低危者,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** AHCH患者血清Nogo-A、NF-kB p65表达水平与患者病情程度显著相关;其表达水平明显升高,可能增加患者不良预后发生风险;它们能辅助临床判断患者病情及预后情况。

[关键词] 急性高血压脑出血;轴突生长抑制因子A;核因子-kB p65;病情程度;预后

Evaluation value of axon growth inhibitory factor A and nuclear factor-kB p65 on the condition and prognosis of patients with acute hypertensive cerebral hemorrhage

YIN Yanxia¹, SHANG Wenjun^{2*}, GUO Hua², GAO Zhen³, SUN Xue¹

(1. Kaifeng Central Hospital Surgical Intensive Treatment Area, Kaifeng, Henan, China, 475000; 2. Department of Renal Transplantation, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052; 3. Laboratory of Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China, 450052)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the evaluation value of axonal growth inhibitory factor A (Nogo-A) and nuclear factor-kB p65 (NF-kB p65) on the condition and prognosis of patients with acute hypertensive cerebral hemorrhage (AHCH). **Methods** 108 cases of AHCH patients admitted to our hospital from April 2017 to July 2019 were selected as the research group, and 108 healthy people were randomly selected as the control group during the same period. The levels of serum Nogo-A and NF-kB p65 in patients with different conditions

基金项目:河南省科技攻关项目(192102310124)

作者单位:1. 开封市中心医院外科重症加强治疗病区,河南,开封475000

2. 郑州大学第一附属医院肾移植科,河南,郑州450052

3. 郑州大学医学院实验室,河南,郑州450052

*通信作者:尚文俊, E-mail: shangwj111@163.com

in the two groups and the research group were detected and compared, and the relationship between serum Nogo-A, NF-kB p65 and the degree of illness in AHCH patients was analyzed. The study group was followed up for 3 months to compare the serum Nogo-A and NF-kB p65 levels of patients with different prognosis, and to analyze the predictive value of serum Nogo-A and NF-kB p65 for prognosis, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** Serum Nogo-A and NF-kB p65 levels of severe patients in the study group > moderate patients > mild patients > control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The degree of illness in AHCH patients was significantly correlated with serum Nogo-A and NF-kB p65 expression levels ($P < 0.05$). Serum Nogo-A and NF-kB p65 of patients with poor prognosis in the study group were higher than those with good prognosis, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The area under the curve (AUC) of serum Nogo-A, NF-kB p65 combined to predict the prognosis of AHCH patients is 0.842, which is greater than the AUC predicted by serum Nogo-A, NF-kB p65 alone (0.790, 0.772), the best sensitivity for combined prediction The degree is 72.73%, and the specificity is 88.00% ($P < 0.05$); The survival rate of high-risk patients with serum Nogo-A and NF-kB p65 in the study group was lower than that of low-risk patients, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum Nogo-A and NF-kB p65 expression levels in AHCH patients are significantly related to the patient's condition; their expression levels are significantly increased, which may increase the risk of patients with poor prognosis; they can assist clinical judgment of patients' condition and prognosis.

[KEY WORDS] Acute hypertensive intracerebral hemorrhage; Axonal growth inhibitory factor A; Nuclear factor-kB p65; Condition; Prognosis

急性高血压脑出血 (Acute hypertensive cerebral hemorrhage, AHCH) 是高血压病最严重的并发症之一, 具有起病急骤、病情严重、致残致死率高的特点^[1-2]。目前, 临床诊断脑出血最常用的方法是头颅 CT, 但 CT 检查难以全面评估患者的病情严重程度和预测预后^[3]。近年来研究发现, 脑出血血肿周围组织核因子-kB p65 (Nuclear factor - kB p65, NF-kB p65) 表达明显增加, 与脑出血后的炎症反应有关^[4]。研究显示, 轴突生长抑制因子 A (Neurite outgrowth inhibitor A, Nogo-A) 能够抑制神经轴突的生长, 发挥促进损伤神经的恢复和生长的作用, 有助于评估 AHCH 患者病情及预后^[5-6]。为此, 本研究尝试探究 Nogo-A、NF-kB p65 对 AHCH 患者病情及预后的评估价值, 旨在为临床提供循证依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院 2017 年 4 月至 2019 年 7 月收治的 108 例 AHCH 患者作为研究组, 纳入标准: ①均符合 AHCH 诊断标准^[7]; ②首次发病; ③发病至入院 < 24 h; ④年龄 ≤ 75 岁; ⑤患者及家属知晓本研究, 已签署同意书。另随机选取同期健康体检者 108 例作为对照组, 纳入标准: ①无脑血管疾病及相关疾病史; ②认知功能良好; ③年龄 ≤ 75 岁; ④无沟通

交流障碍; ⑤知晓本研究, 已签署同意书。研究组、对照组排除标准: ①恶性肿瘤患者; ②血液系统疾病患者; ③严重感染性疾病患者; ④精神疾病患者; ⑤肝肾功能严重障碍者; ⑥传染性疾病患者。对比两组性别、年龄、体重、户籍地、合并症, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

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

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

项目	研究组 ($n=108$)	对照组 ($n=108$)	t/χ^2 值	P 值
性别(女/男)	45/63	50/58	0.470	0.493
年龄(岁)	63.29±4.14	62.37±5.18	1.442	0.151
体重(kg)	66.24±9.11	63.89±9.05	1.902	0.059
户籍地(例)				
城市	62(57.41)	67(62.04)	0.481	0.488
农村	46(42.59)	41(37.96)		
合并症(例)				
冠心病	25(23.15)	20(18.52)	0.702	0.402
糖尿病	14(12.96)	10(9.26)	0.750	0.387
高血脂	20(18.52)	16(14.81)	0.533	0.465

1.2 方法

采集两组静脉血 3 mL, 研究组于发病后 24 h 内采集, 对照组于入组后第 2 d 清晨采集, 将血液标本置于医用离心机上, 以 3 500 r/min 转速离心处理 10 min, 取血清置于 -80℃ 冷藏室备用。采用酶联免疫吸附试验检测血清 Nogo-A、NF-kB p65

水平, Nogo-A 试剂盒购自美国 Sigma 公司, NF-kB p65 试剂盒(武汉海吉力生物科技有限公司, 批号 20193401516), 仪器为酶联免疫检测仪(上海永创医疗器械有限公司生产, 型号: SM600 型), 由专业检测师严格按照试剂盒说明书完成检测。

AHCH 病情程度评估方法^[8]: 分为轻度、中度、重度。随访 3 个月, 末次随访时根据格拉斯哥预后量表(Glasgow outcome scale, GOS)^[9]评分判定患者预后情况。

GOS 评价标准^[10], 1 分: 死亡; 2 分: 植物生存, 仅伴有最小反应; 3 分: 重度残疾, 日常生活需要家属照护; 4 分: 轻度残疾, 可独立生活, 需在家属保护下工作; 5 分: 恢复良好, 能正常生活。GOS 评分 <4 分为预后不良, 4~5 分为预后良好。

1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS 22.0 软件, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验, 通过 Logistic 进行多因素回归分析, 采用 Pearson 进行相关性分析, 采用受试者工作特征曲线(Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析预测价值, 采用卡普兰-迈耶曲线分析生存情况, 采用 Log-Rank 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 3 血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 AHCH 病情程度的关系

Table 3 Relationship between serum Nogo-A、NF-kB p65 and degree of AHCH disease

变量	β 值	S.E. 值	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
Nogo-A	1.983	0.741	7.163	7.266	4.025~13.117	<0.001
NF-kB p65	1.948	0.593	10.791	7.015	3.439~14.308	<0.001

2.3 不同预后患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 水平

随访 3 个月, 预后不良患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 高于预后良好患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 不同预后患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 水平比较
[$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 4 Comparison of serum Nogo-A、NF-kB p65 levels between patients with different prognosis [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	Nogo-A (ng/mL)	NF-kB p65 (pg/mL)
预后不良患者	33 (30.56)	205.42±40.29	441.82±52.34
预后良好患者	75 (69.44)	168.28±30.06	389.30±45.18
<i>t</i> 值		5.311	5.298
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2 结果

2.1 研究组和对照组、研究组不同病情患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 水平

研究组重度患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 水平高于中度患者、轻度患者及对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组不同病情患者血清 Nogo-A、NF-kB p65 水平比较 [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

Table 2 Comparison of serum Nogo-A、NF-kB p65 levels between each groups [$n(\%), (\bar{x} \pm s)$]

组别	<i>n</i>	Nogo-A (ng/mL)	NF-kB p65 (pg/mL)
重度患者	25 (23.15)	225.41±41.19	460.03±52.30
中度患者	34 (31.48)	172.28±36.25	407.11±43.46
轻度患者	49 (45.37)	131.37±28.09	376.24±38.52
对照组	108	112.59±23.67	207.34±26.18
<i>F</i> 值		117.509	579.183
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 AHCH 病情程度的关系

以 AHCH 病情程度为因变量, 将血清 Nogo-A、NF-kB p65 作为自变量。血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 AHCH 病情程度显著相关 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 AHCH 患者 GOS 评分相关性

血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 GOS 评分呈负相关 ($r = -0.567, -0.738, P < 0.05$), 见图 1。

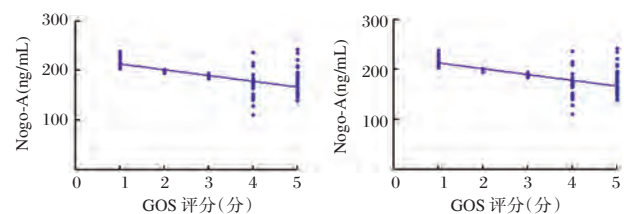


图 1 血清 Nogo-A、NF-kB p65 与 AHCH 患者 GOS 评分的相关性

Figure 1 correlation between serum Nogo-A、NF-kB p65 and GOS scores in AHCH patients

2.5 血清 Nogo-A、NF-κB p65 水平对 AHCH 患者预后预测价值

根据血清 Nogo-A、NF-κB p65 水平绘制预测 AHCH 患者预后的 ROC 曲线,显示二者联合预测的 AUC 为 0.842 (95%CI 为 0.759~0.805), Z 统计=7.860, 最佳预测敏感度为 72.73%, 特异度为 88.00% (P<0.05)。见图 2。

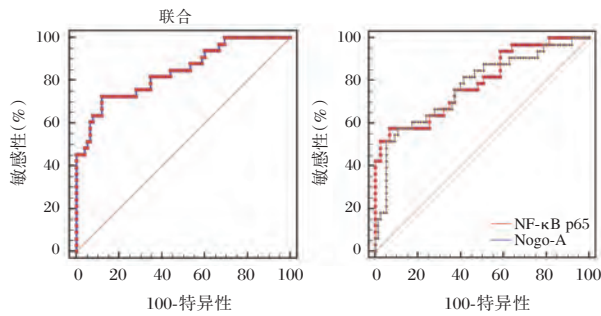


图2 血清 Nogo-A、NF-κB p65 预测 AHCH 患者预后 ROC
Figure 2 Prediction of serum Nogo-A、NF-κB p65 AHCH prognosis ROC patients

2.6 研究组生存分析

根据血清 Nogo-A、NF-κB p65 的 ROC 曲线截断值将研究组患者分为高危者、低危者。经卡普兰-迈耶曲线分析显示,血清 Nogo-A、NF-κB p65 高危者生存率低于低危者 ($\chi^2=6.820, 5.086, P=0.009, 0.024$), 见图 3。

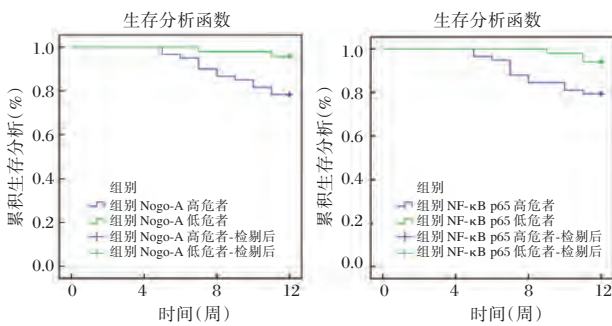


图3 研究组患者生存曲线

Figure 3 Survival curve of patients in study group

3 讨论

相关研究证实, 颅脑损伤急性发病时大量炎症因子被激活, 介导、促进脑组织继发性炎症损伤, 增加患者病死率及致残率^[11]。有报道指出, 脑出血患者发病 4 h 内, 机体大量释放白细胞介素-17, 活化的白细胞介素-17 可激活 NF-κB p65, 而 NF-κB p65 能促进 T 细胞活化, 并刺激成纤维细胞、内皮

细胞等分泌白细胞介素-6、白细胞介素-8 等炎症因子, 最终导致炎症反应发生、发展, 加重脑组织损伤^[12]。Qi KL 等^[13] 研究显示, 脑出血血肿患者 NF-κB p65 表达明显增加, 抑制 NF-κB p65 表达有助于控制脑出血后炎症反应, 支持本研究结果。本研究结果还提示, 血清 NF-κB p65 表达异常升高可能增加 AHCH 患者不良预后发生风险。经 ROC 曲线分析发现, 血清 NF-κB p65 预测 AHCH 患者预后具有一定应用价值, 但敏感度较低, 需与其他指标联合应用。

本研究结果提示, 血清 Nogo-A 水平与 AHCH 患者病情凶险程度有关。Nogo-A 是一种强烈的轴突再生抑制因子, 具有抑制轴突生长、细胞增殖的作用, 同时能刺激生长锥塌陷, 阻碍神经细胞修复和再生^[14]。相关研究指出, Nogo-A 表达量与神经中枢系统的再生能力低下密切相关^[15]。此外, Wang FB 等^[16] 通过对脑出血大鼠模型的研究显示, 脑出血大鼠的同侧海马区 Nogo-A 表达显著增加, 可能影响脑损伤的修复作用。畅涛等^[17] 通过对 82 例颅脑外伤患者的研究发现, 颅脑外伤患者血清及脑脊液中 Nogo-A 基因表达量升高, 其表达量与神经损伤程度、炎症因子含量直接相关。另外, 本研究发现血清 Nogo-A 在预测 AHCH 患者预后方面具有一定价值, 其与血清 NF-κB p65 联合预测 AHCH 患者预后的效能更高, 可为临床预测 AHCH 患者预后情况提供更准确数据参考。

综上所述, 血清 Nogo-A、NF-κB p65 表达水平与 AHCH 患者病情程度显著相关, 其表达水平升高会促使 AHCH 病情恶化、增加患者预后不良发生率, 各指标可作为临床评估患者病情程度、推测患者预后情况的参考依据。但关于 Nogo-A、NF-κB p65 参与 AHCH 脑损伤的机制尚未完全阐明, 有待后续工作中进一步深入探究。

参考文献

[1] 夏红艳, 王月微, 周妍红. 针刺对高血压脑出血患者血肿吸收及神经功能恢复的影响[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(4): 616-617.
[2] Feng Y, He J, Liu B, et al. Endoscope-Assisted Keyhole Technique for Hypertensive Cerebral Hemorrhage in Elderly Patients: A Randomized Controlled Study in 184 Patients[J]. Turk Neurosurg, 2016, 26(1): 84-89.
[3] 王少华, 王志伟, 邓灵波, 等. 24 h 内高血压性脑出血血肿增大与平扫 CT 征象的相关性[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(4): 472-478. (下转第 1068 页)

CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA 在人脑胶质瘤中的表达及预后评估价值

吕超* 孙慧渊 闫俊飞

[摘要] 目的 探讨趋化因子配体18(CCL18)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)mRNA在人脑胶质瘤(HBG)中的表达及预后评估价值。方法 选取本院124例HBG患者经手术切除的人脑胶质瘤组织作为观察组,另选取同期因脑损伤行颅内减压术切除的正常脑组织60例作为对照组。比较两组、不同临床特征患者CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA。随访3年,统计观察组中位生存期(MST),对比不同MST患者CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA表达,分析上述指标与MST的关系,并分析其对生存期的预测价值。结果 观察组CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);病理分级高级别人脑胶质瘤患者CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA表达高于低级别患者,差异有统计学意义($P<0.05$);人脑胶质瘤患者MST为33.42个月,生存期>MST患者CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA表达低于生存期 \leq MST患者,差异有统计学意义($P<0.05$);CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA表达与MST呈负相关($P<0.05$);CCL18 mRNA、HIF-1 α mRNA、MIF mRNA联合预测生存期的AUC值0.886大于任一单独检测,敏感度为80.70%,特异度为85.96%。结论 CCL18、HIF-1 α 、MIF mRNA在HBG组织内共表达,且表达程度与恶性程度及MST关系密切,可作为预测预后生存期的潜在生物标志物,并为临床靶向治疗提供新方向。

[关键词] 趋化因子配体18;缺氧诱导因子-1 α ;巨噬细胞移动抑制因子;人脑胶质瘤;中位生存期

Expression of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in human gliomas and the value of prognostic assessment

LV Chao*, SUN Huiyuan, YAN Junfei

(Military Sursery, The first hospital of zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei, China, 075000)

[ABSTRACT] Objective To investigate the expression and prognostic value of chemokine ligand 18 (CCL18), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in human brain glioma (HBG). Methods 124 cases of HBG patients with surgically removed human brain glioma tissues from our hospital were selected as the observation group, and 60 cases of normal brain tissues were selected as the control group. CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA were compared between the two groups and patients with different clinical characteristics. Followed up for 3 years, the median survival time (MST) of the observation group was compared, the expressions of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in patients with different MST were compared, the relationship between the above indicators and MST was analyzed, and the predictive value of their survival time was analyzed. Results The expression of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in the observation group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the expression of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in patients with high-grade pathological grade human glioma was higher than that in patients with low grade, the difference was statistically significant ($P<$

基金项目:张家口市科技指导性计划项目(1521034D)

作者单位:张家口市第一医院神经外科,河北,张家口 075000

*通信作者:吕超, E-mail:lc15930363785@163.com

0.05); the MST of human brain glioma patients was 33.42 months, the expression of *CCL18*, *HIF-1 α* and *MIF* mRNA in patients with survival period >MST was lower than that in patients with survival period \leq MST, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); *CCL18*, *HIF-1 α* and *MIF* mRNA expressions were negatively correlated with MST ($P < 0.05$); the combination of *CCL18* mRNA, *HIF-1 α* mRNA, and *MIF* mRNA predicted survival with a AUC value of 0.886, which was greater than any single test, with a sensitivity of 80.70% and a specificity of 85.96%. **Conclusion** *CCL18*, *HIF-1 α* , and *MIF* are co-expressed in HBG tissue, and the expression level is closely related to the degree of malignancy and MST. It can be used as a potential biomarker to predict prognosis and survival, and provide new directions for clinical targeted therapy.

[KEY WORDS] CC-chemokine ligand 18; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Macrophage migration inhibitory factor; Human brain glioma; Median survival time

人脑胶质瘤(Human brain glioma, HBG)是颅内多发、常见原发性恶性肿瘤。HBG主要恶性生物学行为是侵袭性生长,尤其是低分化HBG,可广泛浸润至临近组织,造成手术无法完全切除,而从分子靶点层面治疗利于进一步改善预后^[1]。趋化因子配体18(CC-chemokine ligand 18, CCL18)是CC趋化因子家族新发现成员,越来越多研究证明,CCL18异常表达与恶性细胞转移、浸润有关^[2]。巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种源自活化T淋巴细胞的内分泌免疫物质,在炎症反应、肿瘤发生发展过程中具双重效应。缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)在肿瘤微环境调控方面发挥重要作用,已有报道显示,HIF-1 α 在乳腺癌、前列腺等多种恶性肿瘤中异常表达,其可能与肿瘤侵袭性行为有关^[3]。本研究对三者对预后的评估价值,旨在为临床完善诊疗方案提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2013年7月至2016年7月124例HBG患者经手术切除的人脑胶质瘤组织作为观察组,另选取同期因脑损伤行颅内减压术切除的正常脑组织60例作为对照组。纳入标准:①初次发病,既往体健,无基础疾病史,且未做过放疗;②对照组首次脑损伤且既往无颅内手术史;③所用标本均取自离体1h内的组织;④患者、家属知情研究签署同意书。排除标准:①伴其他恶性肿瘤疾病者;②临床资料不完整者;③濒死状态者。观察组男66例,女58例;年龄平均(51.06 \pm 5.71)岁;病理分级^[4]:I级、II级、III级、IV级。对照组男63例,女57例,年龄平均(49.88 \pm 5.34)岁。两组年龄、性别基础资料均衡可比($P > 0.05$)。本研究经

伦理委员会批准通过。

1.2 方法

取同等量部分标本,以TRIZOL试剂盒(中国赛默飞世尔科技有限公司)分别提取总RNA,分光光度法测RNA纯度及浓度,液氮保存备用。逆转录试剂盒(Superscript)合成第一链cDNA;QPCR扩增体系10 μ L(SYBR Green Master Mix 5 μ L、正反引物各0.3 μ L、cDNA 2 μ L、无核酶水2.4 μ L);共完成39个扩增循环,逆转录30 min、50 $^{\circ}$ C;初始PCR激活15 min、95 $^{\circ}$ C;再经94 $^{\circ}$ C、60s,52 $^{\circ}$ C、60s,72 $^{\circ}$ C、60s;反应完成由QPCR仪系统(中国赛默飞世尔科技有限公司,QuantStudio™ 5型)自带软件完成基线调整、分析所获取数据,每份标本测目的基因3次,获取Ct平均值,以相对表达量计算目的基因mRNA表达量。操作均由资深专科医师规范完成。

1.3 观察指标

CCL18、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA表达量。不同临床特征患者*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA表达比较。随访3年记录中位生存期(MST)。不同MST患者*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA表达比较。分析*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA与MST的相关性。分析*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA预测生存期>MST的价值。

1.4 统计学处理

采用SPSS 21.0统计分析软件,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用LSD- t 检验。Spearman相关性系数分析相关性;ROC曲线分析预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA表达比较

观察组*CCL18*、*HIF-1 α* 、*MIF* mRNA表达高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 两组 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of *CCL18*, *HIF-1α* and *MIF* mRNA expression between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>CCL18</i> mRNA	<i>HIF-1α</i> mRNA	<i>MIF</i> mRNA
观察组	124	17.31±3.25	3.57±0.68	0.69±0.22
对照组	60	2.45±0.62	1.01±0.26	0.32±0.10
t值		35.062	28.150	12.409
P值		<0.001	<0.001	<0.001

表2 不同临床特征患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 表达对比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of *CCL18*, *HIF-1α* and *MIF* mRNA expression in patients with different clinical characteristics ($\bar{x} \pm s$)

资料	n	<i>CCL18</i> mRNA	t/F值	P值	<i>HIF-1α</i> mRNA	t/F值	P值	<i>MIF</i> mRNA	t/F值	P值	
年龄(岁)	≥50	81	17.25±3.10	0.282	0.779	3.55±1.03	0.300	0.765	0.68±0.22	0.711	0.478
	<50	43	17.42±3.37			3.61±1.12			0.71±0.23		
性别	男	66	17.48±3.25	0.593	0.554	3.59±1.06	0.216	0.829	0.71±0.23	1.006	0.316
	女	58	17.12±3.51			3.55±0.99			0.67±0.21		
肿瘤类型	星形胶质细胞瘤	72	17.35±3.09	0.014	0.986	3.56±1.04	0.067	0.935	0.68±0.21	0.201	0.818
	少突胶质细胞瘤	35	17.24±3.44			3.62±1.15			0.70±0.20		
	少突星形细胞瘤	17	17.28±3.62			3.51±1.08			0.71±0.22		
病理分级	低级别	55	14.11±2.89	8.878	<0.001	3.02±0.87	5.075	<0.001	0.43±0.13	12.236	<0.001
	高级别	69	19.86±4.05			4.01±1.22			0.90±0.26		

2.3 人脑胶质瘤患者的MST

随访3年,脱落10例。114例人脑胶质瘤患者MST为33.42个月,见图1。

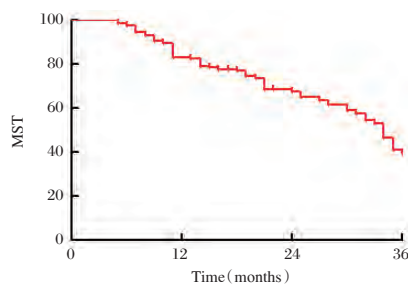


图1 人脑胶质瘤患者的MST

Figure 1 MST in patients with human glioma

2.4 不同MST患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 表达比较

生存期>MST患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 低于生存期≤MST患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.5 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 与MST的关系

CCL18、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 与MST呈负相关($P<0.05$),见表4。

2.6 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 预测生存期>MST的预测价值

分别绘制 *CCL18* mRNA、*HIF-1α* mRNA、*MIF*

2.2 不同临床特征患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 表达比较

不同年龄、性别、肿瘤类型人脑胶质瘤患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 相比,差异无统计学意义($P>0.05$);病理分级高级别人脑胶质瘤患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 高于低级别患者($P<0.05$)。见表2。

表3 不同MST患者 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of *ccl18*, *HIF-1α* and *MIF* mRNA expression in different MST patients ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>CCL18</i> mRNA	<i>HIF-1α</i> mRNA	<i>MIF</i> mRNA
生存期>MST患者	57	14.25±3.17	3.08±0.91	0.46±0.15
生存期≤MST患者	57	20.37±4.36	4.06±1.24	0.92±0.30
t值		8.571	4.810	10.354
P值		<0.001	<0.001	<0.001

表4 *CCL18*、*HIF-1α*、*MIF* mRNA 与MST的关系

Table 4 Relationship between *CCL18*, *HIF-1α*, *MIF* mRNA and MST

项目	<i>CCL18</i> mRNA		<i>HIF-1α</i> mRNA		<i>MIF</i> mRNA	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
MST	-0.712	<0.001	-0.539	<0.001	-0.684	<0.001

mRNA及三者联合预测生存期>MST的ROC曲线,得到三者联合的AUC值0.886大于任一单独检测,敏感度为80.70%,特异度为85.96%,见表5、图2。

3 讨论

HBG是最常见颅内原发性肿瘤之一,根据美国脑肿瘤注册中心统计,HBG占全部中枢神经系

表5 各mRNA ROC曲线预测价值
Table 5 ROC curve prediction value of each mRNA

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CCL18 mRNA	0.809	0.725~0.877	7.535	≤17.71	84.21	68.42	<0.001
HIF-1α mRNA	0.750	0.660~0.826	5.489	≤3.11	63.16	78.95	<0.001
MIF mRNA	0.777	0.689~0.849	6.315	≤0.67	71.93	73.68	<0.001
三者联合	0.886	0.813~0.938	12.360	-	80.70	85.96	<0.001

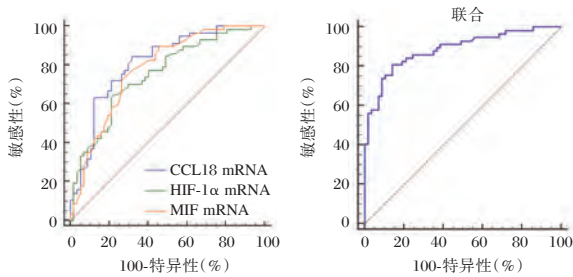


图2 CCL18、HIF-1α、MIF mRNA 预测生存期 > MST 的预测价值

Figure 2 The predictive value of CCL18, HIF-1 α and MIF mRNA in predicting survival > MST

统肿瘤的27%左右,防治形势极其严峻^[5]。相关研究证实,HBG的侵袭行为与病灶微环境关系密切,而炎症趋化因子、移动抑制因子及代谢调节因子是病灶微环境的重要组成部分,且某些相关因子可作为标志物、预后预测因子^[6]。

CCL18在正常免疫、炎症触发、血细胞及血管生成过程中扮演重要角色。越来越多试验显示CCL18与肿瘤恶性生物学行为关系密切,有学者对皮肤T淋巴瘤患者血浆、病损皮肤局部CCL18检测发现,其表达显著升高,且表达水平与病情严重程度、预后关系密切^[7];划痕试验检测CCL18对胶质瘤细胞侵袭、迁移能力的影响,随CCL18水平梯度升高,胶质瘤细胞侵袭、迁移能力显著增强,且随CCL18蛋白干预时间延长,恶性细胞迁移率亦随之升高^[8]。基于此推测,CCL18可通过调控HBG生长因子控制恶性细胞增殖及侵袭活动,在HBG病情进展中扮演重要角色。

既往研究,MIF在胶质瘤组织内高表达,且与预后关系密切^[9]。但有关MIF与HBG病理特征间关系的报道较少。此外,因MIF主要通过限制巨噬细胞活性完成促肿瘤行为,而巨噬细胞免疫行为并无特异性,无论星形胶质细胞瘤还是少突胶质细胞瘤均是异常细胞活动,若巨噬细胞生理功能受限均可增加其增殖、侵袭风险。结合学者De Vries LCS等^[10]基础研究分析,MIF介导HBG进展的机制可能

是MIF与其受体结合可激活相关信号通路,一方面可抑制巨噬细胞移动,另一方面调节血管新生、细胞增殖等一系列过程,为HBG增殖、侵袭创造条件。

肿瘤细胞增殖活跃可致细胞氧耗增加,引起病灶内部形成缺氧环境,但HIF-1α表达可提升细胞耐缺氧性。研究显示,细胞氧含量降低时,HIF-1α表达呈指数升高^[11-12]。还有研究表明,HIF-1α过表达能强化髓源性抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞免疫抑制活性,继而影响机体对肿瘤细胞的免疫应答^[13-14]。本研究亦发现,HIF-1α与CCL18、MIF具有相似生物活性,可促进HBG细胞增殖、侵袭,可能与其提高HBG细胞缺氧耐受性,强化HBG细胞增殖、侵袭能力有关。

本研究证实CCL18、HIF-1α、MIF mRNA表达量与HBG生存期关系密切。基于上述分析,CCL18、MIF mRNA、HIF-1α在HBG发病发展生理过程中可能存在不容忽视的相关联系,但本研究作为临床观察研究尚未探明内在联系,需后期针对此种机制进行基础研究进一步阐明三者间靶向分子作用机制,以便完善HBG治疗方案。

综上所述,CCL18、HIF-1α、MIF在HBG组织内共表达,且表达程度与恶性程度及MST关系密切,其可作为预测预后生存期的潜在生物标志物,并为临床靶向治疗提供新方向。

参考文献

[1] 盛旭东,李文,张俊峰,等. RNA干扰抑制癌胚抗原相关细胞黏附分子1表达对人脑胶质瘤SHG44细胞化疗敏感性的影响[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(16): 2527-2530.
[2] Wang H, Liang X, Li M, et al. Chemokine (CC motif) ligand 18 upregulates Slug expression to promote stem-cell like features by activating the mammalian target of rapamycin pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Sci, 2017, 108(8): 1584-1593.
[3] 肖栋,段建峰,梁明,等. 溶血磷脂酸受体2通过调控缺氧诱导因子-1α的表达对乳腺癌细胞转移与侵袭能力的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(10): 1849-1851.

CRP、PCT联合肺部感染评分在ICU肺部感染诊断及预后中的应用价值

黄杨 张磊 郭伟*

[摘要] **目的** 探究C反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)联合肺部感染(CPIS)评分在重症加强护理病房(ICU)肺部感染诊断及预后中的应用价值。**方法** 选取本院2016年6月至2019年10月ICU疑似肺部感染患者122例作为研究对象,根据临床确诊结果分为感染组(45例)、未感染组(77例)。比较两组血清CRP、PCT、CPIS评分,分析血清CRP、PCT与CPIS评分相关性,评价血清CRP、PCT、CPIS评分单独及联合诊断价值。随访28d,对比不同预后患者血清CRP、PCT、CPIS评分,评价三者与预后的关系,并采用Kaplan-Meier曲线进行生存分析。**结果** 感染组血清CRP、PCT水平、CPIS评分高于未感染组,差异有统计学意义($P<0.05$);Pearson相关性分析,血清CRP、PCT与CPIS评分呈正相关($P<0.05$);ROC曲线显示,血清CRP、PCT水平、CPIS评分诊断肺部感染均具有较高AUC值,尤以联合诊断最高,联合诊断AUC值为0.871;死亡患者血清CRP、PCT水平、CPIS评分高于生存患者,差异有统计学意义($P<0.05$);血清CRP、PCT水平、CPIS评分与ICU肺部感染患者预后显著相关($P<0.05$);血清CRP、PCT水平、CPIS评分高危者生存状况与低危者相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ICU肺部感染患者血清CRP、PCT水平、CPIS评分异常升高,且与预后显著相关,联合检测可提高诊断价值,为早期治疗及预后评估提供依据。

[关键词] 白三烯B4;降钙素原;临床肺部感染评分;肺部感染;诊断;预后

The application value of CRP and PCT combined with pulmonary infection score in the diagnosis and prognosis of pulmonary infection in ICU

HUANG Yang, ZHANG Lei, GUO Wei*

(Department of Intensive Care Medicine, Lujiang County People's Hospital, Hefei, Anhui, China, 231500)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application value of C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT) combined with clinic pulmonary infection score (CPIS) in the diagnosis and prognosis of pulmonary infection in intensive care unit (ICU). **Methods** From June 2016 to October 2019 in our hospital, 122 patients with suspected pulmonary infection in the ICU were selected as the research subjects, and serum CRP, PCT levels and CPIS scores were detected. According to the clinical diagnosis results, they were divided into the infected group (45 cases) and the uninfected group (77 cases). The serum CRP, PCT and CPIS scores of the two groups were compared, the correlation between serum CRP, PCT and CPIS scores was analyzed, and the value of serum CRP, PCT and CPIS scores alone and in combination was evaluated. Followed up for 28 days, the serum CRP, PCT and CPIS scores of patients with different prognosis were compared to evaluate the relationship between the three and prognosis, and Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. **Results** The levels of serum CRP, PCT and CPIS in the infected group were higher than those in the uninfected group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed

基金项目:安徽省2017年公益性技术应用研究联动计划项目(1704f0804002)

作者单位:安徽省庐江县人民医院重症医学科,安徽,合肥 231500

*通信作者:郭伟, E-mail: gw0565icu20000@126.com

that serum CRP, PCT and CPIS scores were positively correlated ($P<0.05$). The ROC curve showed that serum CRP, PCT levels, and CPIS scores had higher AUC values for the diagnosis of pulmonary infections, especially combined diagnosis, which had the highest AUC value of 0.871; serum CRP, PCT levels, and CPIS scores of dead patients were higher than those of surviving patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Serum CRP, PCT levels, CPIS scores were significantly correlated with the prognosis of patients with ICU pulmonary infection ($P<0.05$). Serum CRP, PCT levels, and CPIS scores showed significant differences in the survival status of high-risk individuals and low-risk individuals ($P<0.05$). Conclusion The serum CRP, PCT levels, and CPIS scores of patients with pulmonary infection in ICU are abnormally elevated, and are significantly related to the prognosis. Combined detection can improve the diagnostic value and provide a basis for early treatment and prognostic evaluation.

[KEY WORDS] Leukotriene B₄; Procalcitonin; Clinic pulmonary infection score; Lung infection; Diagnosis; Prognosis

重症加强护理病房(Intensive Care Unit, ICU)患者病情严重,免疫功能低下,加之广泛的侵入性医疗手段及大量免疫抑制剂、广谱抗生素应用,使肺部感染风险显著升高,导致住院时间延长,医疗费用及病死率增加^[1-2]。目前,针对肺部感染,临床表现和肺部影像学均缺乏特异性,而微生物培养需要2~3 d,早期诊断困难,导致抗生素应用延迟,不利于病情改善^[3]。近年来,C反应蛋白(C-reaction-protein, CRP)、降钙素原(Procalcitonin, PCT)作为感染相关生物学标记物应用于临床,提高对感染识别^[4-5];而临床肺部感染评分(Clinic Pulmonary Infection Score, CPIS)利于肺部感染诊断的量化^[6-7]。基于此,本研究首次尝试联合检测CRP、PCT水平及CPIS评分在ICU肺部感染诊断及预后中的应用价值,旨在为临床提供参考依据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2019年10月在本院ICU疑似肺部感染患者122例作为研究对象,均检测血清CRP、PCT水平及CPIS评分,根据临床确诊结果分为感染组(45例)、未感染组(77例)。

入选标准:①感染组均符合《中国急诊重症肺炎临床实践专家共识》中相关诊断标准^[8];②X线胸片显示肺部存在炎性病灶;③所有患者均知情并签署知情承诺书;④经本院伦理委员会批准。排除标准:①既往有重症肺炎病史;②合并其他部位感染;③恶性肿瘤及肝肾疾病;④合并严重精神障碍;⑤入住ICU前已使用抗菌药物。

1.2 方法

空腹抽取静脉血3 mL,离心(3 000 r/min,

5 min,离心半径5 cm),取血清,CRP以酶联免疫吸附法测定,PCT以化学发光免疫分析法测定,试剂盒购自深圳威点医疗科技股份有限公司。

1.3 观察指标

①两组一般资料。②血清CRP、PCT水平与CPIS评分相关性。CPIS评分:体温(12 h测得平均值):36~38℃为0分,38~39℃为1分,>39℃或<36℃为2分;X线胸片:无浸润影为0分,成斑片状的浸润影为1分,成融合片状的浸润影为2分;气道分泌物:<14为0分,≥14、非脓性为1分,≥14且为脓性为2分;氧合情况($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$):>240 mmHg或急性呼吸窘迫综合征为0分,≤240 mmHg且无急性呼吸窘迫综合征证据为2分;白细胞计数($4\sim 11$) $\times 10^9/\text{L}$ 为0分,($11\sim 17$) $\times 10^9/\text{L}$ 为1分,< $4\times 10^9/\text{L}$ 或> $17\times 10^9/\text{L}$ 为2分。③血清CRP、PCT水平、CPIS评分单独及联合对肺部感染诊断价值。④不同预后患者血清CRP、PCT水平、CPIS评分。死亡指因肺部感染而致的全因死亡。⑤血清CRP、PCT水平、CPIS评分与预后的关系。⑥生存分析。

1.4 统计学方法

使用SPSS 22.0软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验;采用Pearson相关性分析,Logistic回归分析血清CRP、PCT、CPIS评分与预后的关系,ROC曲线分析诊断价值,Kaplan-Meier生存曲线分析生存率,采用Log-Rank检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料

两组性别、年龄、体质指数、基础疾病、合并症比较,差异无统计学意义($P>0.05$);感染组血清

CRP、PCT、CPIS 评分高于未感染组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

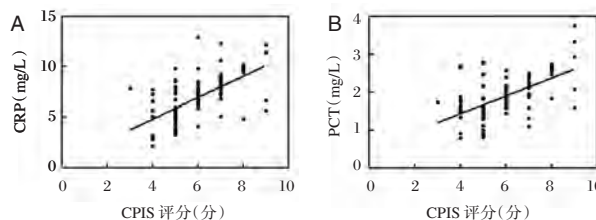
表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

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

资料	感染组 (n=45)	未感染组 (n=77)	t/ χ^2 值	P值
性别(男/女)	25/20	42/35	0.012	0.914
年龄(岁)	45.26±8.39	46.17±9.06	0.550	0.584
体质量指数 (kg/m ²)	22.86±2.04	23.04±2.25	0.441	0.660
基础疾病				
颅脑损伤	11(24.44)	20(25.97)		
慢性阻塞性肺	15(33.33)	28(36.36)	0.250	0.882
急性脑梗死	19(42.22)	29(37.66)		
合并症				
糖尿病	12(26.67)	16(20.78)	0.557	0.456
冠心病	3(6.67)	5(6.49)	0.117	0.733
CRP(mg/L)	14.38±4.26	2.41±0.75	24.093	<0.001
PCT(ng/mL)	3.82±1.03	0.78±0.21	25.091	<0.001
CPIS评分(分)	8.13±2.07	4.87±1.14	11.228	<0.001

2.2 血清CRP、PCT水平与CPIS评分相关性

Pearson相关性分析,血清CRP、PCT与CPIS评分呈正相关($r=0.574, P<0.05$),见图1。



注:A为血清CRP与CPIS评分相关性,B为PCT与CPIS评分相关性。

图1 血清CRP、PCT与CPIS评分相关性

Figure 1 Correlation between serum CRP, PCT and CPIS score

2.3 血清CRP、PCT水平、CPIS评分诊断价值

ROC曲线显示,血清CRP、PCT水平、CPIS评分诊断肺部感染均具有较高AUC值,尤以联合诊断最高,联合诊断AUC值为0.871,敏感度80.00%,特异度85.71%,见表2。

表2 血清CRP、PCT水平、CPIS评分诊断价值

Table 2 Diagnostic value of serum CRP, PCT level and CPIS score

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P值
CRP	0.793	0.711~0.861	6.256	>9.28 mg/L	64.44	90.91	<0.001
PCT	0.817	0.737~0.881	7.062	>2.28 ng/mL	75.56	84.42	<0.001
CPIS评分	0.816	0.735~0.880	7.976	>6.00分	68.89	77.92	<0.001
三者联合	0.871	0.799~0.925	10.215	-	80.00	85.71	<0.001

2.4 不同预后患者临床资料、血清CRP、PCT水平、CPIS评分

随访28d,45例ICU肺部感染患者死亡18例,生存27例。生存患者合并糖尿病、机械通气时间、侵入性操作与死亡患者比较,差异有统计学意义($P<0.05$),死亡患者血清CRP、PCT水平、CPIS评分高于生存患者,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.5 血清CRP、PCT、CPIS评分与预后的关系

偏相关性分析,将年龄、体质量指数、合并糖尿病、机械通气时间、侵入性操作等其他因素控制后,血清CRP、PCT水平、CPIS评分仍与ICU肺部感染患者预后显著相关($P<0.05$),见表4。

2.6 生存分析

根据观察组血清CRP、PCT水平、CPIS评分均数为界,分为高危、低危。Kaplan-Meier曲线分析,血清CRP、PCT水平、CPIS评分高危者生存状况与低危者相比,差异有统计学意义($\chi^2=7.234, 7.103, P=0.007, 0.008$),见图2。

表3 不同预后患者临床资料、血清CRP、PCT水平、CPIS评分比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of clinical data, serum CRP, PCT level and CPIS score of patients with different prognosis ($\bar{x}\pm s$)

资料	生存患者 (n=27)	死亡患者 (n=18)	t/ χ^2 值	P值
基础疾病				
颅脑损伤	6(22.22)	5(27.78)		
慢性阻塞性肺疾病	10(37.04)	5(27.78)	0.012	0.990
急性脑梗死	11(40.74)	8(44.44)		
合并症				
糖尿病	3(11.11)	9(50.00)	6.482	0.011
冠心病	1(3.70)	2(11.11)	0.134	0.714
机械通气时间				
≥7d	8(29.63)	12(66.67)		
<7d	19(70.37)	6(33.33)	6.000	0.014
侵入性操作				
有	9(33.33)	13(72.22)		
无	18(66.67)	5(27.78)	6.537	0.011
CRP(mg/L)	20.01±5.06	10.63±3.12	7.705	<0.001
PCT(ng/mL)	4.63±1.17	3.28±1.03	4.080	<0.001
CPIS评分(分)	9.26±1.54	7.38±1.32	4.378	<0.001

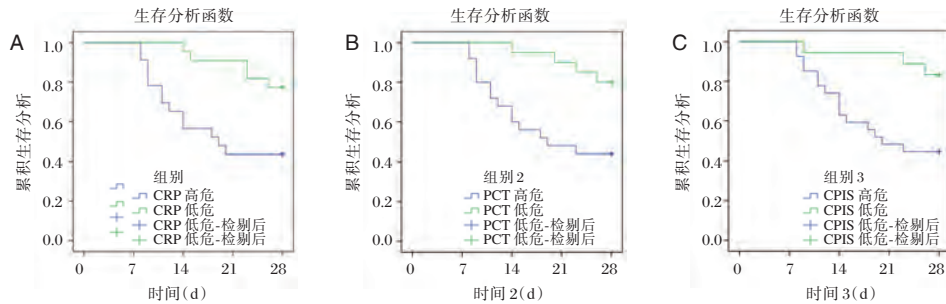
表4 血清CRP、PCT水平、CPIS评分与预后的关系

Table 4 Relationship between serum CRP, PCT level, CPIS score and prognosis

项目	β	S.E.	β (标准化)	t值	P值
常量	12.217	0.875	-	13.311	<0.001
CRP	0.752	0.031	0.804	14.009	<0.001
PCT	0.763	0.040	0.816	15.123	<0.001
CRP	0.784	0.029	0.857	17.441	<0.001

3 讨论

ICU是临床各科危重患者集中救治的专业科室,也是医院感染高发区,研究报道,肺部感染发生率可达36%左右^[9]。目前对肺部感染的早期诊断,相关临床标准及呼吸道相关微生物阳性结果,均具有其自身局限性。而感染相关生物标志物可提高临床对感染的早期识别水平^[10-11]。



注:A为CRP生存曲线;B为PCT生存曲线;C为CPIS评分生存曲线。

图2 CRP、PCT、CPIS的生存曲线

Figure 2 CRP、PCT、CPIS of Survival curve

CRP是急性时相蛋白,生理状态下其血液含量较低(正常值:0.068~8.2 mg/L),感染或组织损伤发生时,血CRP含量急剧增高,可促使补体激活,清除坏死及凋亡细胞组织,并可调节吞噬细胞的吞噬功能,可有效反映机体炎症反应程度^[12]。盛军等研究显示,ICU肺部感染患者血清CRP水平显著高于ICU非感染患者,且随病情程度加剧,其含量增高越明显^[13]。本研究结果提示对ICU肺部感染患者病情评估有一定意义,浓度越高,病情越严重,病死率越高。但作为一种非特异炎症标志物,CRP易受细菌感染以外的其他因素影响。

PCT是由116个氨基酸组成的降钙素前体蛋白,无激素活性,生理情况下由甲状腺C细胞产生,病理情况下,肝巨噬细胞、肠道及肺组织的内分泌细胞、淋巴细胞等均可产生^[14]。PCT主要在细菌内毒素等细胞因子刺激下产生,不受非感染性发热性疾病(免疫、肿瘤等)的影响,在细菌感染时显著升高,在诊断感染性疾病方面敏感性与特异性较高^[15]。肺部感染发生时,肿瘤坏死因子、脂多糖等物质诱导肝巨噬细胞、内分泌细胞、淋巴细胞、肠道组织等大量合成、分泌、释放PCT,3~6 h内即可监测到血清PCT水平显著升高,可作为评估感染病情的敏感性指标^[16]。进一

步分析发现,血清PCT水平与ICU肺部感染患者预后相关,考虑血清PCT水平越高,病情越严重,死亡率越高。

CPIS是一项综合于临床表现、影像学和微生物学,用于诊断肺部感染并评估其感染程度的评分系统^[17]。本研究结果提示血清CRP、PCT高表达可增加肺部感染发生风险。且本研究创新性尝试血清CRP、PCT与CPIS评分对肺部感染进行联合诊断,ROC曲线显示,三者联合显著优于单独诊断,提示联合检测可提高诊断价值,有利于临床及时预测与诊断肺部感染情况,为采取针对性治疗措施提供依据。本研究未详细探讨上述指标在不同部位感染程度患者中的表达情况及其检测价值,需作进一步分析与探究。

综上所述,ICU肺部感染患者血清CRP、PCT水平、CPIS评分异常升高,且与预后显著相关,联合检测可提高诊断价值,为早期治疗及预后评估提供依据。

参考文献

[1] Klouche K, Cristol JP, Devin J, et al. Diagnostic and prognostic value of soluble CD14 subtype (Presepsin) for sepsis and community-acquired pneumonia in ICU patients[J]. Ann Intensive Care, 2016, 6(1):59.

- [2] Álvarez-Lerma F, Palomar-Martínez M, Sánchez-García M, et al. Prevention of Ventilator - Associated Pneumonia: The Multimodal Approach of the Spanish ICU "Pneumonia Zero" Program[J]. Crit Care Med, 2018, 46(2): 181-188.
- [3] 刘艳丽. PCT、hs-CRP、WBC 及 NEUT 在肺部感染诊断中的临床价值[J]. 解剖学研究, 2017, 39(1): 54-57.
- [4] 杨秉融, 王瑾. 术后早期 PTX-3 及 PCT 检测对全麻妇科腹腔镜术后肺部感染的预测价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(6): 491-494, 502.
- [5] 徐萍, 伍廷平, 夏红, 等. sTRAIL、PCT、ALB 在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 746-750.
- [6] Pazos MA, Pirzai W, Yonker LM, et al. Distinct Cellular Sources of Hepoxilin A3 and Leukotriene B4 Are Used To Coordinate Bacterial - Induced Neutrophil Transepithelial Migration[J]. J Immunol, 2015, 194(3): 1304-1315.
- [7] 王舜, 彭春仙, 卢伟力, 等. 头孢吡肟联合替加环素治疗肝硬化合并肺部感染患者的效果[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(16): 2440-2444.
- [8] 中国医师协会急诊医师分会. 中国急诊重症肺炎临床实践专家共识[J]. 中国急救医学, 2016, 36(2): 97-107.
- [9] 伊怀文, 侯高林, 王刚. 综合监护室患者多重耐药菌感染现状及其耐药性分析[J]. 华南预防医学, 2017, 43(4): 356-358.
- [10] 沈锋, 吴彦其, 王亚辉, 等. CPIS 评分指导 ICU 细菌性重症肺炎患者治疗能减少抗菌药物使用持续时间及使用频度[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(5): 556-561.
- [11] 陈鹏, 庞健健, 付慧, 等. 重症肺炎患者血清氧化应激指标和炎症因子的表达及其与肺部感染评分的关系[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9): 1778-1781.
- [12] Goulart A, Ferreira C, Estrada A, et al. Early Inflammatory Biomarkers as Predictive Factors for Freedom from Infection after Colorectal Cancer Surgery: A Prospective Cohort Study [J]. Surg Infect (Larchmt), 2018, 19(4): 446-450.
- [13] 盛军, 杨新玲. PCT、CRP 的变化对肺部感染患者预后转归的临床价值[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(9): 1402-1404.
- [14] Liu LN, Wang P, Guan SY, et al. Comparison of plasma/serum levels of procalcitonin between infection and febrile disease flare in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis[J]. Rheumatol Int, 2017, 37(12): 1991-1998.
- [15] Rodríguez AH, Avilés-Jurado FX, Díaz E, et al. Procalcitonin (PCT) levels for ruling-out bacterial coinfection in ICU patients with influenza: A CHAID decision-tree analysis [J]. J Infect, 2016, 72(2): 143-151.
- [16] 林涛, 王兆丰, 李建兰, 等. 血清降钙素原水平在老年重症肺部感染患者评价中的意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(13): 1605-1607.
- [17] 郑宇, 周光耀, 陈朴, 等. CPIS 联合炎症介质水平在重症肺炎医院感染诊断中的价值与效能评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(19): 2910-2915.

(上接第 1059 页)

- [4] 李建香. 基于脑肠互动研究凉血通瘀方治疗脑出血的抗凝机制及对肠道菌群的影响[D]. 南京中医药大学, 2017.
- [5] Ömer Faruk Demirel, İhsan Çetin, Şenol Turan, et al. Decreased Expression of α -Synuclein, Nogo-A and UCH-L1 in Patients with Schizophrenia: A Preliminary Serum Study [J]. Psychiat Investig, 2017, 14(3): 344-349.
- [6] 刘畅, 王冠宇, 周昌龙, 等. 黄体酮促进脑出血后轴突再生及其相关机制[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(13): 1222-1231.
- [7] 北京市中西医结合学会神经科专业委员会. 高血压性脑出血急性期中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国全科医学, 2016, 19(30): 3641-3648.
- [8] 阳军. IL-17/NF- κ Bp65 通路相关因子对急性脑出血病情和预后的诊断价值[J]. 临床输血与检验, 2019, 21(3): 313-317.
- [9] Prasad GL, Anmol N, Menon GR. Outcome of Traumatic Brain Injury in the Elderly Population: A Tertiary Center Experience in a Developing Country [J]. World Neurosurg, 2018, 111(1): e228-e234.
- [10] 张志国, 龙飞, 夏丹丹. 出血性脑卒中急性期病人血压变化及其与预后的关系探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(17): 2562-2566.
- [11] 王宝, 孙媛, 宋康, 等. 应激性高血糖对颅脑损伤患者炎症状态和外周血乳酸、MMP-9 水平以及 28 天死亡率的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1): 39-43.
- [12] Yu ZQ, Li HK, Wang JY, et al. Expression and significance of IL-17 and NF- κ Bp65 in the tissues around hematoma of patients with acute cerebral hemorrhage [J]. Chin J Front Med Sci (Elect Ver), 2017, 9(4): 31-35.
- [13] Qi KL, Ji XZ, Kuai T, et al. Mechanism of IL-17/NF- κ Bp65 Signaling Pathway in Acute Cerebral Hemorrhage in Elderly Patients [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2016, 45(5): 509-513.
- [14] 何嘉盛, 苏春燕, 赖敏, 等. 通络化痰胶囊对 MCAO 模型大鼠皮层 Nogo-A、GAP-43 表达影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(8): 1115-1118.
- [15] 彭洁颖, 范茂丹, 张舜, 等. Nogo-A 蛋白在一氧化碳中毒大鼠海马组织中的动态表达[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(26): 5007-5010.
- [16] Wang FB, Wang QF, Zhang H, et al. Relationship study of the expressions of Slit2 and Nogo-A in rats with cerebral hemorrhage [J]. J Chin Physic, 2015, 17(2): 195-197.
- [17] 畅涛, 王莉, 赵晓平, 等. 颅脑外伤患者血清及脑脊液中 Nogo-A 基因表达量与神经损伤程度、炎症因子含量的关系[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(12): 1719-1722.

· 论 著 ·

肺炎支原体感染合并川崎病患儿血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平与冠状动脉损伤的相关性

郭璇¹ 宋瑶² 阿布来提·阿不都哈尔^{1*}

[摘要] 目的 探究肺炎支原体(MP)感染合并川崎病(KD)患儿血清白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)及白介素-10(IL-10)水平与冠状动脉损伤(CAL)的相关性。方法 收集2016年6月至2019年6月本院诊治的86例MP感染合并KD患儿(观察组)以及35例MP感染患儿(对照组)临床资料,同时依据随访情况将疾病组分为CAL组和无CAL组,比较疾病组和对照组血清IL-6、IL-8及IL-10水平、CAL发生率,单因素和二元Logistic回归分析MP感染合并KD患儿CAL发生的影响因素,Spearman参数分析MP感染合并KD患儿血清IL-6、IL-8水平与CAL发生的相关性。结果 观察组血清IL-6、IL-8水平、CAL发生率明显高于对照组,IL-10明显低于对照组($P<0.05$),疾病组性别、年龄MP感染病程比较差异无统计学意义($P>0.05$),CAL组年龄 ≥ 6 岁占比明显低于无CAL组,血清IL-6、IL-8水平明显高于无CAL组,而IL-10水平明显低于无CAL组,差异有统计学意义($P<0.05$)。二元Logistic回归分析显示年龄、血清IL-6、IL-8水平是MP感染合并KD患儿CAL发生的高危因素,而IL-10是保护因素($P<0.05$)。Spearman相关分析显示MP感染合并KD患儿血清IL-6、IL-8水平与CAL发生呈明显正相关,而IL-10水平与CAL发生呈明显负相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清IL-6、IL-8、IL-10表达水平与MP感染合并KD患儿CAL发生密切相关,积极动态监测血清IL-6、IL-8、IL-10水平,或可为MP感染合并KD患儿CAL发生的早期防治提供参考。

[关键词] 肺炎支原体感染;川崎病;IL-6;IL-8;IL-10;冠状动脉损伤

Correlation between serum levels of IL-6, IL-8 and IL-10 and coronary artery lesions in children with Mycoplasma pneumoniae infection and Kawasaki disease

GUO Xuan¹, SONG Yao², Abreti Abuduhar^{1*}

(1. Pediatric Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China, 830054; 2. Pediatric Intensive Care Unit, Pediatric Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China, 830054)

[ABSTRACT] Objective To investigate the correlation between levels of serum interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) and coronary artery lesions (CAL) in children with Mycoplasma pneumoniae (MP) infection and Kawasaki disease (KD). Methods The clinical data of 86 children with MP infection and KD (disease group) and 35 children with MP infection (control group) diagnosed and treated in the hospital between June 2016 and June 2019 were collected. Children in the disease group were divided into the CAL group and the non-CAL group according to the follow-up results. Serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels and the incidence rate of CAL were compared between the disease group and the control group. Univariate and bivariate Logistic regression analyses were performed to analyze the factors influencing

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C188)

作者单位:1. 新疆医科大学第一附属医院儿科中心,新疆,乌鲁木齐 830054

2. 新疆医科大学第一附属医院儿科中心儿科重症监护病区,新疆,乌鲁木齐 830054

*通信作者:阿布来提·阿不都哈尔, E-mail: upcp@163.com

the incidence of CAL in children with MP infection and KD. Spearman analysis was conducted to analyze the correlation between serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels and occurrence of CAL in children with MP infection and KD. **Results** Serum IL-6 and IL-8 levels and the incidence rate of CAL in the disease group were significantly higher than those in the control group, while IL-10 levels were significantly lower than that in the control group ($P<0.05$). There was no significant difference in gender, age or duration of MP infection in the disease group ($P>0.05$). The proportion of children not younger than 6 years old and IL-10 levels in CAL group were significantly lower than those in the non-CAL group, while levels of serum IL-6 and IL-8 were significantly higher than those in the non-CAL group ($P<0.05$). Bivariate Logistic regression analysis showed that age, serum IL-6 and IL-8 levels were high risk factors for CAL in children with MP infection and KD, but IL-10 was a protective factor ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that the levels of serum IL-6 and IL-8 in children with MP infection and KD were significantly positively correlated with the occurrence of CAL ($P<0.05$), while IL-10 level was significantly negatively correlated with the occurrence of CAL ($P<0.05$). **Conclusion** Serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels are closely related to the occurrence of CAL in children with MP infection and KD. It is necessary to pay more attention to young children and actively monitor the serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels, which may provide reference for early control of CAL in children with MP infection and KD.

[KEY WORDS] Mycoplasma pneumoniae infection; Kawasaki disease; IL-6; IL-8; IL-10; Coronary artery lesion

川崎病(Kawasaki disease, KD)为儿科常见病,发病与细菌、病毒感染密切相关,免疫损伤以及免疫系统高度活化等为本病的主要特征,冠状动脉损伤(Coronary artery lesions, CAL)是其最严重并发症之一,而CAL被视为引起儿童后天性心脏病的重要原因,严重威胁小儿生命健康^[1-2]。肺炎支原体感染(Mycoplasma pneumoniae, MP)是引起KD患儿呼吸系统疾病的关键,有研究表明肺炎支原体感染对CAL有明显促进作用,其可促进动脉粥样斑块破裂而诱发一系列炎性和应激反应,最终增加患儿心肌梗死的风险^[3],因此早期预测肺炎支原体合并KD患儿CAL发生风险,对合理防治方案的制定有重要临床意义。现阶段临床对KD诊断主要通过临床症状及体征变化、实验室指标变化等来评估,尚缺乏特异性指标,随着临床对KD分子生物学致病机制认识地不断加深,近期有文献报道KD患儿血清白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)及白介素-10(IL-10)等因子异常变化,在KD诊断和病情评估中有重要临床意义^[4-5]。为此本文展开临床对照性研究,旨在为KD患儿早期合理治疗方案的制定提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2016年6月至2019年6月本院诊治的86

例MP感染合并KD患儿(观察组)以及35例MP感染患儿(对照组)临床资料,疾病组男49例、女37例,年龄(5.06 ± 1.03)岁,MP感染病程(6.19 ± 1.03)天,对照组男19例、女16例,年龄(5.03 ± 1.01)岁,MP感染病程(5.99 ± 1.04)天,符合美国心脏协会制定的有关KD诊断标准^[6]。

纳入标准:①符合上述诊断标准^[6];②初次发病;经心电图、心肌酶谱检查排除其他因素所致心肌损害;③无抗生素以及皮质类固醇类激素使用史;④临床资料以及随访资料完整。排除标准:①存在慢性疾病或其他疾病等;②合并有肿瘤、血液病或先天性畸形或重要脏器功能障碍;③合并先心病;无法配合完成超声心电图等检查。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已获本院医学伦理委员会批准同意。

1.2 试剂/仪器

①主要试剂:血清IL-6、IL-8及IL-10检测试剂盒(购自北京百晶生物技术有限公司)②主要仪器:全自动酶标仪(法国Biomerieux公司提供,型号为mini-VIDAS),彩色多普勒超声仪(美国GE公司生产,型号为LOC-ZQ9)。

1.3 方法

①治疗前后采集病例患儿晨起空腹静脉血5 mL,置于抗凝管中,常规离心(3 500 rpm)分离血清,取血清2 mL,低温保存待测,酶联免疫吸附法检测两组血清IL-6、IL-8及IL-10水平。②冠状动

脉损伤情况检测:病例患儿均行心脏超声和心电图检查,心脏彩色多普勒超声仪(探头频率为2~5 MHz)检测所有患儿冠状动脉损伤情况,根据冠状动脉病变程度进行分类^[7],分为0度、1度、2度、3度。冠脉损伤率=(1度+2度+3度)/总例数×100%。其中将1~3度冠状动脉病变归为CAL组,0度归为无CAL组。③临床资料收集:收集入组病例患儿性别、年龄、病程、体重等一般资料以及红细胞数、白细胞数、中性粒细胞数、血红蛋白等实验室检测指标。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行分析,计量资料以

($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较行独立样本 *t* 检验;计数资料以 *n*(%)进行描述,行 χ^2 检验,二元 Logistic 回归分析 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的影响因素;相关性分析采用 Spearman 相关分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般基线比较

观察组血清 IL-6、IL-8 水平、CAL 发生率明显高于对照组,IL-10 明显低于对照组,差异有统计学意义 (*P*<0.05),疾病组性别、年龄、MP 感染病程比较差异无统计学意义 (*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组一般基线比较 [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

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

分类	疾病组(<i>n</i> =86)	对照组(<i>n</i> =35)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值	
性别	男	49(56.98)	19(54.29)	0.073	0.787
	女	37(43.02)	16(45.71)		
年龄	≥6岁	36(41.86)	11(31.43)	1.140	0.286
	<6岁	50(58.14)	24(68.57)		
MP 感染病程(d)	6.19±1.03	5.99±1.04	0.966	0.336	
IL-6(pg/mL)	105.64±10.43	65.23±6.29	21.363	0.000	
IL-8(pg/mL)	99.34±7.26	52.31±5.19	34.834	0.000	
IL-10(pg/mL)	14.36±1.53	29.29±2.45	40.461	0.000	
CAL 发生率	24(27.91)	2(5.71)	7.262	0.007	

2.2 影响 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的单因素分析

CAL 组年龄≥6岁占比明显低于无CAL组,血

清 IL-6、IL-8 水平明显高于无CAL组,而 IL-10 水平明显低于无CAL组,差异有统计学意义 (*P*<0.05),见表 2。

表 2 影响 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的单因素分析 [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 Single factor analysis of the occurrence of CAL in children with MP infection on and KD [*n*(%), ($\bar{x} \pm s$)]

分类	<i>n</i>	CAL 组(<i>n</i> =24)	无CAL组(<i>n</i> =62)	χ^2 / <i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别(男)	49	11(45.83)	38(61.29)	1.686	0.194
年龄(≥6岁)	36	5(20.83)	31(50.00)	6.048	0.014
MP 感染病程(d)	86	6.11±1.00	6.23±1.06	0.478	0.634
体重(kg)	86	29.32±3.06	30.06±2.99	1.023	0.309
红细胞数(×10 ⁹ /L)	86	4.24±1.03	3.99±1.04	1.003	0.319
白细胞数(×10 ⁹ /L)	86	8.25±1.06	7.98±1.03	1.082	0.283
中性粒细胞(×10 ⁹ /L)	86	4.03±1.01	3.86±0.99	0.710	0.480
血红蛋白(g/L)	86	128.24±10.65	130.24±9.99	0.818	0.416
IL-6(pg/mL)	86	111.61±10.59	94.64±8.41	7.792	0.000
IL-8(pg/mL)	86	103.14±8.66	81.05±7.04	12.222	0.000
IL-10(pg/mL)	86	10.16±1.23	15.36±1.70	15.734	0.000

2.3 影响 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的二元 Logistic 回归分析

以 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生情况为应变量(有CAL发生=1、无CAL发生=0),年龄(<6岁=1、≥6岁=0)、血清 IL-6、IL-8、IL-10 水平

(均以实际检测值为准)为自变量,进行二元 Logistic 回归分析,结果显示年龄、血清 IL-6、IL-8 水平是 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的高危因素,而 IL-10 则是保护因素,见表 3。

表3 影响MP感染合并KD患儿CAL发生的二元 Logistic 回归分析

Table 3 Binary logistic regression analysis of the occurrence of CAL in children with MP infection and KD

项目	β	Wald/ χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
年龄	-0.521	14.894	0.594	0.456~0.774	0.000
IL-6	0.624	9.176	1.866	1.246~2.795	0.002
IL-8	0.619	8.062	1.857	1.211~2.847	0.005
IL-10	-0.629	4.561	1.906	1.055~3.445	0.033

2.4 血清IL-6、IL-8、IL-10水平与CAL发生率相关性分析

Spearman 相关分析显示 MP 感染合并 KD 患儿血清 IL-6($r=0.593$)、IL-8($r=0.615$)水平与 CAL 发生呈明显正相关,而 IL-10($r=-0.638$)水平与 CAL 发生呈明显负相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

KD 患儿临床转归良好,但治疗不及时心血管损害发生率约为 10%~45%,CAL 已成为 KD 患儿最为严重并发症之一^[8-9]。文献报道 CAL 诊治不及时会逐步出现冠状动脉阻塞、狭窄以及钙化和血栓形成等,增加小儿死亡风险^[10]。研究表明 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生感染后机体炎症反应以及免疫损伤性血管炎随之加重,肺炎支原体感染可引起 KD 合并 CAL 患儿心功能损害并降低患儿免疫力^[11],另有研究指出病原菌感染与 KD 发病密切相关,可增加冠状动脉损伤风险^[12],而这些病理过程会引起血清炎症反应,推测 IL-6、IL-8 与 CAL 的发生有关。KD 患者 CAL 发生可能与 T 细胞免疫调节功能失衡有关,IL-10 作为调节性 T 细胞分泌的抑制性调节因子,研究发现 IL-10 在 KD 合并 CAL 患儿血清中含量高^[13]。故而我们推测病原感染时免疫反应的细胞因子不仅参与 MP 感染致病过程,也与 MP 感染合并 KD 的患儿有关。

本研究结果表明 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生风险明显高(为 27.91%),较廉婕等^[14]研究证实的幽门螺杆菌感染合并 KD 患儿 CAL 发生率 42.86% 低,可能与两项研究中患儿感染的病原微生物不同有关,说明临床需重视对 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的早期预测。研究证实 KD 发病中免疫功能低下及其产生的细胞因子活性与 CAL 发生密切相关^[15],年龄低下患儿各器官发育尚不成熟,机体抵抗力低,发生 CAL 风险相对更

高,提示临床工作中需加强对年龄较小 MP 感染合并 KD 患儿的重视,积极预防 CAL 发生。IL-6 属于一种促炎因子,其可刺激 T 淋巴细胞增殖以及 B 细胞增殖分化,引发免疫损伤,IL-6 水平与 CAL 发生风险密切相关^[16]。IL-8 可趋化并激活中性粒细胞,加重血管炎性损害,在炎症诱发细胞因子级联反应中发挥重要作用^[17],故而推测血清 IL-8 水平与 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生密切相关。IL-10 主要由单核/巨噬细胞、B 细胞分泌,其可调节 T 细胞以及 B 细胞和 NK 细胞等的产生,抑制多种免疫活性细胞因子的表达、抑制炎症性细胞因子分泌,具备免疫细胞以及免疫分子的双向调节作用,对心肌有保护作用^[18],故而推测血清 IL-10 水平与 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生率存在明显的负相关。

基于以上分析,年龄、血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平均为 MP 感染合并 KD 患儿 CAL 发生的影响因素,加强对低龄 MP 感染合并 KD 患儿血清 IL-6、IL-8 及 IL-10 水平的监测,或可为 MP 感染合并 KD 患儿早期防治提供参考。

参考文献

- [1] Gulcin Bozlu, Derya Karpuz, Olgu Hallioglu, et al. Relationship between mean platelet volume-to-lymphocyte ratio and coronary artery abnormalities in Kawasaki disease [J]. *Cardiol in the Young*, 2018, 28(6): 1-5.
- [2] Tang Y, Yan W, Sun L, et al. Coronary artery aneurysm regression after Kawasaki disease and associated risk factors: a 3-year follow-up study in East China [J]. 2018, 14(6): 1-7.
- [3] 李立学,王涛,王平康,等. 外周血红细胞分布宽度和支原体肺炎重症感染患儿心脏疾病的关系研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(13): 2033-2036.
- [4] 沈杨,单晶,刘光辉,等. 丙种球蛋白联合阿司匹林肠溶片治疗川崎病的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 16(23): 2347-2350.
- [5] 王丽娜,张丽华,杨峰. 冠心康对高脂血症大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 14(9): 737-742.
- [6] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Statement for Health Professionals From the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association [J]. *Pediatrics*, 2004, 114(6): 1708-1733.
- [7] 刘芳,李晓春. 细胞因子谱、降钙素原、D-二聚体对预测小儿川崎病冠脉损伤的临床意义 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(8): 1499-1502.

(下转第 1094 页)

· 论 著 ·

血清 PAPP_A、free β -hCG 及 PLGF 联合检测在孕早期唐氏综合征筛查诊断中的应用价值

贾广珠^{1,2} 王恒会² 王丽² 叶元华^{3*}

[摘要] 目的 分析血清妊娠相关蛋白 A(PAPP_A)、游离人绒毛促性腺激素 P 亚单位(free β -hCG)和胎盘生长因子(PLGF)联合检测在孕早期唐氏综合征筛查诊断中的应用价值。方法 选取 2017 年 6 月至 2019 年 6 月于本院接受早期唐氏筛查的孕妇 206 例,其中产前绒毛、脐血和羊水染色体核型分析符合唐氏综合征胎儿诊断标准的孕妇作为病例组($n=54$),孕育正常儿孕妇为对照组($n=152$)。比较两组间 PAPP_A、free β -hCG 及 PLGF 浓度水平,对比二联检测及三联检测的检出率和假阳性率。结果 病例组血清 PAPP_A 和 PLGF 的 MOM 值较对照组低,Free β -hCG 的 MOM 值较对照组高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。以截断值 $\geq 1:270$ 为高风险时,血清三联筛查(PAPP_A+Free β -hCG+PLGF)的检出率较二联筛查(PAPP_A+Free β -hCG)高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。且当假阳性率设定为 5%、8%时,血清三联筛查的检查率均高于血清二联筛查;当检出率设定为 80%、90%时,血清三联筛查的假阳性率均高于血清二联筛查,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 孕育唐氏患儿孕妇血清 PAPP_A、free β -hCG 及 PLGF 较正常孕妇均存在明显异常,血清 PAPP_A、free β -hCG 联合 PLGF 可提高孕早期唐氏筛查的检出率、降低假阳性率,对唐氏胎儿的鉴别和诊断有重要价值。

[关键词] PAPP_A; free β -hCG; PLGF; 唐氏综合征

Application value of combined detection of serum PAPP_A, free β -hCG, and PLGF in the diagnosis of Down Syndrome in early pregnancy

JIA Guangzhu^{1,2}, WANG Henghui², WANG Li², YE Yuanhua^{3*}

(1. Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266071; 2. Department of Obstetrics, Zaozhuang Maternal and Child Health Hospital, Zaozhuang, Shandong, China, 277100; 3. Department of Obstetrics, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China, 266071)

[ABSTRACT] Objective To analyze the application value of combined detection of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP_A), free human chorionic gonadotropin hormone β subunit(free β -hCG), and placental growth factor (PLGF) in the diagnosis of Down syndrome in early pregnancy. Methods 206 pregnant women who had undergone early Down's screening in our hospital from June 2017 to June 2019 were selected. Pregnant women whose prenatal villus, umbilical cord blood, amniotic fluid and karyotype analysis met the diagnostic criteria of Down's syndrome were selected as the patients group ($n=54$), pregnant women with normal babies were selected as the control group ($n=152$). The levels of PAPP_A, free p-hCG and PLGF were compared between different groups. The detection rate and false positive rate of the double detection and triple detection were compared. Results The MOM values of serum PAPP_A and PLGF in the patients group were lower than those in the control group, and the MOM value of free β -hCG was higher than that in the con-

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS191)

作者单位:1. 青岛大学, 山东, 青岛 266071

2. 枣庄市妇幼保健院产科, 山东, 枣庄 277100

3. 青岛大学附属医院产科, 山东, 青岛 266071

*通信作者:叶元华, E-mail:yeyuanhua8067@126.com

trol group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). When the cut-off value $\geq 1:270$ was considered high risk, the detection rate of serum triple screening (PAPPA + Free β -hCG + PLGF) was higher than that of double screening (PAPPA + Free β -hCG), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). And when the false positive rate was set as 5% and 8%, the detection rate of serum triple screening was higher than that of serum double screening. When the detection rate was set as 80% and 90%, the false positive rate of serum triple screening was higher than that of serum double screening, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Conclusion The serum PAPPA, free β -hCG and PLGF of pregnant women with Down's syndrome are significantly abnormal compared with normal pregnant women. The combination of serum PAPPA, free β -hCG and PLGF can increase the detection rate of Down's screening in early pregnancy and reduce the false positive rate. The identification and diagnosis of fetuses has important value.

[KEY WORDS] PAPPA; Free β -hCG; PLGF; Down syndrome

唐氏综合征(Down syndrome, DS)又称先天愚型或Down综合征,是染色体数量异常引起的疾病。存活的唐氏综合征患者可出现特殊面容、智力落后、生长发育障碍、多发畸形和其他器脏的异常等表现,同时患者肥胖、白血病、自体免疫疾病、糖尿病和脊髓增生等疾病的发病率都会高于正常人群^[1]。妊娠相关蛋白A(pregnancy-associated plasma protein A, PAPPA)、游离人绒毛促性腺激素P亚单位(Free beta-human chorionic gonadotrophin, free β -hCG)是早期唐氏综合征筛查的主要检测项目,然而该方式在临床中诊断DS中常存在假阳性高和检出率低的弊端,因此寻找新的指标进行联合筛查已引起广泛的关注^[2]。胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)是胎盘内的一种同型二聚体蛋白,参与胎盘血管的生成,对滋养层细胞功能也具有独特的调节作用^[3]。国外相关研究发现孕育唐氏儿的孕妇血清中PLGF浓度出现异常改变,提出可将其加入孕早期唐氏综合征筛查诊断之中,以提高检查率^[4]。本研究选分析血清PAPPA、free β -hCG及PLGF联合检测在孕早期唐氏综合征筛查诊断中的应用价值,旨在为唐氏综合征早期筛查手段提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究为期两年(2017年6月至2019年6月),研究对象为于本院接受早期唐氏筛查的206例孕妇。纳入标准:①所有孕妇临床资料完整,均签署知情同意书;②所有孕妇血清采集时间为孕11-13⁺₆;③孕妇年龄为18~45岁;④单胎妊娠;⑤本研究已通过医学伦理委员会批准。排除标准:①非自然受孕的孕妇;②多胎妊娠;③合并高血压、糖尿病、甲状腺功能异常病史的孕妇;④存在酗酒史、过度肥胖史的孕妇;⑤存在唐氏患儿生育史的孕妇;⑥颈项透明层检查有水囊瘤的孕妇。

将所有研究对象分为二组:产前绒毛、脐血和羊水染色体核型分析符合唐氏综合征胎儿诊断标准^[5]的孕妇作为病例组($n=54$);孕育正常儿孕妇为对照组($n=152$)。病例组与对照组的匹配条件:①每一份阳性样本对应3份对照样本;②储存时间相差在0~6月以内;③孕周相差 ± 3 天。两组一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表1。

表1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

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

组别	预产年龄(岁)	孕周(天)	体重(kg)	样本贮存时间(月)	吸烟史(%)	自然受孕(%)
病例组($n=54$)	32.67 \pm 3.71	86.57 \pm 4.53	54.91 \pm 6.83	23.57 \pm 9.75	0	100.00
对照组($n=152$)	32.55 \pm 3.79	87.13 \pm 4.31	55.12 \pm 6.77	23.81 \pm 9.62	0	100.00
<i>t</i> 值	0.201	0.809	0.195	0.157	-	-
<i>P</i> 值	0.841	0.419	0.845	0.876	-	-

1.2 方法

1.2.1 血清PAPPA、Free β -hCG浓度检测

于孕11-13⁺₆周采集孕妇外周静脉血3 mL,离心

(3 500 r/min, 2 min)取上清液在-20℃中保存,采用时间分辨荧光免疫法进行血清PAPP、Free β -hCG的检测。选择Wallac AutoDEFLA 1235型全自动时

间分辨免疫荧光检测仪,试剂盒来自芬兰 Perkin Elmer 公司,严格按照试剂盒使用说明书操作。

1.2.2 血清 PLGF 浓度检测

于孕 11-13⁺周采集孕妇外周静脉血 1.5 mL,离心(3 500 r/min, 2 min)取血清在-20℃中保存。测量前一天将样本转移至 4℃环境中进行初步复溶,测量当日转移至室温(26℃)中二次复溶(0.5 h),待血清完全溶解后,使用移液枪吸取 500 μL 至量杯中,等待检测。

1.3 高风险判断

B 超检查测量所有孕妇孕周,记录所有孕妇体重、预产年龄、吸烟史、既往疾病史、异位妊娠等情况,结合血清 PAPP_A、Freeβ-hCG、PLGF 校正后的中位数(multiples of the median, MoM)等数据。通过 lifecycle 软件计算唐氏综合征的患儿的发生风险,以截断值≥1:270 为高风险^[8]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计数资料以 n(%)表示,采用 χ² 检验,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)描述,行 t 检验;各指标中位数 MOM 值间比较采用 Mann-Whitney 检验;以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清学指标 MOM 比较

病例组血清 PAPP_A 和 PLGF 的 MOM 值较对照组低,Freeβ-hCG 的 MOM 值较对照组高,差异具有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 两组血清学指标 MOM 比较

Table 2 Comparison of serological indicators MOM in the two groups

组别	n	PAPP _A (mU/L)	Free β-hCG (ng/mL)	PLGF (pg/mL)
病例组	54	1.13±0.65	2.03±1.01	1.07±0.23
对照组	152	1.79±0.89	2.95±1.27	1.89±0.45
t 值	-	4.993	4.808	12.796
P 值	-	0.001	0.001	0.001

表 4 不同假阳性率或检出率血清三联筛查与二联筛查的结果比较

Table 4 Comparison of the results of triple screen and double screen with different false positive rate or detection rate

类别	二联筛查		三联筛查		χ ² 值	P 值
	检出率(%)	假阳性率(%)	检出率(%)	假阳性率(%)		
假阳性率	5%	77.78	92.59		4.696	0.030
	8%	85.19	98.15		5.939	0.015
检出率	80%			1.85	4.860	0.027
	90%			3.70	3.967	0.046

2.2 血清三联筛查与二联筛查的检出率

以截断值≥1:270 为高风险时,血清三联筛查(PAPP_A+Freeβ-hCG+PLGF)的检出率较二联筛查(PAPP_A+Freeβ-hCG)高,差异具有统计学意义(χ²=4.267, P=0.039)。见表 3。

表 3 血清二联筛查与三联筛查的检出率比较

Table 3 Comparison of the detection rate between the two combined screening and the three combined screening

类别	DS (n)	正常 (n)	总计 (n)	检出率 (%)	假阳性率 (%)
二联筛查	高风险	41	7	50	75.93
	低风险	13	145	156	4.61
三联筛查	高风险	49	6	53	90.74
	低风险	5	146	153	3.95

2.3 不同假阳性率或检出率血清三联筛查与二联筛查的结果比较

当假阳性率设定为 5%、8%时,血清三联筛查的检查率均高于血清二联筛查;当检出率设定为 80%、90%时,血清三联筛查的假阳性率均高于血清二联筛查,差异有统计学意义(P<0.05),见表 4。

3 讨论

DS 是最常见的染色体异常病,患者的典型症状是智力残障、面部异样症状及婴儿时期的肌无力症等^[7]。DS 形成的直接原因是卵子在减数分裂时 21 号染色体不分离,形成异常染色体,导致患者产生具有 47,XX(XY),+21 特殊核型^[8-10]。目前关于 DS 的确切发病机制尚未明了,但魏新亭等^[12]通过收集 91 名确诊为 DS 患儿的母亲的临床资料与同期 89 例正常儿母亲进行对比,发现孕妇年龄、叶酸水平、吸烟史均是导致 DS 患儿发生的影响因素,并且孕妇血清中部分微量元素也影响 DS 患儿的发生。

预防 DS 对实现优生优育有重要意义,关于 DS 的早期筛查手段也随着医疗技术的发展而不断进步。胎儿颈部透明区(nuchal translucency, NT)

指10~13孕周胎儿颈项喉部流动性半透明蛋白膜,相关研究显示胎儿NT厚度异常表现时,其出现DS的机会将高出13倍,即NT厚度与胎儿DS缺陷正相关,因此对NT值进行筛查对检出DS胎儿有重要价值^[11]。然而NT值检测存在一定难度,需要一定技术要求和质量控制,往往需要拥有专业技术资格和资质的超声医师进行^[12]。但多数基层卫生机构往往缺乏开展NT检测的客观条件,因此血清学筛查逐渐进入人们的视野。冯广满等^[13]通过对780例孕妇的临床资料进行统计分析,发现DS血清学检测在孕前期和中期产前筛查中的敏感度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值均较为理想,认为DS血清学在孕早中期筛查胎儿染色体异常中具有较高的应用价值。

PAPPA是一种类胰岛素样生长因子结合蛋白,由胎盘滋养细胞产生,可于孕28天时被检测到^[14]。而hCG作为一种由胎盘滋养细胞分泌的糖蛋白,可促进孕早期胎盘增生^[15]。目前主流的孕期孕妇以血清二联或三联指标筛查法为主,而越来越多的研究数据显示PAPPA+Free β -hCG筛查法的检出率低而假阳性率高^[16]。PLGF主要由合体滋养层细胞合成,可与滋养层细胞核血管内皮细胞和血管内皮细胞的酪氨酸酶受体结合,可直接或间接刺激血管生成。健康孕妇血清PLGF水平在15~26周时开始升高,并于28~30周达到高峰^[17]。同时PLGF具有高度特异性,低PLGF水平可以提示胎盘功能发育不良,对于鉴别子痫前期、低体重儿及DS患儿有重要的价值。相关研究显示,在孕8~13⁺⁶周将PAPPA+Free β -hCG二联筛查法结合孕妇血清PLGF可使检出率提高3%而使假阳性率降低1.1%^[18]。本研究结果证明血清PAPPA、Free β -hCG和PLGF可作为孕早期DS筛查的标志物。而以截断值 $\geq 1:270$ 为高风险时,血清三联筛查(PAPPA+Free β -hCG+PLGF)的检出率较二联筛查(PAPPA+Free β -hCG)高。且当假阳性率设定为5%、8%时,血清三联筛查的检查率均高于血清二联筛查;当检出率设定为80%、90%时,血清三联筛查的假阳性率均高于血清二联筛查,也进一步证实了血清三联筛查(PAPPA+Free β -hCG+PLGF)可显著提高DS患儿的检出率,降低假阳性率。

综上所述,孕育唐氏患儿孕妇产前血清PAPPA、free β -hCG及PLGF较正常孕妇均存在明显异常,血清PAPPA、free β -hCG联合PLGF可提高孕早期

唐氏筛查的检出率、降低假阳性率,对唐氏胎儿的鉴别和诊断有重要价值。

参考文献

- [1] 郑瑞,张蔚卿,陈葆国,等.一例伴GATA1基因新突变的唐氏综合征患儿的临床及实验室分析[J].中华医学遗传学杂志,2019,36(4):322-326.
- [2] 邝璐,韩宁,梁卓夫,等.869例唐氏综合征患儿细胞遗传学分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(3):448-450.
- [3] Duan H, Zhao G, Xu B, et al. Maternal serum PLGF, PAPPA, β -hCG and AFP levels in early second trimester as predictors of preeclampsia[J]. Clin Laborat, 2017, 63(5):921.
- [4] 潘敏,李东至,易翠兴,等.5263例血清学唐氏综合征筛查高风险病例产前诊断核型结果分析[J].中华围产医学杂志,2016,19(7):540-542.
- [5] 师淑静,宋文龄,姚运壮,等.产前筛查21-三体综合征的研究现状[J].中华医学超声杂志(电子版),2015,11(2):103-107.
- [6] 罗婷婷,曾艳,许平,等.产前诊断48,XXYY一例[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(5):746-746.
- [7] 李红,师振玲,秦少丹,等.晋中市榆次区孕妇唐氏综合征产前筛查现状及影响因素分析[J].中华现代护理杂志,2015,21(3):325-327.
- [8] 万淑琼,尹红章.异位妊娠患者血管内皮生长因子含量变化及临床价值[J].解放军医药杂志,2016,28(5):109-112.
- [9] 郭彦孜,刘俊,郑玲芳,等.2011-2014年西安咸阳地区先天性心脏病危险因素分析[J].临床误诊误治,2016,29(1):80-83.
- [10] 魏新亭,哈迎春,石凯,等.唐氏综合征相关危险因素分析[J].宁夏医科大学学报,2015,37(3):286-288.
- [11] 路兆宁,周在威,马晴雯,等.3种DNA甲基化定量分析方法的比较[J].医学分子生物学杂志,2015,11(12):84-89.
- [12] Pandian R, Cole LA, Palomaki GE. Second-trimester maternal serum invasive trophoblast antigen: a marker for down syndrome screening[J]. Clin Chem, 2020, 27(8):8.
- [13] 冯广满,詹前柱,蒋旺珍.唐氏综合征血清学在孕早中期产前筛查胎儿染色体异常中的应用[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(6):56-58.
- [14] Duan H, Zhao G, Xu B, et al. Maternal serum PLGF, PAPPA, β -hCG and AFP levels in early second trimester as predictors of preeclampsia[J]. Clin Laborat, 2017, 63(5):921.
- [15] 李龙,贺建峰,朱宝生.孕中期三联方案筛查唐氏综合征的meta分析[J].中华围产医学杂志,2016,19(2):119-127.
- [16] Alldred SK, Takwoingi Y, Guo BL, et al. First trimester ultrasound tests alone or in combination with first trimester serum tests for Down's syndrome screening[J]. Coch Data System Rev, 2017, 3(3):1260.
- [17] 靳艳霞,高劲松,胡静,等.sFlt-1/PlGF比值诊断子痫前期的研究进展[J].中华妇产科杂志,2016,51(7):126-128.
- [18] 顾玮,林婧,侯燕燕.妊娠早中期孕妇血清中 β -hCG、PAPP-A、AFP及uE3水平检测在联合预测子痫前期中的价值[J].中华妇产科杂志,2015,62(2):101-107.

Th1/Th2 及相关细胞因子 IFN- γ 、IL-10 在无痛分娩中的变化及意义

张海艳^{1*} 王占晖² 刘钦文¹

【摘要】 目的 探讨辅助性 T 淋巴细胞 1(Th1)/辅助性 T 淋巴细胞 2(Th2)免疫平衡及其相关细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-10(IL-10)在无痛分娩中的变化及其对分娩结局的影响。方法 选择 120 例经阴道顺产产妇,按分娩方式分对照组(普通分娩, $n=60$ 例)及研究组(PCEA 无痛分娩, $n=60$ 例),比较两组潜伏期前(T1)、潜伏期末(T2)及胎儿娩出时(T3)血清去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)及皮质醇(Cor)水平,血清 IL-10、IFN- γ 水平和静脉血 Th1、Th2 细胞水平。比较两组产程、新生儿 Apgar 评分差异及产后发热、出血发生情况。结果 两组 T1 时 NE、E、Cor 及 IFN- γ 、IL-10 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$), T2 和 T3 时 NE、E 及 Cor 高于 T1, IFN- γ 、IL-10 逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$),且研究组 NE、E 及 Cor 低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$), IFN- γ 、IL-10 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组 T1 时 Th1、Th2 及 Th1/Th2 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$), T2 和 T3 时两组 Th1、Th2、Th1/Th2 逐渐降低($P<0.05$),且研究组 Th1、Th2 及 Th1/Th2 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组第一产程活跃期短于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组新生儿 Apgar 评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$),研究组产后发热及产后出血发生率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 分娩过程 Th 细胞免疫抑制,无痛分娩能够减轻分娩过程的应激反应,维持 Th1/Th2 平衡,改善产妇的免疫状态,促进产程进展,减少分娩后不良反应的发生。

【关键词】 辅助性 T 淋巴细胞 1/辅助性 T 淋巴细胞 2; 无痛分娩; 干扰素- γ ; 白细胞介素 10

Changes of Th1/Th2 and related cytokines IFN - γ , IL-10 in painless birth and its significance

ZHANG Haiyan^{1*}, WANG Zhanhui², LIU Qinwen¹

(1. Department of Obstetrics, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, China, 266300;

2. Health Management Center, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, China, 266300)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the change of T Helper Lymphocyte 1(Th1)/T Helper Lymphocyte 2(Th2) immune balance and related cytokines interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10) in painless delivery and effect on pregnancy outcome. Method 120 cases of parturients who would take vaginal delivery were divided into the study group (painless labor with epidural PCEA, $n=60$) and the control group (routine delivery, $n=60$) according to delivery mode, the levels of noradrenaline (NE), epinephrine (E) and cortisol (Cor) were compared between the control group and the study group before incubation period (T1), at the end of incubation period (T2) and fetus delivering (T3), the levels of IL-10 and IFN- γ , and Th1 and Th2 in venous blood were compared at T1, T2 and T3. Labor process, Apgar score, postpartum fever and hemorrhage were compared between the control group and the study group. Results There was no significant

基金项目:青岛市卫健委立项课题(2019-WJZD121)

作者单位:1. 青岛市胶州中心医院产科,山东,青岛 266300

2. 青岛市胶州中心医院健康管理中心,山东,青岛 266300

*通信作者:张海艳, E-mail: zhujuuyi@163.com

difference in the levels of NE, E, Cor, IFN- γ and IL-10 between the two groups at T1 ($P>0.05$). NE, E, and Cor were higher than T1 at T2 and T3, and IFN- γ , IL-10 gradually decreased, the difference was statistically significant ($P<0.05$). NE, E, and Cor in the study group were lower than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The levels of IFN- γ and IL-10 were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in Th1, Th2, and Th1/Th2 levels between the two groups at T1 ($P>0.05$). At T2 and T3, the two groups' Th1, Th2, Th1/Th2 gradually decreased ($P<0.05$). Th1, Th2 and Th1/Th2 in the study group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The active period of the first stage of labor in the study group was shorter than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in Apgar score between the two groups of newborns ($P>0.05$). The incidence of postpartum fever and postpartum hemorrhage in the study group was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** Th cell immunosuppression during childbirth and painless childbirth can reduce the stress response during childbirth, maintain Th1/Th2 balance, improve the immune status of the parturient, promote the progress of labor, and reduce the occurrence of adverse reactions after childbirth.

[KEY WORDS] T Helpe Lymphocyte 1/T Helpe Lymphocyte 2(Th1/Th2); Painless birth; Interferon- γ (IFN- γ); Interleukin-10(IL-10)

妊娠期间辅助性T淋巴细胞(Thelper lymphocyte, Th)功能发生适应性调节, Thelper lymphocyte1(Th1)/Thelper lymphocyte2(Th2)免疫平衡发生漂移^[1-2], Th2细胞免疫占优势。Th1/Th2免疫平衡对维持免疫网络功能正常具有极其重要的作用。Th1/Th2免疫失衡虽然能够降低母体对胎儿排斥的风险, 但能够引起整体免疫功能下降。在分娩过程中, 由于疼痛、分娩创伤等刺激, 机体处于应激状态^[3-4], 机体的免疫功能进一步降低^[5], 增加产妇感染等并发症发生的风险。无痛分娩技术能够在分娩过程中进行有效的镇痛, 较少疼痛刺激引起的不良反应, 提高分娩安全。但Th1/Th2及其相关细胞因子在无痛分娩过程中的变化及其临床意义目前尚少见报道。为进一步明确其变化及作用, 本文就Th1/Th2免疫平衡及其相关细胞因子在无痛分娩中的变化及其对分娩结局的影响进行研究, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择本院2019年6月至2020年1月120例产妇, 产妇纳入标准: ①具备阴道分娩指征; ②孕周37~42周; ③单胎妊娠; ④胎儿正常; ⑤产妇对研究内容知情同意。排除标准: ①孕妇年龄 <20 周岁; ②多胎妊娠; ③合并妊娠并发症; ④合并免疫系统疾病; ⑤麻醉药物过敏; ⑥合并器官功能障碍或凝

血功能障碍; ⑦已进入产程潜伏期。产妇入选后随机分为对照组及研究组, 每组60例, 两组产妇年龄、孕周、孕产次数等基线资料经统计学分析无显著差异($P>0.05$)均衡可比。研究内容经本院医学伦理委员会批准, 并经医院伦理委员会批准。

1.2 镇痛方法

产妇进入产程潜伏期宫口开大2~3 cm后实施硬膜外镇痛, 硬膜外腔首次注入0.5%利多卡因6~8 mL, 然后采用脉冲式镇痛泵(爱朋ZZB-II型南通爱普医疗器械有限公司)经硬膜外导管持续镇痛(罗哌卡因+舒芬太尼), 背景剂量8 mL/h, 追加剂量2 mL/次, 锁定时间10 min, 使用直至分娩结束。

1.3 应激指标、细胞因子及Th1、Th2检测

产妇入组后产程潜伏期前(T1)、产程潜伏期末(T2)及胎儿娩出时(T3)采集静脉血, 分离血清后检测去甲肾上腺素(NE), 肾上腺素(E)及皮质醇(Cor)水平及干扰素(IFN- γ)和白细胞介素(IL-10)水平, NE、E及Cor水平检测采用放射免疫法(GC-911型放射免疫计数仪, 安徽中科中佳科学仪器有限公司), IFN- γ 及IL-10检测采用酶联免疫吸附法(Multiskan Sky酶标仪, 赛默飞世尔公司), 静脉全血标本检测Th1、Th2, 检测方法为流式细胞技术(Attune NxT型流式细胞仪, 赛默飞世尔公司), 检测过程均严格按照试剂及仪器使用说明书进行。

1.4 评估标准

新生儿娩出后5分钟行Apgar评分,观察产后出血(产后24小时内出血量 ≥ 500 mL)及产后发热(产后24小时至10天,连续3天体温 $>38^{\circ}\text{C}$,伴有腹痛、阴道分泌物异常等症状)发生率。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析,计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,符合正态分布,两组比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用SLN- q 检验,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组产妇基线资料比较

两组产妇年龄、孕周、产次、BMI等基线资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 两组基线资料比较 $(\bar{x}\pm s)$

组别	n	年龄	孕周	产次 (初产/经产)	BMI
研究组	60	26.4 \pm 3.2	39.2 \pm 0.8	42/18	24.3 \pm 1.74
对照组	60	26.7 \pm 3.5	39.4 \pm 0.9	44/16	24.2 \pm 1.82
t/χ^2 值		0.372	0.167	0.164	0.392
P 值		0.614	0.796	0.685	0.577

2.2 两组产妇应激反应比较

两组产妇T1时NE、E及Cor水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),T2时两组NE、E及Cor水

平高于T1时,T2时研究组NE、E及Cor水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),T3时两组NE、E及Cor水平低于T2时,高于T1时,差异有统计学意义($P<0.05$),T3时研究组NE、E及Cor水平低于对照组($P<0.05$)。见表2。

2.3 两组产妇Th1/Th2及细胞因子变化情况

两组T1时Th1、Th2及Th1/Th2比较,差异无统计学意义($P>0.05$),T2及T3时两组Th1、Th2、Th1/Th2均较T1时降低,差异有统计学意义($P<0.05$),T2及T3时间点研究组Th1、Th2及Th1/Th2均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组T1时IFN- γ 、IL-10水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。T2时IFN- γ 、IL-10水平降低于T1时($P<0.05$),T3时IFN- γ 、IL-10水平降低于T2时,差异有统计学意义($P<0.05$)。T2及T3时研究组IFN- γ 、IL-10水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.4 两组产程及新生儿Apgar评分情况

研究组第一产程活跃期短于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),第二产程及第三产程同对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),两组新生儿Apgar评分比较,差异无统计学意义($P<0.05$)。见表4。

2.5 两组分娩后不良反应发生情况

研究组产后出血及产后发热发生率低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表5。

表2 两组血清NE,肾上腺素E及皮质醇Cor水平比较 $(\bar{x}\pm s)$

指标	时间点	研究组($n=60$)	对照组($n=60$)	t 值	P 值
NE(ng/mL)	T1	146.7 \pm 26.4	147.3 \pm 28.6	0.416	0.524
	T2	264.9 \pm 39.8 ^{ac}	338.2 \pm 51.7 ^a	17.062	0.000
	T3	186.2 \pm 34.2 ^{abc}	219.5 \pm 37.6 ^{ab}	7.914	0.000
	F 值	14.276	17.849		
P 值	0.000	0.000			
E(ng/mL)	T1	186.4 \pm 41.2	184.8 \pm 43.6	0.217	0.732
	T2	317.4 \pm 59.4 ^{ac}	411.2 \pm 71.2 ^a	21.449	0.000
	T3	224.9 \pm 48.6 ^{abc}	286.4 \pm 53.4 ^{ab}	8.549	0.000
	F 值	12.406	21.397		
P 值	0.000	0.000			
Cor(ng/mL)	T1	346.2 \pm 46.4	339.7 \pm 45.6	0.363	0.617
	T2	492.7 \pm 58.9 ^{ac}	612.8 \pm 74.8 ^a	26.310	0.000
	T3	422.4 \pm 49.2 ^{abc}	486.7 \pm 53.5 ^{ab}	15.294	0.000
	F 值	18.542	22.446		
P 值	0.000	0.000			

注:a表示同组内T1时比较 $P<0.05$;b表示同组内T2时比较 $P<0.05$,c表示同对照组同时间点比较 $P<0.05$ 。

表3 两组 Th1、Th2 及 Th1/Th2 比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of Th1, Th2 and Th1/Th2 in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	时间点	研究组(n=60)	对照组(n=60)	t 值	P 值
IF- γ (pg/mL)	T1	19.65 \pm 5.24	19.23 \pm 5.49	0.429	0.336
	T2	14.48 \pm 3.81 ^{ac}	12.53 \pm 3.27 ^a	3.008	0.002
	T3	10.62 \pm 2.76 ^{abc}	8.94 \pm 2.12 ^{ab}	3.739	0.000
F 值		8.416	12.924		
P 值		0.000	0.000		
IL-10(pg/mL)	T1	39.42 \pm 6.44	40.26 \pm 6.77	0.696	0.756
	T2	31.64 \pm 5.72 ^{ac}	26.81 \pm 5.24 ^a	4.823	0.000
	T3	25.42 \pm 4.43 ^{abc}	18.32 \pm 4.84 ^{ab}	13.694	0.000
F 值		6.942	10.896		
P 值		0.000	0.000		
Th1(%)	T1	9.64 \pm 3.22	9.82 \pm 3.16	0.309	0.621
	T2	6.75 \pm 2.47 ^{ac}	4.76 \pm 1.64 ^a	5.199	0.000
	T3	4.96 \pm 1.84 ^{abc}	3.12 \pm 1.27 ^{ab}	6.375	0.000
F 值		11.524	14.476		
P 值		0.000	0.000		
Th2(%)	T1	4.31 \pm 1.74	4.36 \pm 1.85	0.153	0.561
	T2	3.42 \pm 1.31 ^{ac}	2.82 \pm 1.34 ^a	2.480	0.007
	T3	2.94 \pm 1.24 ^{abc}	2.41 \pm 1.05 ^{ab}	2.527	0.006
F 值		5.984	8.429		
P 值		0.000	0.000		
Th1/Th2	T1	2.34 \pm 1.26	2.39 \pm 1.64	0.187	0.574
	T2	2.12 \pm 1.16 ^{ac}	1.69 \pm 0.62 ^a	2.532	0.006
	T3	1.74 \pm 0.86 ^{abc}	1.36 \pm 0.81 ^{ab}	2.754	0.003
F 值		6.519	9.416		
P 值		0.000	0.000		

注:a表示同组内T1时比较P<0.05, b表示同组内T2时比较P<0.05, c表示同对照组同时时间点比较P<0.05。

表4 两组产程及新生儿 Apgar 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of birth process and Apgar score in 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第一产程 活跃期	第二产程	第三产程	Apgar 评分
研究组	60	182.57 \pm 52.45	36.82 \pm 13.72	7.42 \pm 3.64	9.46 \pm 0.74
对照组	60	226.29 \pm 61.94	37.47 \pm 14.36	7.52 \pm 3.39	9.38 \pm 0.83
t 值		11.462	0.714	0.329	0.572
P 值		0.000	0.136	0.063	0.383

表5 两组产后不良反应发生情况比较 [n(%)]

Table 5 Comparison of adverse reactions after delivery in 2 groups [n(%)]

组别	n	产后出血	产后发热
研究组	60	17(28.3)	5(8.3)
对照组	60	29(48.3)	13(21.7)
χ^2 值		5.076	4.183
P 值		0.024	0.041

3 讨论

Th 是以表达 CD4⁺为特征的淋巴细胞亚群, Th0 分化为 Th1 和 Th2, 分别介导细胞免疫和体液

免疫^[6]。Th1/Th2 维持动态的平衡是维持正常免疫功能的基础, 如果 Th1/Th2 比值发生漂移, 会导致免疫功能的紊乱, 并参与疾病的发生过程。妊娠期间 Th1/Th2 向 Th2 发生漂移, 趋于以体液免疫为主导, 对正常妊娠的维持具有重要的作用^[7-8]。在分娩过程中, 强烈的疼痛刺激及神经内分泌调节能够引起应激反应和机体免疫功能的变化^[9]。对应激反应的激素水平分析发现, 在胎儿娩出后 NE、E 及 Cor 水平发生明显的回落。但是研究组 T2 及 T3 时间激素水平要高于对照组, 说明无痛分娩技术能够有效的减轻分娩过程中的应激反应^[10]。两组产妇分娩过程中 Th1、Th2 均呈现进行性下降, 但对照组更为明显, 说明无痛分娩能够减轻 Th1/Th2 的漂移现象。IFN- γ 由 Th1 分泌、IL-10 由 Th2 表达^[11-12], IFN- γ 能够诱导活化巨噬细胞、对致病微生物进行吞噬, 同时也能够促进抗原提呈, 促进免疫应答的发生, IFN- γ 表达下调, 能够引起细胞免疫功能的下降。结合患者应激指标的分析发现, 分娩过程对 Th1/Th2 免疫平衡的影响是持续的过程, 也提示硬膜外阻滞无痛分娩有助于维护产妇 Th1/Th2 免疫

平衡^[13-14],减少对IFN- γ 及IL-10等细胞因子的抑制,改善机体的免疫功能。在对两组产妇产生及新生儿Apgar评分比较发现,研究组第一产程活跃期明显缩短,可能与镇痛后疼痛程度减轻,宫颈软化加速,宫缩更为规律协调等因素有关。但两组Apgar评分无显著差异,提示无痛分娩对新生儿健康无明显的影响^[15],具有较高的安全性。

综上所述,无痛分娩有利于维持分娩过程中Th1/Th2免疫平衡,减轻分娩对免疫功能的影响,降低对IFN- γ 和IL-10的抑制,有利于维护免疫功能。同时能够促进产程进展,对新生儿无明显的安全,减少产后不良反应的发生风险,具有较高的安全性。

参考文献

- [1] Azizi R, Ahmadi M, Danaei S, et al. Cyclosporine A Improves Pregnancy Outcomes in Women With Recurrent Pregnancy Loss and Elevated Th1/Th2 Ratio [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):19039-19047.
- [2] Ahmadi M, Abdolmohammadi-Vahid S, Ghaebi M, et al. Effect of Intravenous Immunoglobulin on Th1 and Th2 Lymphocytes and Improvement of Pregnancy Outcome in Recurrent Pregnancy Loss (RPL) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92:1095-1102.
- [3] 甘泉,周冬,程若沁,等.产后创伤后应激障碍的相关因素分析[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(11):1025-1029.
- [4] Henrique AJ, Gabrielloni MC, Rodney P, et al. Non-pharmacological Interventions During Childbirth for Pain Relief, Anxiety, and Neuroendocrine Stress Parameters: A Randomized Controlled Trial [J]. *Int J Nurs Pract*, 2018, 24(3):e12642.
- [5] 李晶,修玉芳,周晶.硬膜外分娩镇痛对产妇T细胞亚群及细胞因子平衡的影响[J]. *河北医药*, 2017, 39(15):2281-2284.
- [6] 曾美,李庆祥,黄文富,等.舌下含服粉尘螨滴剂脱敏治疗对特异性皮炎患者中辅助性T细胞作用的研究[J]. *分子诊断与治疗*, 2017, 9(3):186-190, 195.
- [7] Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy [J]. *Am J Rep Immunol*, 2010, 63(6):601-610.
- [8] 刘祥举.自然流产的遗传学检测研究进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(4):338-342.
- [9] 刘莉萍,宣荣荣,朱虹,等.硬膜外分娩镇痛对产妇炎症因子、补体及免疫功能的影响分析[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(2):80-83.
- [10] 杨莲芳.围手术期优质护理模式对剖宫产产妇心理状况及生理应激的影响[J]. *长治医学院学报*, 2019, 33(2):147-150.
- [11] 陈朝伦,李铭杰,刘亚楠,等. Th1/Th2细胞因子及淋巴细胞亚群在成人淋巴瘤相关噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增多症中的表达及临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(9):777-779.
- [12] Gong P, Shi B, Wang J, et al. Association between Th1/Th2 immune imbalance and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(8):709-714.
- [13] 金小春,尹述洲,张有涛. PIEB复合PCEA镇痛对分娩结局及Th1/Th2型细胞因子影响[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(12):1640-1644.
- [14] 罗小玲,陈世彪.分娩镇痛对产妇血Th1/Th2型细胞因子平衡的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2009, 25(7):603-605.
- [15] Veleminsky M, Ambroz A, Rossner P, et al. Oxidative Stress in Newborns by Different Modes of Delivery [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2016, 37(6):445-451.

(上接第1063页)

- [4] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组,中国神经外科相关专家小组.中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(7):485-509.
- [5] 王国良.胶质瘤外科手术的现代思维和辅助技术[J]. *广东医学*, 2017, 38(1):13-16.
- [6] 张宇,桑奔,朱贤龙,等. Hg1-1通过激活RhoA促进脑胶质瘤细胞的侵袭和迁移[J]. *中华神经外科杂志*, 2018, 34(12):1274-1280.
- [7] Jin P, Shin SH, Chun YS, et al. Astrocyte-derived CCL20 reinforces HIF-1-mediated hypoxic responses in glioblastoma by stimulating the CCR6-NF- κ B signaling pathway [J]. *Oncogene*, 2018, 37(23):3070-3087.
- [8] 李喆,谭晓虹,王明月,等.非特指型外周T细胞淋巴瘤基因芯片表达谱GEO数据库挖掘分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(19):1455-1461.
- [9] 陈萍萍,梁粉花,齐岳亮,等. Nir1表达对胶质瘤细胞侵袭能力的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(5):503-506.
- [10] De Vries LCS, Duarte JM, De Krijger M, et al. A JAK1 Selective Kinase Inhibitor and Tofacitinib Affect Macrophage Activation and Function [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(4):647-660.
- [11] Mangano K, Mazzon E, Basile MS, et al. Pathogenic role for macrophage migration inhibitory factor in glioblastoma and its targeting with specific inhibitors as novel tailored therapeutic approach [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(25):17951-17970.
- [12] 曾明坤,刘玲,张晓梅,等.代谢综合征对行根治术前列腺癌患者预后的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(2):136-140.
- [13] 孟瑞琳,夏亮,蔡秋茂,等.癌症的预防与控制[J]. *华南预防医学*, 2015, 41(1):96-98.
- [14] 王可玥,祁玉,胡洪波.免疫系统防御强,遇到缺氧HIF帮(英文)[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(6):575-582.

血浆 CD64、PCT 及 hs-CRP 水平在急性白血病化疗后合并细菌感染预后的评估

李萨萨 杨友卫 武琳琳 许力*

[摘要] **目的** 探究血浆中性粒细胞表面 CD64 指数、降钙素原(PCT)及超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)水平在急性白血病(AL)化疗后合并细菌感染预后评估中的应用效果。**方法** 分析2017年7月至2018年7月本院收治的82例AL化疗后合并细菌感染患者临床资料,根据1年后生存情况分为死亡组(预后不良组)及生存组(预后良好组),并纳入24例同期AL化疗无感染患者作为对照组。比较3组基线资料及血浆CD64指数、PCT、hs-CRP水平差异,并使用受试者工作特征曲线(ROC曲线)评估感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP对AL化疗后合并细菌感染不良预后的预测价值。**结果** 1年后,82例AL化疗后合并细菌感染患者死亡13例(15.85%),纳入预后不良组;生存69例(84.15%),纳入预后良好组。预后不良组与预后良好组中性粒细胞计数及感染部位情况比较差异无统计学意义($P>0.05$);但预后不良组与预后良好组中性粒细胞计数显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。3组血浆CD64指数、PCT、hs-CRP水平比较,均为预后不良组>预后良好组>对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。经ROC曲线分析,发现感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP对AL化疗后合并细菌感染不良预后均具有较高预测价值(AUC=0.907、0.791、0.834, $P<0.05$),其cut-off值分别为5.380、6.955 ng/mL、67.915 mg/L。**结论** 感染初期检测血浆CD64指数、PCT、hs-CRP能有效预测AL化疗后合并细菌感染预后情况,于临床诊疗有利。

[关键词] AL; 化疗; 细菌感染; CD64

Evaluation of plasma CD64, PCT and hs-CRP levels after acute leukemia chemotherapy combined with bacterial infection prognosis

LI Sasa, YANG Youwei, WU Linlin, XU Li*

(Department of Hematology, the Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei, Anhui, China, 230000)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the application of plasma neutrophil cell surface CD64 index, procalcitonin (PCT) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels on the prognosis evaluation of bacterial infection after acute leukemia (AL) chemotherapy. **Methods** The clinical data of 82 patients with bacterial infection after AL chemotherapy in the hospital from July 2017 to July 2018 were retrospectively analyzed. They were divided into the death group (poor prognosis group) and the survival group (good prognosis group) according to survival after 1 year. Another 24 patients without infection during the same period of AL chemotherapy were set as the control group. Baseline data and the levels of plasma CD64 index, PCT and hs-CRP were compared among the three groups, and the receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the predictive value of plasma CD64 index, PCT and hs-CRP on poor prognosis of bacterial infection after AL chemotherapy. **Results** One year later, 13 of 82 AL chemotherapy patients with bacterial

基金项目:安徽省卫计委科研项目(2018SEYL023)

作者单位:安徽省第二人民医院血液内科,安徽,合肥 230000

*通信作者:许力, E-mail: xuli943119@163.com

infection died (15.85%) and were included in the poor prognosis group. 69 cases (84.15%) survived and were included in the good prognosis group. There was no significant difference in neutrophil count and infection site between the poor prognosis group and the good prognosis group ($P>0.05$). However, the neutrophil count of the poor prognosis group and the good prognosis group was significantly lower than that of the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The comparison of plasma CD64 index, PCT, and hs-CRP levels in the three groups was the poor prognosis group $>$ the good prognosis group $>$ the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). After ROC curve analysis, it was found that the plasma CD64 index, PCT, and hs-CRP at the initial stage of infection had high predictive value for the poor prognosis of AL chemotherapy combined with bacterial infection (AUC = 0.907, 0.791, 0.834, $P<0.05$). The cut-off values were 5.380, 6.955 ng/mL, and 67.915 mg/L. **Conclusion** The detection of plasma CD64 index, PCT and hs-CRP in the early stage of infection can effectively predict the prognosis of bacterial infection after AL chemotherapy, which is beneficial for clinical diagnosis and treatment.

[KEY WORDS] AL; Chemotherapy; Bacterial infection; CD64

急性白血病 (acute leukemia, AL) 为血液系统常见恶性肿瘤, 随着近年诊疗技术的飞速发展, AL 生存率也较既往显著升高, AL 患者预后也得到明显改善^[1]。但 AL 患者机体免疫能力下降, 化疗还破坏黏膜屏障, 免疫系统损伤加重, 导致 AL 化疗后感染风险升高, 其中细菌感染较多^[2]。感染不仅增加治疗时间, 也影响患者预后, 增加病死率, 因此及时发现感染、评估病情、积极抗感染治疗, 对 AL 患者预后非常重要^[3]。目前, 超敏 C-反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 等血清学指标在炎症、感染诊断中较为常用, 具有敏感度高优点^[4]。降钙素原 (procalcitonin, PCT) 也为重要的反映细菌感染指标, 还能辅助评估感染患者预后状况^[5]。CD64 是一种跨膜蛋白, 正常生理状态下在中性粒细胞表面表达水平低, 细菌感染可引起表达急剧增高, 部分学者对此提出, CD64 在评估细菌感染中具有重要作用^[6]。故本研究分析上述指标对 AL 化疗后细菌感染预后状况的预测价值, 以评估上述指标在预测 AL 化疗后细菌感染预后中的可行性, 为 AL 诊疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 对象

分析 2017 年 7 月至 2018 年 7 月本院收治的 82 例 AL 化疗后合并细菌感染患者资料。纳入标准: ①符合 2016 年世界卫生组织修订的 AL 诊断标准^[7]; ②化疗次数 ≥ 1 次; ③细菌感染符合中华人民共和国卫生部制定的标准^[8]; ④随访时间 ≥ 1 年; ⑤资料齐全。排除标准: ①合并其他恶性肿瘤; ②伴免疫系统疾病、肝肾功能障碍; ③既往有精神疾病史; ④明确

真菌感染、病毒感染、衣原体感染、支原体感染; ⑤感染症状前 1 个月使用抗菌药物治疗。并纳入 24 例同期 AL 化疗无感染患者作为对照组。所有受试者患者及其家属对本研究知情同意。3 组性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器

流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司生产, 型号: FC500; 电化学发光法试剂盒由德国 Roche 生产; 免疫比浊测定法试剂盒由美国 FOCUS 诊断生产。

1.2.2 检测方法

①采用流式细胞仪检测血浆 CD64, 分别检测粒细胞及淋巴细胞 CD64 平均荧光强度, 两者比值即为 CD64 指数; ②PCT 采用电化学发光法检测; ③hs-CRP 使用免疫比浊测定法检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间使用独立样本 t 检验; 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验; 感染初期血浆 CD64 指数、PCT、hs-CRP 对 AL 化疗后合并细菌感染不良预后的预测价值采用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 评估, 计算曲线下面积 (AUC), 以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组基线资料比较

3 组性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 预后不良组与预后良好组中性粒细胞计数

及感染部位情况比较差异无统计学意义($P>0.05$);但预后不良组与预后良好组中性粒细胞计数显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组基本资料比较

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

组别	n	男/女	年龄(岁)	中性粒细胞($\times 10^9/L$)	感染部位				
					多部位	呼吸道	血流	口腔	其他
预后不良组	13	7/6	48.65±10.36	0.52±0.04 ^a	4	6	2	1	0
预后良好组	69	39/30	47.25±10.05	0.54±0.05 ^a	17	32	12	5	3
对照组	24	14/10	46.89±10.21	0.61±0.08					
F/ χ^2 值		0.070	2.254	9.876			-		
P值		0.966	0.107	<0.001			0.979		

与对照组比较,^a $P<0.05$;"-"为Fisher精确检验。

2.2 3组血浆指标比较

3组血浆CD64指数、PCT、hs-CRP水平比较,均为预后不良组>预后良好组>对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 各组血浆CD64、PCT、hs-CRP表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression of CD64 index, PCT and hs CRP in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD64	PCT (ng/mL)	hs-CRP (mg/L)
预后不良组	13	6.18±1.32 ^{ab}	6.96±1.97 ^{ab}	72.85±12.30 ^{ab}
预后良好组	69	3.95±1.07 ^a	5.05±1.50 ^a	55.93±13.25 ^a
对照组	24	2.05±0.63	2.82±0.71	13.25±3.69
F值		15.695	17.225	27.954
P值		<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,^a $P<0.05$;与预后良好组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP对AL化疗后合并细菌感染不良预后的预测价值

ROC曲线分析显示感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP对AL化疗后合并细菌感染不良预后均具有较高预测价值。见图1、表3。

3 讨论

化疗是AL常用治疗手段,然而,化疗在杀伤大量白血病细胞同时,也伤害正常血细胞,引起骨

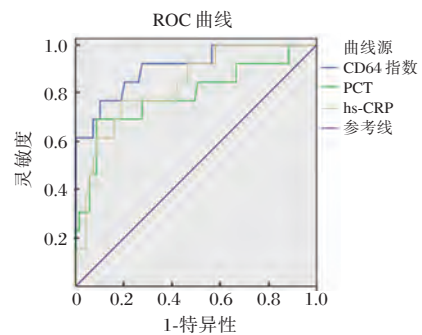


图1 感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP预测AL化疗后合并细菌感染不良预后ROC曲线

Figure 1 Prediction of ROC curve in patients with bacterial infection after al chemotherapy by CD64 index, PCT and hs-CRP

髓抑制,突出表现为血小板明显下降、白细胞减少、粒细胞缺乏、贫血、免疫系统严重紊乱,易并发细菌、病毒感染^[9]。由于AL患者化疗后白细胞数量急剧减少,机体免疫能力极低,在细菌感染后,可仅表现为发热,使临床很难准确判断病情^[10]。有研究指出,AL化疗后合并感染者病情进展快,可在短时间内诱发败血症,增加死亡率^[11]。因此,监测AL化疗患者感染相关指标,以及时诊断感染、评估预后,在AL诊疗中至关重要。

表3 感染初期血浆CD64指数、PCT、hs-CRP对AL化疗后合并细菌感染不良预后的预测价值

Table 3 The predictive value of CD64 index, PCT and hs CRP in the early stage of infection in the prognosis of patients with bacterial infection after chemotherapy of AL

指标	cut-off值	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	AUC	95%CI
CD64指数	5.380	76.92	89.86	0.668	0.907	0.815~0.999
PCT (ng/mL)	6.955	69.23	91.30	0.605	0.791	0.633~0.949
hs-CRP(mg/L)	67.915	76.92	81.16	0.581	0.834	0.720~0.948

本研究结果提示粒细胞缺乏与AL化疗后感染可能存在一定联系,与Xiang等^[12]的研究结果一致。粒细胞均为机体抵抗外界感染的主要效应细胞,AL化疗后白细胞下降,伴粒细胞缺乏者难以抵抗外来感染,导致合并感染风险较高^[13]。CD64在外周血中树突细胞、单核细胞及巨噬细胞表面分布,是免疫球蛋白G的Fc段受体,可参与机体免疫应答,正常状态下在中性粒细胞表面表达较少^[14]。但在细菌感染等刺激下,中性粒细胞表面可迅速而大量表达CD64,CD64与配体结合,刺激放大免疫反应形成,参与免疫系统生理病理反应^[15]。因此,中性粒细胞表面CD64表达水平可能在细菌感染诊疗中发挥至关重要的作用。本研究结果中也发现血浆CD64指数在评估AL化疗后感染预后中具有一定作用。刘璇等学者^[16]也指出,CD64在细菌感染时大量激活,刺激机体免疫反应,影响患者病情转归。提示血浆CD64指数的变化情况与患者病情发展密切相关,而对预后的预测有利。本研究结果提示感染初期血浆CD64指数>5.380时,患者可能存在严重感染,预后不良风险较高,临床应加强观察,积极予以治疗。但本研究样本量有限,该cut-off值仅供临床参考,精确参考范围还需后续大样本量的研究,以保证参考值的准确性。

PCT为评估机体感染状态的重要指标,其与机体炎症水平呈正相关,有学者指出,血清PCT急剧升高提示患者伴严重休克等急危重症^[17]。本研究结果说明血浆PCT含量随感染严重程度增加而升高,在评估预后状态中发挥重要作用。张国民等学者^[18]还发现,PCT在肝衰竭合并医院感染患者的预后评估中也发挥重要作用,提示PCT可能适用于感染相关疾病的预后评估。不仅如此,ROC曲线分析也显示感染初期血浆PCT在AL化疗后合并细菌感染不良预后预测中具有较高应用价值。这也表明,临床应对AL化疗患者进行血浆PCT水平监测,及时发现感染状况,并尽早完善检查,予以针对性治疗措施,以改善预后。PCT预测的截断值为6.955 ng/mL,可供临床参考。

据文献报道,CRP在机体受到损伤时急剧升高,在细菌感染早期可出现显著变化,hs-CRP较CRP具有更高的灵敏度,对机体损伤情况诊断价值更高^[19]。本研究结果中也发现血浆hs-CRP在AL化疗后感染诊疗中发挥重要作用,对预后评估

有积极意义。而其截断值为67.915 mg/L,也具有一定参考价值。即达到该参考值水平时,AL患者不良预后风险较高,临床应积极予以治疗,避免进展为败血症等急危重症,减少病死率。

综上,血浆CD64指数、PCT、hs-CRP在评估AL化疗后细菌感染病情进展中具有作用,在感染初期检测上述指标,能辅助预测患者预后,临床应积极开展血浆CD64指数、PCT、hs-CRP监测项目,以改善AL化疗后合并细菌感染预后。

参考文献

- [1] Anagnostopoulou E, Papanastasopoulou C, Papastamataki M, et al. Serum hyaluronic acid levels are altered in acute leukemia patients: potential prognostic implications [J]. *Acta Haematologica*, 2017, 138(1):44-51.
- [2] Epstein DJ, Seo SK, Huang YT, et al. Micafungin versus posaconazole prophylaxis in acute leukemia or myelodysplastic syndrome: a randomized study [J]. *J Inf*, 2018, 77(3): 227-234.
- [3] Yao JF, Li N, Jiang J. Clinical characteristics of bloodstream infections in pediatric acute leukemia: a single-center experience with 231 patients [J]. *Chin Med J*, 2017, 130(17): 2076-2081.
- [4] 吴爱成,唐恒锋,黄国清,等.血清hsCRP、MCP-1、CTRP9、APN、Lp-PLA2、Fractalkine和RANTES因子水平与无症状冠状动脉粥样硬化的关系[J]. *心血管康复医学杂志*, 2018, 27(5):534-536.
- [5] 徐萍,伍廷平,夏红,等.sTRAIL、PCT、ALB在重症肝病合并感染患者外周血中的表达及临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(6):746-750.
- [6] 姜淮,刘金山,张道忠,等.AAG、CD64指数和IL-10对肺癌术后并发感染的预测价值及与转归情况关联性[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(6):751-755.
- [7] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [8] 中华人民共和国卫生部.医院感染诊断标准(试行)[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(5):314-320.
- [9] Hui CG, Huang Z, Yang W, et al. Microarray profiling and co-expression network analysis of lncRNAs and mRNAs associated with acute leukemia in adult [J]. *Mol Biosystems*, 2017, 13(6):1102-1108.
- [10] Inaba H, Pei D, Wolf J, et al. Infection-related complications during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Annals Oncol*, 2017, 28(2):386-392.
- [11] Le Sommer S, Morrice N, Pesaresi M, et al. Deficiency in protein tyrosine phosphatase PTP1B shortens lifespan and leads to development of acute leukemia [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(1):75-87.

(下转第1098页)

星形细胞肿瘤组织 EGFR、VEGF 表达及其与病理分级的相关性研究

张弛 袁健 彭刚 谢源阳 苏军 刘庆 袁贤瑞 李昊昱*

[摘要] **目的** 探讨星形细胞肿瘤组织中上皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子(VEGF)表达及其与病理分级的相关性研究。**方法** 选取本院2014年1月至2015年1月收治的98例星形细胞肿瘤患者及50例正常脑组织标本为对照组,利用免疫组织化学染色法对手术切除的癌组织、癌旁正常组织及正常脑组织中EGFR、VEGF表达水平进行检测,并分析EGFR、VEGF蛋白表达水平与患者临床病理分级的相关性。**结果** EGFR、VEGF蛋白在星形细胞肿瘤组织中的阳性表达率及表达水平均明显高于癌旁正常组织和正常脑组织($P<0.05$),癌旁正常组织和正常脑组织中EGFR、VEGF蛋白阳性表达率无统计学差异($P>0.05$);EGFR、VEGF蛋白的表达水平与星形细胞肿瘤患者的恶性程度、肿瘤大小、肿瘤分级、浸润程度相关($P<0.05$);肿瘤组织中EGFR与VEGF表达呈正相关($r=0.859, P<0.05$)。**结论** 星形细胞肿瘤患者肿瘤组织中EGFR、VEGF蛋白水平高表达可能促进患者的病程发展。

[关键词] 星形细胞肿瘤;上皮生长因子受体;血管内皮生长因子

Expression of EGFR and VEGF in astrocyte tumor tissues and their correlation with pathological grade

ZHANG Chi, YUAN Jian, PENG Gang, XIE Yuanyang, SU Jun, LIU Qing, YUAN Xianrui, LI Haoyu*
(Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, China, 410008)

[ABSTRACT] **Objective** To explore the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocyte tumor tissues and their correlation with pathological grade. **Methods** A total of 98 patients with astrocyte tumors who were admitted to the hospital from January 2014 to January 2015 and 50 normal brain tissue specimens (the control group) were enrolled. The expression levels of EGFR and VEGF in cancer tissues of surgical excision, adjacent normal tissues and normal brain tissues were detected by immunohistochemical staining. The correlation between expression levels of EGFR and VEGF proteins and clinical pathological grades was analyzed. **Results** The positive expression rates and expression levels of EGFR and VEGF proteins in the astrocyte tumor tissues were significantly higher than those in the adjacent normal tissues and the normal brain tissues ($P<0.05$). There were no significant differences in positive expression rates of EGFR and VEGF proteins between the adjacent normal tissues and normal brain tissues ($P>0.05$). The expression levels of EGFR and VEGF proteins are correlated with the malignancy, tumor size, tumor grade and degree of invasion of astrocytic tumor patients ($P<0.05$). There was a positive correlation between EGFR and VEGF expression in tumor tissues ($r=0.859, P<0.05$). **Conclusion** The high expression of EGFR and VEGF proteins in tumor tissues of patients with astrocyte tumor may promote the progression of the disease course.

[KEY WORDS] Astrocyte tumor; Epidermal growth factor receptor; Vascular endothelial growth factor

基金项目:中南大学湘雅医院青年科研基金(2019Q15)

作者单位:中南大学湘雅医院神经外科,湖南,长沙 410008

*通信作者:李昊昱, E-mail:haoyu.li@csu.edu.cn

脑星形细胞瘤是最为常见的中枢神经上皮性肿瘤,临床数据显示其占颅内肿瘤的20%左右,占胶质瘤的21~50%左右^[1]。国际健康组织根据其生物学行为将其分为4级,其中I级为毛细胞星形细胞瘤,II级为弥漫性星形细胞瘤;III级为间变恶性星形细胞瘤,IV级为胶质母细胞瘤^[2]。脑星形细胞瘤可发生在中枢神经系统的各个部位,多见于成人大脑。目前对于肿瘤的研究显示,癌基因或抑癌基因的异常表达往往与肿瘤的发生相关,而影响肿瘤的生长、转移不仅依赖肿瘤的增殖,同时与肿瘤内的血管新生密切相关^[3-4]。上皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)是上皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)细胞增殖和信号传导的受体,与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关^[5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用^[6]。本文旨在探讨EGFR、VEGF的表达与星形细胞瘤患者临床病理分级的相关性,为星形细胞瘤的治疗提供新的方向。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年1月至2015年1月间本院经病理学检查确诊的98例星形细胞瘤患者为研究对象,其中男性57例,女性41例;患者平均年龄(42.68±5.39)岁;根据WHO中枢神经系统肿瘤分级标准^[7],I级22例,II级24例,III级28例,IV级24;肿瘤大小:≥5 cm 47例,<5 cm 52例;肿瘤部位:幕上部位52例,幕下部位46例;恶性程度:低53例,高45例;浸润深度T1~2共41例,T3~4共57例。50例正常脑组织中,男性28例,女性22例,平均年龄(43.1±5.4)岁。

纳入标准:①患者经病理学、影像学首次确诊为脑星形细胞瘤患者;②入院治疗前未接受放疗、化疗、手术、靶向药物等治疗;③患者同意接受星形细胞瘤根治术治疗;④临床资料完整,治疗依从性良好;⑤身体状况相对良好,能够耐受根治性手术治疗;⑥患者熟知本课题研究方案签署知情同意书自愿参与研究。排除标准:①合并有其他肿瘤;②合并有其他器官功能异常及严重心血管疾病;③患有先天性脑损伤或脑部疾病;④存在

用药过敏、治疗不耐受或禁忌症的患者。经医院伦理委员会通过后展开实施。

1.2 试剂及仪器

兔抗人EGFR抗体购自美国Proteintech Group公司,货号:18986-1-AP;兔抗人VEGF抗体购自美国Proteintech Group公司,货号:19003-1-AP;HRP标记的羊抗兔IgG抗体购自中国碧云天生物公司,货号:A0208;图像采集成像系统(chemi-DocTm)及图像分析系统(Quantity One 1-D分析软件)购自美国Bio-Rad Laboratories公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化分析

将肿瘤组织、癌旁正常组织及正常脑组织经石蜡包埋后连续切片,固定于载玻片上,50℃烘箱中烘1 h后,二甲苯、100%、95%、80%及75%乙醇依次进行水化,蒸馏水洗涤3次,然后置于柠檬酸钠溶液中加热2次,每次8 min,自然冷却,PBS洗涤2次。3% H₂O₂溶液中浸10 min,阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS洗涤3次后,滴加MAP4抗体稀释液,4℃孵育过夜。PBS洗涤3次后用羊抗兔二抗室温孵育1 h,PBS洗涤3次,免疫组化染色,苏木精复染,0.1% HCl分化,蓝化,梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.3.2 结果判断分析

免疫组化结果评估由两名专业病理人员采用双盲法进行判定,每张组织切片高倍镜下随机选取5个视野区,进行独立进行半定量积分的判断,结果一致则记录结果;不一致则由2人相同意见或第3位更加权威的医师确定。显微镜下观察组织细胞,细胞质中出现黄色或棕色颗粒为显色。评分准则^[8]:按染色面积分为:0分、1分、2分、3分。依照染色深浅分为:无染色为0分;微弱染色为1分;中度染色为2分;强染色为3分。最终得分=染色面积得分×染色深浅得分,>4分定义为阳性高表达。

1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,计数资料用n(%)表示,行 χ^2 检验;EGFR、VEGF表达水平间的相关采用Spearman相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR、VEGF在肿瘤组织及癌旁正常组织中的表达情况

EGFR、VEGF 蛋白在星形细胞肿瘤组织中的阳性表达率及表达水平均明显高于癌旁正常组织和正常脑组织 ($P < 0.05$), 癌旁正常组织和正常脑组织中 EGFR、VEGF 蛋白阳性表达率比较, 差异无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 1, 图 1。

2.2 EGFR、VEGF 在星形细胞肿瘤组织中的表达与临床病理参数关系

星形细胞肿瘤组织中 EGFR、VEGF 蛋白表达与星形细胞肿瘤的恶性程度、肿瘤大小、肿瘤分级、浸润程度相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

表 1 EGFR、VEGF 在肿瘤组织及癌旁正常组织中的表达情况 [$n(\%)$]

Table 1 Expression of EGFR and VEGF in tumor tissues and adjacent normal tissues [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	EGFR 阳性表达率	VEGFR 阳性表达率
星形细胞肿瘤组织	98	86(87.76)	92(93.88)
癌旁正常组织	98	14(14.28)	17(17.35)
正常脑组织	50	4(8.00)	5(10.00)
χ^2 值		138.595	148.745
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

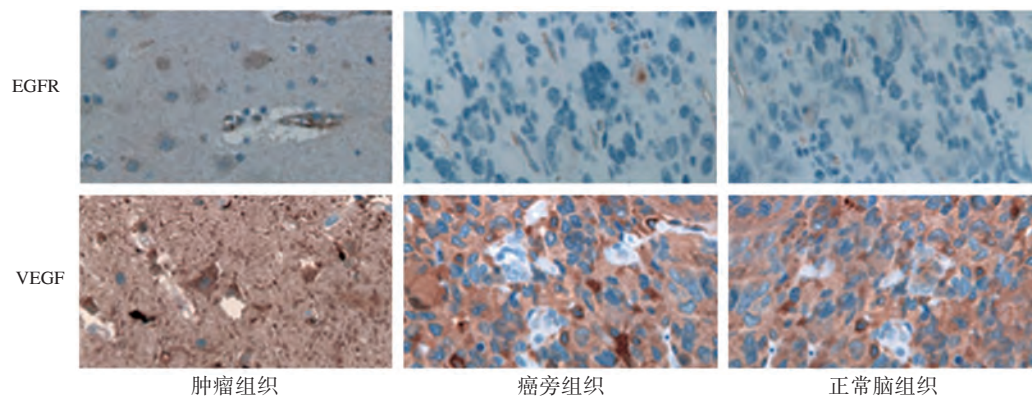


图 1 EGFR、VEGF 蛋白在组织中的表达 (HE, $\times 200$)

Figure 1 Expression of EGFR and VEGF proteins in tissues (HE, $\times 200$)

与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 星形细胞肿瘤组织中 EGFR、VEGF 表达相关性

星形细胞肿瘤组织中 85 例 EGFR、VEGF 共阴

性表达, 6 例 EGFR、VEGF 共阴性表达, EGFR 单阳性 1 例, VEGF 单阳性 7 例; Spearman 相关性分析结果显示 EGFR 与 VEGF 表达呈正相关 ($r = 0.859$, $P < 0.05$)。

表 2 EGFR、VEGF 在星形细胞肿瘤组织中的表达与临床病理参数关系 [$n(\%)$]

Table 2 Relationship between expression of EGFR and VEGF in astrocyte tumor tissues and clinicopathological parameters [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	EGFR 阳性表达率	χ^2 值	<i>P</i> 值	VEGFR 阳性表达率	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄	>55 岁	47(54.65)	0.538	0.392	49(53.26)	0.473	0.417
	≤ 55 岁	42			39(45.35)		
性别	男	45(52.32)	0.012	0.851	48(52.17)	0.017	0.873
	女	41			41(47.68)		
恶性程度	低	60(69.78)	7.473	0.004	61(66.30)	6.972	0.005
	高	36			26(30.23)		
肿瘤大小	≥ 5 cm	55(63.95)	5.271	0.013	59(64.13)	5.392	0.012
	<5 cm	35			31(36.04)		
肿瘤分级	I~II	37(43.02)	4.323	0.038	40(43.48)	7.225	0.007
	III~IV	52			49(56.98)		
肿瘤发生部位	幕上	47(54.65)	0.585	0.390	50(54.35)	0.533	0.392
	幕下	46			39(45.34)		
浸润程度	T1~2	31(36.05)	5.271	0.013	34(36.96)	5.174	0.012
	T3~4	59			55(63.95)		

3 讨论

EGFR 蛋白是酪氨酸激酶受体,其高表达激活的生长信号能够通过酪氨酸激酶途径传递至细胞核内,促使细胞的增殖^[9]。EGFR 与其配体结合后形成二聚体,通过磷酸化酪氨酸残基激活下游多条信号通路,诱导 VEGF、FGF 蛋白表达,最终调控细胞的增殖和分化^[10]。在正常情况下,机体受到外界刺激,会激活 VEGF 表达,发挥增强内皮细胞有丝分裂、促进局部组织血管新生的作用,从而改善组织供血情况;在肿瘤组织中,癌细胞能通过诱导 VEGF 表达,刺激肿瘤血管内皮细胞的增殖和迁移,同时改变新生血管的通透性,不仅为肿瘤的生长提供养分,还有利于肿瘤细胞的侵袭以及转移^[11]。

本研究结果显示:癌组织中 EGFR、VEGF 蛋白的阳性表达率均明显高于癌旁正常组织,可能是由于肿瘤细胞的生长速度较快,并且其代谢主要依靠能效较低的糖酵解途径,因此比正常细胞需要更多的养分,而 EGFR、VEGF 的高表达均能够刺激肿瘤组织的血管新生,来为瘤组织供给足够的养分。刘坤等^[12]的研究结果表明,肿瘤组织通过高表达 EGFR 促进自身生长,而高表达的 EGFR 又能够刺激 VEGF 表达升高,从而促进瘤体内血管生长,为肿瘤生长提供营养,从而形成恶性循环,与本研究结果一致,提示 EGFR、VEGF 可能是治疗星形细胞肿瘤的有效靶向位点。本研究还进一步验证了星形细胞肿瘤组织中 EGFR、VEGF 表达的相关性,结果显示:EGFR 与 VEGF 表达呈高度正相关性,马经伟等^[13]的研究也证实,在胃腺癌中 EGFR 与 VEGF 的表达也呈正相关,在实体肿瘤的发展过程中存在明显的共表达现象。通过对比患者临床资料与 EGFR、VEGF 表达结果发现,星形细胞肿瘤组织中 EGFR、VEGF 表达与星形细胞肿瘤的恶性程度、肿瘤大小、肿瘤分级、浸润程度相关;与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位差异无统计学意义。朱卫波等^[14]研究发现 EGFR、VEGF 在甲状腺乳头状癌中表达水平与患者的临床病理参数相关性与研究结果基本一致,说明 EGFR、VEGF 具有成为肿瘤分子靶向治疗的靶点的潜在价值。

综上所述,星形细胞肿瘤组织中 EGFR、VEGF 蛋白水平高表达可能是通过诱导患者肿瘤组织中的血管新生,增强养分供给促进肿瘤细胞的增殖,进而导致患者的病程持续发展。近年来分子靶向

治疗已成为肿瘤治疗的一大热点,本研究初步探索了 EGFR、VEGF 蛋白在星形细胞肿瘤中的发生、发展过程中可能存在协同关系,但其具体机制还有待深入研究。

参考文献

- [1] Modrek AS, Golub D, Khan T, et al. Low-grade astrocytoma mutations in IDH1, P53, and ATRX cooperate to block differentiation of human neural stem cells via repression of SOX2[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(5):1267-1280.
- [2] Hiura T, Khalid H, Yamashita H, et al. Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival[J]. *Cancer*, 2015, 83(11):2361-2369.
- [3] Sun W, Shi Q, Zhang H, et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy [J]. *Dis Med*, 2019, 27(146):45-55.
- [4] Ramjiawan RR, Griffioen AW, Duda DG. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(2):1-20.
- [5] 黄光辉, 杜娟, 候襄河, 等. 表皮生长因子受体基因突变表达与非小细胞肺癌分化程度关系的研究[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(2):97-100.
- [6] Abdel-Rahman O. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in gastric cancer: Preclinical and clinical aspects[J]. *Crit Rev Oncol hematol*, 2015, 93(1):18-27.
- [7] 杨学军. 解读《世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类(2007年)》[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(9):513-517.
- [8] 吴霞, 李代强. ALK 和 EGFR 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(2):120-123.
- [9] Dossa AY, Escobar O, Golden J, et al. Bile acids regulate intestinal cell proliferation by modulating EGFR and FXR signaling [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 310(2):G81-92.
- [10] Hori Y, Ito K, Hamamichi S, et al. Functional characterization of VEGF- and FGF-induced tumor blood vessel models in human cancer xenografts [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(12):6629-6638.
- [11] McLennan R, Schumacher LJ, Morrison JA, et al. VEGF signals induce trailblazer cell identity that drives neural crest migration[J]. *Dev Biol*, 2015, 407(1):12-25.
- [12] 刘坤, 王海江, 孙振强, 等. 胃癌组织 HER-2 和 VEGF 及 EGFR 表达临床意义研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2015, 22(10):781-785.
- [13] 马经伟, 朱萌, 张宁, 等. 人胃腺癌组织中 RUNX3、EGFR、VEGF 表达及其与淋巴转移和血管侵犯的关系[J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(9):1038-1042.
- [14] 朱卫波, 庄丽娟, 朱红芬, 等. 甲状腺乳头状癌中 Survivin, VEGF, EGFR 的表达及临床意义分析[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(16):121-123+131.

食管癌组织中PD-L1、Vim、Zeb1的表达与放疗敏感性的关系分析

付江萍 蓝柳 胡芳 方向东 高友淑 莫玉珍*

[摘要] **目的** 研究食管癌(EC)癌组织中程序性死亡受体配体1(PD-L1)、波形蛋白(Vim)和锌指结构E-box结合蛋白1(Zeb1)表达水平与放疗敏感性的关系。**方法** 选取2016年10月至2019年10月本院中晚期EC患者106例,行食管肿瘤胃镜活检并将标本进行免疫组化分析,然后采用三维适形调强放疗(IMRT)进行根治性放疗,根据放疗后4周时疗效将患者分为敏感组和耐受组,比较两组免疫组化分析结果并分析各指标与EC放疗敏感性的关系。**结果** 106例EC患者放疗效果显示完全缓解(CR)37例,部分缓解(PR)34例,稳定(SD)23例,进展(PD)为12例,敏感组(CR+PR)癌组织程序性死亡受体配体1(PD-L1)、波形蛋白(Vim)、锌指结构E-box结合蛋白1(Zeb1)和信号传导和转录激活因子3(STAT3)阳性率均低于耐受组,差异有统计学意义($P<0.05$);Logistic回归分析显示肿瘤最大径 >1.5 cm、分化程度低以及PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性是EC放疗敏感性的独立危险因素,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman秩相关分析显示,EC患者肿瘤组织PD-L1、Vim和Zeb1阳性率与STAT3均呈明显正相关性,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** EC肿瘤组织PD-L1、Vim和Zeb1蛋白在放疗耐受患者中阳性表达率更高,且其与放疗敏感相关蛋白STAT3表达水平具有明显正相关性,可作为评估EC放疗敏感性的参考指标。

[关键词] 食管癌;程序性死亡受体配体1;波形蛋白;锌指结构E-box结合蛋白1;信号传导和转录激活因子3;放疗敏感性

The relationship between expressions of PD-L1, Vim and Zeb1 in esophageal carcinoma tissues and radiotherapy sensitivity

FU Jiangping, LAN Liu, HU Fang, FANG Xiangdong, GAO Youshu, MO Yuzhen*

(Department of Medical Oncology, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China, 635000)

[ABSTRACT] **Objective** To study the relationship and role mechanism between the expression levels of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1), Vimentin (Vim) and zinc finger E-box-binding protein 1 (Zeb1) in esophageal carcinoma (EC) tissues and radio-sensitivity. **Methods** From October 2016 to October 2019, 106 patients with advanced EC in our hospital were selected for esophageal mucosal puncture biopsy, and specimens were analyzed by immunohistochemistry, and the three-dimensional conformal intensity-modulated radiation therapy (IMRT) was used for radical radiotherapy. At 4 weeks after radiotherapy, the patients were divided into the sensitive group and the tolerant group. The immunohistochemical analysis results of the two groups were compared and the relationship between the indicators and the sensitivity of EC radiotherapy was analyzed. **Results** The radiotherapy effect of 106 EC patients showed complete remission (CR) in 37 cases, partial remission (PR) in 34 cases, stable (SD) in 23 cases, and progression (PD) in 12 cases. The positive rates of Programmed death receptor ligand 1 (PD-L1), vimentin (Vim), zinc finger structure E-box binding protein 1 (Zeb1) and signal transduction and transcription activator 3 (STAT3) in the

基金项目:四川省科技计划项目(2018JY0359)

作者单位:达州市中心医院肿瘤内科,四川,达州 635000

*通信作者:莫玉珍, E-mail:gzmyz2016@126.com

sensitive group (CR + PR) cancer tissue were lower than those in the tolerance group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that the largest tumor diameter > 1.5 cm, low differentiation, and positive PD-L1, Vim, Zeb1 and STAT3 were independent risk factors for EC radiotherapy sensitivity, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that the positive rates of PD-L1, Vim and Zeb1 in tumor tissues of EC patients were significantly positively correlated with STAT3, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression rate of PD-L1, Vim and Zeb1 proteins in EC tumor tissues is higher in patients with radiotherapy tolerance, and it has a significant positive correlation with the expression level of radiosensitivity-related protein STAT3, which can be used as a reference index for evaluating EC radiotherapy sensitivity.

[KEY WORDS] Esophageal carcinoma; Programmed cell death-ligand 1; Vimentin; Zinc finger E-box-binding protein 1; Signal transduction and transcriptional activator 3; Radiosensitivity

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是常见消化道恶性肿瘤,部分肿瘤细胞对放疗敏感性较低,5年生存率仅为约10%^[1-2]。上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT)与食管癌发病、侵袭和转移密切相关,是影响食管癌细胞放疗敏感性的重要因素^[3]。程序性死亡受体配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)、波形蛋白(Vimentin, Vim)及锌指结构E-box结合蛋白1(zinc finger E-box-binding protein, Zeb1)均可在调控EMT过程中发挥重要作用,信号传导和转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription, STAT3)可能为其关键作用通路^[4-6]。本文主要分析EC患者癌组织中PD-L1、Vim及Zeb1表达水平及其与放疗敏感性的关系,为促进EC治疗水平不断进步提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年10月至2019年10月本院收治的中晚期EC患者106例为样本进行研究,其中男性61例、女性45例,年龄39~82岁,平均(54.91±10.37)岁,AJCC分期^[6]Ⅱ期37例、Ⅲ期51例、Ⅳ期18例。纳入标准:①经辅助检查确诊为EC;②患者年龄≥18岁;③AJCC分期为Ⅱ~Ⅳ期;④患者及家属知情并同意本研究内容。排除标准:①合并其它类型恶性肿瘤;②合并重要器官功能不全;③合并精神疾病或交流沟通障碍;④患者不了解自身病情;⑤此前已接受抗肿瘤治疗者。本研究经本院伦理委员会审核批准。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器和试剂

采用切片机(德国徕卡公司,型号:RM 2245)、

载玻片和盖玻片(北京鼎国生物技术公司)、超低温冰箱(Haier公司,型号:DW-86W100)、PD-L1、STAT3抗体(美国Santa Cruz公司,批号:sc1724M、sc2186R)、Vim抗体(Abcam公司,批号:ab6194)、Zeb1抗体(Abcam公司,批号:ab8239)、免疫组化和DAB显色试剂盒(福州迈新公司)、磷酸盐缓冲液(福州迈新公司)、多聚甲醛(芜湖海峰化工)、抗原修复液(福州迈新公司)。

1.2.2 免疫组化方法

将EC标本石蜡包埋切片并以72℃烘烤4h,冷却后以二甲苯脱蜡、乙醇脱水和蒸馏水冲洗,采用PH为6.0的0.01M柠檬酸盐在高温高压条件下进行抗原修复,依次采用蒸馏水和盐酸盐缓冲液(PBS)冲洗,4% H₂O₂封闭35min后再次以蒸馏水和PBS冲洗,然后滴加一抗并于4℃下孵育24h, PBS冲洗后依次滴加免疫组化试剂盒试剂1和试剂2,分别孵育40min并以PBS冲洗3次,每次5min,然后滴加新配置的DAB显色剂染色并采用蒸馏水冲洗3次,每次5min,采用苏木素复染1min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后由两名经验丰富的病理科医师开始镜检。每例标本分别选择10个高倍镜视野进行观察,PD-L1定位于包膜或者胞质并表现为棕黄色颗粒,Vim、Zeb1和STAT3均为胞质中显示棕黄色或黄褐色颗粒,阳性对照均为已知阳性的组织切片,阴性参考均为PBS。

1.2.3 数据分析

每位患者均根据国际辐射单位与测量委员会(ICRU)50和62号报告相关标准^[7]进行放疗,完成后第4周行食管钡餐造影检查,根据实体瘤反应评价标准(RECIST)评估近期疗效^[8]将患者两组并比较肿瘤组织中PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性

表达率,然后分析影响EC放疗敏感性的因素及PD-L1、Vim和Zeb1与STAT3表达水平的相关性。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0软件,计数资料采用n(%)表示,两组间对比进行 χ^2 检验,采用Logistic回归分析研究PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性率对EC患者放疗敏感性的影响,采用Spearman系数进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EC病理结果及PD-L1、Vim、Vim、Zeb1和STAT3表达情况

根据阳性细胞百分比和染色强度进行评分,染色强度按照未着色、浅黄色、棕黄色、棕褐色和分别计0~3分;阳性细胞占比为零计0分, $\leq 25\%$ 计1分、25%~50%计2分、50%~75%计3分、 $>75\%$ 计4分;总分为两者得分相乘,以总分0~2分为阴性, ≥ 3 分为阳性,见图1。

2.2 两组EC患者临床病理特征比较

106例EC患者均顺利完成放疗计划,其中CR为37例(34.91%),PR为34例(32.08%),SD为23例(21.70%),PD为12例(11.32%),放疗敏感71例,占比56.35%,敏感组和耐受组肿瘤最大径和分化程度比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.3 两组EC患者PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性率比较

敏感组PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性率均低于耐受组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表1 两组EC患者临床病理特征比较[n(%)]

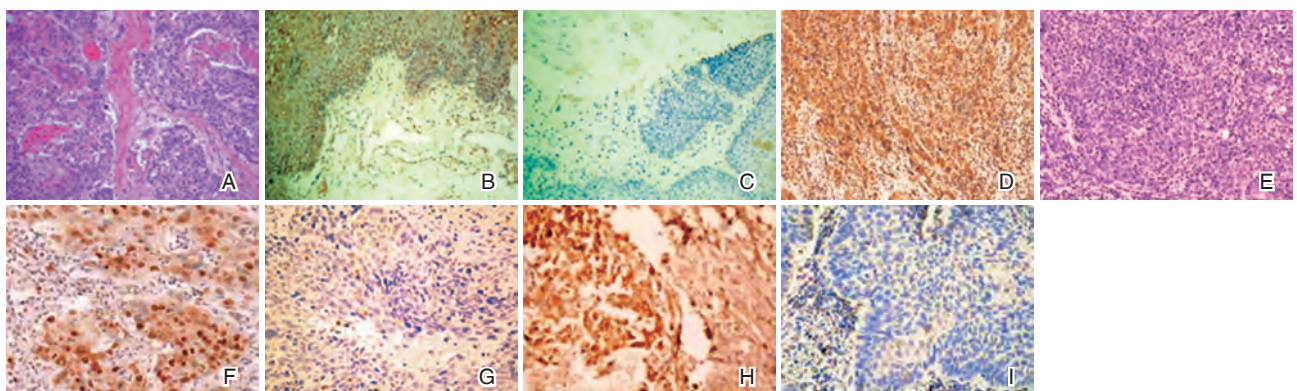
Table 1 Comparison of clinicopathological characteristics between the two groups of EC patients [n(%)]

相关因素	敏感组 (n=71)	耐受组 (n=35)	χ^2 值	P值
性别			0.129	0.720
男	40(56.34)	21(60.00)		
女	31(43.66)	14(40.00)		
年龄			0.044	0.833
>65岁	37(52.11)	19(54.29)		
≤ 65 岁	34(47.89)	16(45.71)		
部位			0.554	0.907
颈段	10(14.08)	4(11.43)		
胸上段	14(19.72)	9(25.71)		
胸中段	32(45.07)	15(42.86)		
胸下段	15(21.13)	7(20.00)		
肿瘤最大直径			5.956	0.015
>1.5 cm	23(32.39)	20(57.14)		
≤ 1.5 cm	48(67.61)	15(42.86)		
分化程度			4.295	0.038
高	51(71.83)	18(51.43)		
低	20(28.17)	17(48.57)		
临床分期			1.467	0.480
II期	22(30.99)	15(42.86)		
III期	35(49.30)	14(40.00)		
IV期	14(19.72)	6(17.14)		

表2 两组EC患者PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3阳性率比较[n(%)]

Table 1 Comparison of positive rates of PD-L1, Vim, Zeb1 and STAT3 in EC patients between the two groups [n(%)]

分组	n	PD-L1	Vim	Zeb1	STAT3
敏感组	71	25(35.21)	36(50.71)	41(57.75)	34(47.89)
耐受组	35	23(65.71)	31(88.57)	30(85.71)	28(80.00)
χ^2 值		8.803	9.214	8.291	9.957
P值		0.003	0.002	0.004	0.002



注:A为EC病理组织($\times 100$);B为PD-L1在EC组织阳性表达($\times 100$);C为PD-L1在EC组织阴性表达($\times 100$);D为Vim在EC组织阳性表达($\times 100$);E为Vim在EC组织阴性表达($\times 100$);F为Zeb1在EC组织阳性表达($\times 400$);G为Zeb1在EC组织阴性表达($\times 400$);H为STAT3在EC组织阳性表达($\times 400$);I为STAT3在EC组织阴性表达($\times 400$)。

图1 EC病理结果及PD-L1、Vim、Zeb1和STAT3表达情况(HE)

Figure 1 EC pathological results and expressions of PD-L1, Vim, Zeb1 and STAT3 (HE)

2.4 PD-L1、Vim 和 Zeb1 与 STAT3 相关性分析

EC 患者肿瘤组织 PD-L1、Vim 和 Zeb1 阳性率与 STAT3 均具有明显正相关性 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 PD-L1、Vim 和 Zeb1 与 STAT3 相关性分析
Table 3 Correlation between PD-L1, Vim and Zeb1 and STAT3

检测结果	STAT3		r 值	P 值
	+	-		
PD-L1	+	37	0.343	0.000
	-	25		
Vim	+	46	0.270	0.005
	-	16		
Zeb1	+	48	0.263	0.006
	-	14		

2.5 影响 EC 放疗敏感性的多因素 Logistic 回归分析

肿瘤最大径 > 1.5 cm、分化程度低以及 PD-L1、Vim、Zeb1 和 STAT3 阳性为影响 EC 放疗敏感性的独立危险因素 ($P < 0.05$), 见表 4。

3 讨论

肿瘤细胞侵袭和转移是造成 EC 患者预后不良的主要原因, 其中 EMT 为重要作用机制, 主要表现为 E-cadherin 等上皮细胞标志物减少而 Vim 等间质细胞标志物表达水平增加^[9]。文献报道显示 PD-L1 表达增加可促进 E-cadherin 下调, 转录因子 Slug 和 Twist 上调并参与调节 EMT 过程, 同时对 T、B 淋巴

表 4 影响 EC 放疗敏感性的多因素 Logistic 回归分析

Table 4 Multivariate Logistic regression analysis of EC radiosensitivity

相关因素	β 值	S.E. 值	χ^2 值	OR 值	95%CI	P 值
肿瘤最大径 > 1.5 cm	0.647	0.258	6.289	1.910	1.152~3.167	0.012
分化程度低	1.293	0.504	6.582	3.644	1.357~9.785	0.011
STAT3 阳性	0.865	0.371	5.436	0.375	1.148~4.914	0.020
Zeb1 阳性	0.902	0.413	4.770	2.465	1.097~5.537	0.030
PD-L1 阳性	0.724	0.297	5.942	2.063	1.152~3.692	0.015
Vim 阳性	0.586	0.341	6.435	1.797	1.143~2.826	0.012

细胞免疫功能造成明显影响并诱导免疫逃逸发生, 此外, 现已证实 Zeb1 在乳腺癌等肿瘤组织中异常表达, 并通过 EMT 促进肿瘤侵袭和转移发生^[10-11]。

最新研究认为 EMT 是影响恶性肿瘤细胞放疗敏感性的重要原因, 而 PD-L1、Vim 和 Zeb1 表达水平均与 EMT 关系密切, 因此 PD-L1、Vim 和 Zeb1 可能对 EC 放疗敏感性产生影响^[12]。本研究结果提示检测 PD-L1、Vim 和 Zeb1 表达情况有利于判断 EC 对放疗敏感性, 从而为临床选择合理治疗方案提供参考信息。

STAT3 受细胞外信号激活后发生磷酸化为 p-STAT3, 并通过与特定靶基因启动子结合而参与调控与细胞增殖、分化和凋亡等活动相关的基因表达, 在肿瘤发生、侵袭及转移过程中发挥重要作用^[13]。本研究显示放疗敏感组 EC 患者 STAT3 明显高于耐受组, 进一步分析发现 STAT3 阳性为影响放疗敏感性的独立危险因素, 可见 STAT3 在 EC 放疗耐受过程中发挥重要作用, 与 Lee 等^[14]报道结果一致。文献报道 STAT3 调节放疗敏感性的机制可能包括上调血管内皮生长因子表达 (VEGF), 活化缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 及调控细胞周期蛋白 D

等^[3]。Zhang 等^[15]和 Cortez 等^[16]研究发现放射治疗可诱导炎症因子释放并促使 STAT3 磷酸化, 上调 PD-L1 表达水平并形成治疗诱导的放射抗拒。同时有研究认为 Zeb1 为 JAK/STAT3 信号通路重要环节且在调节 E-cadherin 和 Vim 等蛋白表达及 EMT 过程中发挥关键作用^[17]。本研究结果推测 PD-L1、Vim 和 Zeb1 均可能参与调节 JAK/STAT3 信号通路, 从而影响肿瘤细胞 EMT 及放疗敏感性, 由于条件限制本研究未对 PD-L1、Vim 和 Zeb1 阳性率与 STAT3 表达水平进行量化分析, 故具体结果还有待更多研究进行探讨和证实。

综上所述, EC 肿瘤组织 PD-L1、Vim 和 Zeb1 阳性率在放疗耐受患者中明显升高, 且与 STAT3 表达水平具有明显正相关性, 可能是影响 EC 放疗敏感性的重要原因。

参考文献

- [1] Wang Y, Chen C. Survival following video-assisted thoracoscopic versus open esophagectomy for esophageal carcinoma [J]. J BUON, 2016, 21(2): 427-33.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

- [3] Zang C, Liu X, Li B, et al. IL-6/STAT3/TWIST inhibition reverses ionizing radiation-induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7):11228-11238.
- [4] Tsutsumi S, Saeki H, Nakashima Y, et al. PD-L1 expression at tumor invasive front is associated with EMT and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(6):1119-1127.
- [5] Zhang K, Chen J, Song H, et al. SNHG16/miR-140-5p axis promotes esophagus cancer cell proliferation, migration and EMT formation through regulating ZEB1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1):1028-1040.
- [6] Verburg FA, Mäder U, Luster M, et al. The effects of the Union for International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer Tumour, Node, Metastasis system version 8 on staging of differentiated thyroid cancer: a comparison to version 7 [J]. *Clin Endocrinol*, 2018, 88(6):950-956.
- [7] 于金明,邢力刚. 功能性影像确定肿瘤放射治疗生物靶区的研究进展 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2004, 12(1):53-55.
- [8] Jeh SK, Kim SH, Kang BJ. Comparison of the Diagnostic Performance of Response Evaluation Criteria in Solid Tumor 1.0 with Response Evaluation Criteria in Solid Tumor 1.1 on MRI in Advanced Breast Cancer Response Evaluation to Neoadjuvant Chemotherapy [J]. *Korean J Rad*, 2013, 14(1):13-20.
- [9] Leng S, Yang M, Zhao Y, et al. PTIP promotes recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35):58184-58198.
- [10] 沈琼,陈陆俊,邓海峰,等. 程序性死亡受体配体-1促进食管癌细胞上皮-间充质转化的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(2):279-281.
- [11] Maurer J. A novel ZEB1/HAS2 positive feedback loop promotes EMT in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7):11530-11543.
- [12] Zhang H, Luo H, Jiang Z, et al. Fractionated irradiation-induced EMT-like phenotype conferred radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Radiat Res*, 2016, 57(4):370-80.
- [13] 邓绮文,丁宇,唐开宇,等. 14-3-3 σ 基因影响人低分化鼻咽癌细胞 CNE-2 的信号通路 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, (1):10-14.
- [14] Lee SY, Jeong EK, Ju MK, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):10.
- [15] Zhang N, Zeng Y, Du W, et al. The EGFR pathway is involved in the regulation of PD-L1 expression via the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4):1360-1368.
- [16] Cortez MA, Valdecanas D, Zhang X, et al. Therapeutic Delivery of miR-200c Enhances Radiosensitivity in Lung Cancer [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(8):1494-1503.
- [17] Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 Proteins in E-cadherin Down-regulation and Human Colorectal Cancer Epithelial - Mesenchymal Transition [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8):5819-5832.

(上接第 1072 页)

- [8] 彭剑桥,王宏波,梁仙志,等. 可溶性肿瘤发生抑制蛋白 2 和白细胞介素 33 联合检测在川崎病患儿心血管受损早期诊断中的应用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018(10):1016-1020.
- [9] 刘特长,于明华,黄荷清,等. 川崎病心血管损害的超声心动图诊断及随访 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2001, 13(1):2-4.
- [10] 王策,于宪一. 320 例川崎病患儿临床特点及冠状动脉损伤的高危因素分析 [J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 25(12):939-947.
- [11] 江雅静,钱程,赵玉岐. 川崎病合并冠状动脉病变患儿血清 NT-proBNP、IL-6 水平变化及临床意义研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(5):503-506.
- [12] 宋思瑞,朱丹颖,陈丽琴,等. 血清 IL-17A、IL-18、SCD25 (IL-2R) 早期诊断川崎病研究 [J]. *临床儿科杂志*, 2018, 36(5):367-371.
- [13] 黎明,许锁春,闫焯,等. 左卡尼汀对体外循环下冠状动脉旁路移植术患者血清炎症细胞因子和心肌肌钙蛋白 I 的影响 [J]. *中国医师进修杂志*, 2019, 42(7):617-621.
- [14] 廉婕,王雪芹,王鹏飞. 幽门螺旋杆菌感染对川崎病儿童冠状动脉损伤的影响 [J]. *安徽医学*, 2018, 39(1):78-80.
- [15] Etsuko Tsuda, Manphool Singhal. Role of imaging studies in Kawasaki disease [J]. *Int J Rheumatic Dis*, 2017, 21(1):56-63.
- [16] 汪燕,鲁利群,贺静,等. 川崎病患儿炎症因子和免疫功能指标检测的临床意义 [J]. *儿科药科学杂志*, 2018, 16(1):4-7.
- [17] 沈杨,单晶,刘光辉,等. 丙种球蛋白联合阿司匹林肠溶片治疗川崎病的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 24(23):2347-2350.
- [18] Jun Nakamura, Sachiko Watanabe, Hiroaki Kimura, et al. Adeno-associated Virus Vector-mediated Interleukin-10 Induction Prevents Vascular Inflammation in a Murine Model of Kawasaki Disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):7601-7603.

硫酸特布他林联合布地奈德雾化对支气管肺炎患儿临床治疗效果分析

韩梅* 宋华 张伟 王平乐

【摘要】 目的 分析硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗对支气管肺炎患儿症状体征、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)以及白介素-6 (IL-6)的影响。方法 收集本院2017年3月至2019年4月收治的120例支气管肺炎患儿的临床资料为研究对象,根据患者治疗方式不同将患者分为对照组(硫酸特布他林治疗),研究组(硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗)各60例。对比两组患者临床效果,观察治疗后症状体征变化以及不良反应情况,并对比治疗前后TNF- α 、IL-6及肺功能。结果 研究组总有效率明显要优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后两组患者TNF- α 、IL-6表达水平较治疗前均有明显下降($P<0.05$),研究组下降情况要明显优于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组均有轻微不良反应出现,在正确护理后消失。结论 硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗可缓解支气管肺炎患儿临床症状,改善炎症因子水平,安全性较高,值得临床推广使用。

【关键词】 硫酸特布他林;布地奈德雾化;支气管肺炎;症状体征;白介素-6

Analysis of the clinical therapeutic effect of terbutaline sulfate combined with budesonide atomization on children with bronchial pneumonia

HAN Mei*, SONG Hua, ZHANG Wei, WANG Pingle

(Department of Pediatrics, Huaibei Miner General Hospital, Huaibei, Anhui, China, 235000)

【ABSTRACT】 Objective To analyze the effects of inhalation treatment of terbutaline sulfate combined with budesonide atomization on the symptoms and signs, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in children with bronchial pneumonia. Method The clinical data of 120 children with bronchial pneumonia treated in our hospital from March 2017 to April 2019 were collected. The patients were divided into the control group (terbutaline sulfate) and the study group (inhalation treatment of terbutaline sulfate combined with budesonide atomization), 60 cases in each group. The clinical effects of the two groups were compared, the changes in symptoms and signs and adverse reactions were observed after treatment, and TNF- α , IL-6 and lung function were compared before and after treatment. Results The total effective rate in the study group was 96.66%, which was significantly better than the 76.66% of control group ($P<0.05$). After treatment, the expression levels of TNF- α and IL-6 in the two groups were significantly lower than those before treatment ($P<0.05$), and the decline in the study group was significantly better than that in the control group ($P<0.05$). After treatment, the lung function of both groups improved ($P<0.05$), and the improvement of the study group was better than that of the control group ($P<0.05$), and there were no significant adverse reactions. Conclusion Terbutaline sulfate combined with budesonide atomization inhalation therapy can alleviate the clinical symptoms of children with bronchial pneumonia, improve the level of inflammatory factors, and have high safety. It is worthy of clinical promotion.

【KEY WORDS】 Terbutaline sulfate; Budesonide atomization; Bronchopneumonia; Symptoms and signs; Interleukin-6

基金项目:安徽卫生计生委科研项目(2016ZY536)

作者单位:淮北矿工总医院儿科,安徽,淮北 235000

*通信作者:韩梅, E-mail: vkmzan@163.com

肺炎是医院儿科中常见的疾病,肺炎为5岁以下小儿常见的死亡原因之一,在全球每年有160万儿童死于肺炎,在我国小儿肺炎占住院儿童比例可高达56.2%,为住院小儿死亡的第一位原因^[1]。支气管肺炎是小儿常见的下呼吸道感染性疾病,及发育急性上呼吸道感染后进一步发展所导致,在春冬季以及气温骤变的时候多发。患儿免疫功能尚未完善,肺功能、支气管功能发育不成熟,支气管较成年人窄,导致患儿痰液很难排出,进一步加重了患儿肺部炎症情况,导致患儿临床治疗时间延长,病情进展,严重威胁患儿生命健康以及影响患儿生活质量^[2-3]。在患儿发病早期需要及时的进行治疗,防止患儿病情进一步发展。在临床治疗以抗感染、保持患儿呼吸通畅、改善患儿肺部炎症情况为主,正确的治疗可有效缓解患者病情进展,而治疗不当会导致患儿出现一系列的肺外并发症^[4-5]。因此,本文旨在分析硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗对支气管肺炎患儿症状体征、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)以及白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)的影响,为临床治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院2017年3月至2019年4月收治的120例支气管肺炎患儿的临床资料,其中男71例,女49例,年龄2~13岁,平均年龄为(5.31 \pm 2.14)岁,临床表现:而咳嗽、上呼吸道感染、气促、呕吐等。均经实验室检查、影像学检查确证。根据患者治疗方式不同将患者分为对照组(硫酸特布他林)60例,其中男33例,女27例,年龄2~12岁,平均年龄为(5.11 \pm 1.58)岁;研究组(硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入)例60例,其中男38例,女22例,年龄3~13岁,平均年龄为(5.71 \pm 2.38)岁,两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①所有患者临床资料、影像学资料完整;②所有研究患者及家属并同意本次研究;③所有研究对象进行检查前并无相关治疗;④本研究经医院伦理委员会同意;⑤无合并严重肺部感染。排除标准:①依从性不佳者;②有其他严重心、肝、肾等疾病者;③中途退出者;④中途退出研究者;⑤精神障碍患者;⑥有严重呼吸、循环系统

疾病者;⑦相关药物过敏者;⑧不明原因支气管哮喘、肺炎。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法

对照组:给予患儿常规抗感染治疗、止咳、吸氧、平喘、纠正患者酸中毒等,在此基础上给予患者硫酸特布他林片(国药准字H32022694,阿斯利康制药有限公司;使用方法:按体重一次0.065 mg/kg(但一次总量不应超过1.25 mg),一日三次)进行治疗。研究组:在对照组治疗基础上联合布地奈德雾化(国药准字H20140475,吸入治疗,Astra-Zeneca Pty Ltd,使用方法:儿童:一次0.25 mg,2次/天。

在两组患者治疗一周后对患者治疗效果进行评价,观察患者临床表现以及特征(包括:止咳时间、气喘缓解时间、肺啰音消失时间、胸片阴影消失时间)了解治疗后的相关改变。

1.2.2 TNF- α 、IL-6 检查

治疗前后均在清晨对所有患儿进行静脉抽血3 mL,使用离心机离心后选取血清,使用ELISA(酶联免疫吸附法)检测IL-6、TNF- α 表达水平,仪器试剂由北京万泰公司提供。

1.2.3 肺功能检查

使用肺功能检测仪器检查患儿治疗前后肺功能指标情况,最高呼气流速(Maximum expiratory flow rate, PEF)、用力肺活量(Forced vital capacity, FVC)、最大吸气后用力快速呼气1s所呼出的最大气量(Forced expiratory volume in the first second, FEV1)。

1.3 观察指标

对比两组患者临床效果,治疗后症状体征变化以及不良反应情况,并对比治疗前后TNF- α 、IL-6、肺功能情况。使用《中医病症诊断疗效标准》^[6],临床总有效率=(治愈+显效+好转) \times 100%。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,用 t 检验;计数资料 $n(\%)$ 表示,并采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床治疗效果比较

研究组总有效率明显要优于对照组,差异存在统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 两组患者临床治疗效果比较 [n(%)]

Table 1 Comparison of clinical treatment effect between the 2 groups [n(%)]

组别	n	痊愈	显效	好转	无效	总有效率
研究组	60	12(20.00)	29(48.33)	17(28.33)	2(3.33)	58(96.66)
对照组	60	3(5.00)	14(23.33)	29(48.33)	14(23.33)	46(76.66)
χ^2 值	-	-	-	-	-	67.22
P值	-	-	-	-	-	0.000

2.2 治疗前后两组患者 TNF- α 、IL-6 表达水平比较

治疗后两组患者 TNF- α 、IL-6 表达水平较治疗前有明显下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 治疗前后两组患者 TNF- α 、IL-6 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of TNF- α and IL-6 expression levels between the 2 groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (pg/mL)		IL-6(pg/mL)	
	治疗前 (n=60)	治疗后 (n=60)	治疗前 (n=60)	治疗后 (n=60)
研究组	30.26 \pm 3.84	7.42 \pm 2.58	97.56 \pm 9.46	21.55 \pm 5.31
对照组	31.10 \pm 3.21	17.23 \pm 2.31	97.33 \pm 9.23	55.23 \pm 6.48
t值	1.300	21.942	0.134	31.140
P值	0.196	0.000	0.893	0.000

2.3 治疗后两组患者症状体征改善情况

治疗后研究组气喘缓解、止咳、肺啰音消失时间、胸片阴影消失时间均短于对照组,两组之间进行比较,差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 两组患者治疗后不良反应情况

两组患者治疗后均有不良反应出现,研究组总发生率为 4(6.66%)其中有 2 例患者出现呕吐,1 例患者皮疹,1 例出现头疼;对照组总发生率为 3(5.00%)1 例患者皮疹,1 例患者呕吐,1 例腹泻。两组患者不良反应总发生率比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.152, P > 0.05$),在进行及时的处理后患者不良反应消失。

表3 治疗后两组患者症状体征改善情况 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Improvement of symptoms and signs in the 2 groups after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	气喘缓解(d)	止咳(d)	肺啰音消失时间(d)	胸片阴影消失时间(d)
研究组	60	2.45 \pm 0.71	4.69 \pm 1.71	4.33 \pm 0.49	4.65 \pm 0.25
对照组	60	6.39 \pm 0.40	7.96 \pm 2.01	6.87 \pm 2.85	6.77 \pm 0.33
t值	-	37.452	9.598	6.803	39.664
P值	-	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论

支气管肺炎病变部位常位于靠近支气管的肺泡,患儿支气管会出现粘膜水肿导致变窄的情况,肺泡壁也会充血水肿,腔内就会充满痰液,而对于小儿患者来说其支气管粘膜纤毛的运动能力较成年人差,肺部的回缩力也较弱,导致其体内的痰液无法有效清除^[7]。当患儿体内痰液淤积后会造成呼吸道堵塞严重影响肺通气与换气的功能,直接威胁到了患儿的生命安全。在临床治疗上就需要注意,在治疗相关炎症时需要保证患儿呼吸道内的分泌物被清除,这样才能获得好的治疗效果^[8-9]。因此在临床治疗中常以吸氧、抗感染、止咳、平喘为基础治疗,还需及时的将患儿呼吸道内分泌物清除,保证了患儿能有效的进行呼吸,缓解患儿呼吸道平滑肌痉挛的情况^[10]。以往有文献指出,在支气管肺炎患儿的治疗中加入雾化治疗可

有效湿化患儿的呼吸道,将患儿呼吸道痰液稀释,对患儿排痰有帮助^[11]。而雾化治疗能将药物直接作用于患儿的病灶部位,对患者治疗有好的帮助,更能有效缩短患者治疗时间^[12]。本文研究结果提示联合使用临床效果更佳。硫酸特布他林属于选择性的 β_2 受体激动剂,可有效舒张患者的支气管平滑肌,缓解患者平滑肌痉挛的现象,可最大程度降低患者微血管通透性,并可稀释气道内粘液加快其清除速度,且对心脏副作用较小^[13]。布地奈德属于糖皮质激素有高效的局部抗炎作用,对免疫反应有抑制作用,减少了抗体合成从而增强了患者细胞膜的稳定作用,通过减少过敏活性物质的传递、释放从而达到抗过敏、消炎的作用^[14]。使用其作为雾化药物,可快速的作用于肺部,并和患者支气管表皮糖皮质激素受体结合,有效的抑制炎症细胞、过敏介质的释放、渗出,减低其生物学作用,有很好的抗炎效果^[15]。在患者气道粘膜

消肿后,粘液分泌减少,也有效的缓解了支气管痉挛的现象。有文献报道,使用硫酸特布他林联合布地奈德雾化治疗,可有效促进硫酸特布他林扩张支气管的作用,这样也使得患者气管获得更多的布地奈德,有效的提高了两者的治疗效果^[16]。

IL-6在炎症反应、自身免疫方面有重要的作用,且具有广泛生物活性,在急性期炎症介导中占据了重要的地位,参与机体整个炎症病理过程。TNF- α 也属于炎症介质,介导了炎症反应的病理过程,引起患者局部的炎症作用。本研究结果提示两者联合治疗可改善患者炎症因子水平以及肺功能情况。

综上所述,硫酸特布他林联合布地奈德雾化吸入治疗可缓解支气管肺炎患儿临床症状,改善其炎症因子水平,安全性较高,值得临床推广使用。

参考文献

- [1] 樊婷. 糖皮质激素对小儿难治性支原体肺炎疗效及T淋巴细胞亚群的变化[J]. 解放军医药杂志, 2018, 42(5): 702-706.
- [2] 尹文, 王肖. 社区获得性肺炎抗感染药物的应用策略[J]. 临床误诊误治, 2013, 25(5): 12-14.
- [3] 徐巧莲, 刘汉, 刘颖, 等. 监测血清降钙素原水平以优化重症肺炎的抗感染治疗策略[J]. 医学分子生物学杂志, 2013, 10(6): 348-350.
- [4] 于海心, 许敬, 赵翠红, 等. 雾化吸入布地奈德、特布他林结合机械辅助排痰治疗重症肺炎患儿的疗效及护理[J]. 河北医药, 2019, 14(6): 23-26.
- [5] 孙春荣, 黄琳娜, 崔晓阳, 等. 老年重症肺炎患者血清hs-CRP水平变化及临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 53(5): 347-351.
- [6] 李国锐. 《中医病症诊断疗效标准》出台[J]. 质量技术监督研究, 1995, 52(2): 5-5.
- [7] 陈静宜, 廖飞, 冯磊. 2016年玉溪市某院儿童下呼吸道感染细菌菌群分布及耐药性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 55(3): 10-35.
- [8] 成小蓉, 杜丽. 射干麻黄汤加减联合布地奈德对寒痰郁肺型小儿毛细支气管炎患者治疗效果观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 24(8): 23-24.
- [9] 王亚君, 喜雷, 齐孟璐, 等. 布地奈德混悬液与特布他林雾化液雾化吸入治疗学龄前儿童肺炎支原体肺炎临床分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 23(5): 12-13.
- [10] 马静. 复方鲜竹沥液联合特布他林治疗儿童喘息性支气管炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(9): 2636-2639.
- [11] Rutenberg D, Venner M, Giguère S. Efficacy of Tulathromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia [J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2017, 31(3): 901-906.
- [12] 吴泽萍, 郭中敏, 陆家海. 他汀类药物对社区获得性肺炎影响的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(1): 120-124.
- [13] Ahmed KE, Lee SW, Kim JH, et al. Fatal fibrino-hemorrhagic bronchopneumonia associated with *Morganella morgani* in a bottlenose dolphin: A case report [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2017, 127(1): 41-47.
- [14] 宁俊凯, 庞素秋. 我院住院患者氧气雾化吸入给药的利用分析[J]. 中国药物警戒, 2018, 34(5): 66-67.
- [15] Xiaoyun Lin, Yanfang Wang, Miaomiao Zou, et al. A sensitive and fast analysis of terbutaline sulfate in food using modified electrode based on MoS₂/AuNPs nanocomposite [J]. Analytical methods, 2019, 11(10): 45-46.
- [16] Lei Zhou, Mohamad Sleiman, Corinne Ferronato, et al. Sulfate radical induced degradation of β 2-adrenoceptor agonists salbutamol and terbutaline: Phenoxy radical dependent mechanisms [J]. Water Res, 2017, 123: 715-723.
- [12] Xiang M, Li G, Yan M, et al. Expression of Th17 and CD4+ CD25+ T regulatory cells in peripheral blood of acute leukemia patients and their prognostic significance [J]. Pakistan J Pharm Sci, 2017, 30(2): 619-624.
- [13] 张潇予, 翟卫华, 张荣莉, 等. 急性白血化疗后感染初始体温峰值与粒细胞缺乏持续时间的相关性及其机制[J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26(3): 665-670.
- [14] 王熠, 刘佳好, 嵇成红, 等. 中性粒细胞 CD64 指数在慢性阻塞性肺疾病急性加重期细菌感染中的诊断价值[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(23): 1784-1790.
- [15] 王昌林, 金未来, 李雅雯, 等. 新生儿败血症的病原菌构成、降钙素原及 CD64 水平分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(5): 528-531.
- [16] 刘璇, 吴磊. 血清 IL-6、TNF- α 、CRP 及 CD64 对老年烧伤感染患者病情及创面愈合程度评估的意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(13): 3204-3207.
- [17] Ding X, Yang D, Ke C, et al. Value of evaluating procalcitonin kinetics in diagnosis of infections in patients undergoing laparoscopic radical cystectomy [J]. Medicine, 2017, 96(42): 8152-8159.
- [18] 张国民, 韩智炜, 牛兴杰, 等. PCT、IL-6、CD14、CD64 及 TNF- α 表达对肝衰竭合并医院感染患者预后的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(16): 2450-2453.
- [19] 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 1085 页)

重症 MPP 患儿 D-D、CRP、PAF 及血小板参数测定的临床意义

赵娜* 郑华月 乔瑞君

[摘要] **目的** 探讨重症肺炎支原体肺炎(MPP)患儿血清 D-二聚体(D-D)、C反应蛋白(CRP)、血小板活化因子(PAF)和血小板参数的变化的临床意义。**方法** 选取本院儿科收治的 MPP 患儿 139 例,根据病情分为重症组 44 例、轻症组 95 例;选择同期健康儿童 30 例作为对照组,对比各组 D-D、CRP、PAF、血小板计数(PLT)、血小板分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)差异;并对比重症组急性期、恢复期、是否伴有肺实变情况下上述指标的差异。**结果** 重症组、轻症组 D-D、CRP、PAF 高于对照组($P<0.05$),PLT、PCT 低于对照组($P<0.05$),重症组 D-D、CRP、PAF 高于轻症组($P<0.05$),PLT、PCT 低于轻症组($P<0.05$),重症组合并肺实变的患儿 D-D、CRP、PAF 高于未合并肺实变的患儿($P<0.05$),PLT、PCT 低于未合并肺实变的患儿($P<0.05$)。重症组急性期 D-D、CRP、PAF 高于恢复期($P<0.05$);PLT、PCT 低于恢复期($P<0.05$)。**结论** MPP 患儿处于血液高凝及炎症反应状态,检测 D-D、CRP、AFP 及血小板参数对病情具有评估价值。

[关键词] 重症肺炎;支原体;清 D-二聚体;C 反应蛋白;血小板活化因子;血小板参数

The clinical significance of D - D, CRP, PAF and platelet parameters in children with severe MPP

ZHAO Na*, ZHENG Huayue, QIAO Ruijun

(Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan, China, 473058)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the clinical significance of D-dimer (D-D), C-reactive protein (CRP), platelet activating factor (PAF) and platelet parameters in children with severe Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP). **Method** 139 children with MPP in our hospital were divided into the severe group (44 cases) and the mild group (95 cases), 30 healthy children in the same period were selected as the control group, and the differences of D-D, CRP, PAF, PLT, PDW, MPV and PCT were compared in each group. The levels of D-D, CRP, PAF, PLT, PDW, MPV and PCT were compared between acute stage and recovery stage, and whether or not with pulmonary consolidation. **Results** The levels of D-D, CRP and PAF were higher in the severe group and light group than those in the control group ($P<0.05$), PLT and PCT were lower in the severe group and light group than those in the control group ($P<0.05$), D-D, CRP and PAF were higher in the severe group than those in the mild group ($P<0.05$), PLT and PCT were lower in the severe group than those in the mild group ($P<0.05$), D-D, CRP and PAF in the severe group were higher with pulmonary consolidation than those with no pulmonary consolidation ($P<0.05$), PLT and PCT were lower with pulmonary consolidation than those with no pulmonary consolidation ($P<0.05$). D-D, CRP and PAF in the severe group were higher in acute stage than those in recovery stage ($P<0.05$), while PLT and PCT were lower

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201706214)

作者单位:南阳医学高等专科学校第一附属医院儿科二病区,河南,南阳 473058

*通信作者:赵娜, E-mail: zhaohan5@163.com

in acute stage than those in recovery stage ($P<0.05$). **Conclusions** Children with MPP are in a state of hypercoagulability and inflammatory reaction. The detection of D-D, CRP, AFP and platelet parameters has an evaluation value for the disease.

[KEY WORDS] Severe pneumonia; Mycoplasma; clear D-dimer; C-reactive protein; Platelet activating factor; Platelet parameter

肺炎支原体肺炎 (Mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP) 是常见呼吸系统疾病, 儿童多发, 其发病率逐年升高, 难治性 MPP 病例明显增多, 重症者可在出现呼吸异常、多器官衰竭、弥散性血管内凝血等^[1-2], 甚至危及患儿的生命。MPP 的发病及进展过程中, 机体处于炎症反应状态, 炎性介质引起的炎症反应以及激发的器官功能损害、凝血功能障碍等在 MPP 的进展中具有极其重要的作用。研究显示^[3-4], MPP 患者 D-二聚体 (D-dimer, D-D)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 常显示异常, 而在感染及呼吸系统疾病中, 血小板活化因子 (Platelet activating factor, PAF) 作为炎性细胞因子参与炎症反应的过程, 并且与气道的高反应性有关。因此 D-D, CRP 及 PAF 可能与 MPP 病情相关。目前, 临床实践中 MPP 有许多常见的观察指标, MP 感染引起的血小板计数变化较为常见^[5]。为进一步探讨 MPP 患儿 D-D、CRP、PAF 及血小板参数的变化极其临床意义, 本文就不同病情 MPP 患儿进行研究, 显报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院儿科 2018 年 3 月至 2019 年 12 月确诊的 MPP 患儿 139 例, 根据病情分为重症组 44 例, 年龄 2~13 岁, 平均 (6.2±2.8) 岁; 男 28 例、女 16 例; 体重 (22.8±3.0) kg; 其中伴有肺实变的有 23 例。轻症组 95 例, 年龄 2~13 岁, 平均 (6.3±2.4) 岁; 男 58 例、女 37 例; 体重 (22.6±2.5) kg。选择同期体检小儿 30 名作为对照组, 年龄 3~11 岁, 平均年龄 (6.4±2.3 岁), 其中男 18 例, 女 12 例, 重症组、轻症组及对照组的年龄、性别差异无统计学意义 ($P>0.05$), 患儿入选标准: ① MPP 患儿的诊断标准参考诸福棠《实用儿科学》中的标准^[6], MP-IgM 滴度持续 >1:80 或咽拭子检测确诊; ② MMP 分级符合中华医学会儿科学会呼吸学组 2015 年发布的《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识 (2015 年版)》; 排除标准: ① 支气管哮喘、支气管畸形; ② 既往伴有心肝肾、血液系统疾病; ③ 伴有免疫系统疾病、其他

系统严重感染性疾病; ④ 细菌性肺炎、病毒性肺炎、混合型肺炎。

1.2 指标检测方法

患儿及对照组入组后及重症组患者治疗进入缓解期后清晨采集空腹静脉血 3 管, 每管 2ml, 全血送检 D-D, CRP 及血小板参数, 由本院检验科完成检验。1 管分离血清, 检测 PAF, PAF 检测方法为酶联免疫吸附法, 检测仪器为 Multiskan Sky 全波长酶标仪 (赛默飞世尔公司), 试剂盒购自上海酶联生物试剂公司。检测过程严格按照试剂及仪器使用说明书进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 SLN-q 检验; 计数资料用 $n(\%)$ 表示, 用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异, 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患儿急性期的 D-D、CRP、PAF 及血小板参数测定结果比较

重症组及轻症组 D-D、CRP、PAF 水平高于对照组 ($P<0.05$), PLT、PCT 低于对照组 ($P<0.05$), 重症组 D-D、CRP、PAF 水平高于轻症组 ($P<0.05$), PLT、PCT 低于轻症组 ($P<0.05$)。各组 PDW、MPV 水平无显著差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 是否伴有肺实变的重症 MPP 患儿急性期的 D-D、CRP、血小板参数测定结果比较

重症组合并肺实变的患儿 D-D、CRP、PAF 高于未合并肺实变的患儿 ($P<0.05$), PLT、PCT 低于未合并肺实变的患儿 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 重症 MPP 患儿急性期和恢复期的 D-D、CRP、PAF、血小板参数测定结果比较

急性期重症 MPP 患儿的血清 D-D、CRP 测定结果低于恢复期患儿, PLT、PCT 测定结果高于恢复期患儿, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表1 各组D-D、CRP、PAF及血小板参数比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of D-D, CRP, PAF and platelet parameters in each groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D-D($\mu\text{g/L}$)	CRP(mg/L)	PLT($\times 10^9/\text{L}$)	PAF(ng/ml)	PDW(%)	MPV(fl)	PCT(%)
重症组	44	1641.8 \pm 229.1 ^{ab}	64.2 \pm 19.5 ^{ab}	186.8 \pm 33.7 ^{ab}	11.06 \pm 2.19	10.73 \pm 1.86	9.48 \pm 0.88	0.12 \pm 0.03 ^{ab}
轻症组	95	303.1 \pm 69.5 ^a	22.7 \pm 6.2 ^a	214.9 \pm 68.5 ^a	6.42 \pm 0.27	10.51 \pm 1.70	9.60 \pm 0.92	0.19 \pm 0.04 ^a
对照组	30	216.4 \pm 21.4	4.13 \pm 0.26	257.8 \pm 11.4	2.49 \pm 0.72	10.59 \pm 1.62	9.54 \pm 0.74	0.22 \pm 0.06
F值		52.187	118.852	8.079	44.016	0.689	0.725	6.510
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.492	0.470	0.000

注:a表示同对照组比较 $P < 0.05$, b表示同轻症组比较 $P < 0.05$ 。

表2 是否伴有肺实变的重症MPP患儿急性期的D-D、CRP、血小板参数测定结果比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of D-D, CRP and platelet parameters in acute stage of severe MPP with or without pulmonary consolidation ($\bar{x} \pm s$)

肺实变情况	n	D-D($\mu\text{g/L}$)	CRP(mg/L)	PLT($\times 10^9/\text{L}$)	PAF(ng/mL)	PDW(%)	MPV(fl)	PCT(%)
是	23	1918.5 \pm 220.7	71.2 \pm 19.5	193.8 \pm 32.1	15.2 \pm 3.09	10.82 \pm 1.46	9.48 \pm 0.88	0.09 \pm 0.03
否	21	1220.1 \pm 169.0	56.4 \pm 15.3	276.5 \pm 31.4	7.16 \pm 1.84	10.64 \pm 1.69	9.57 \pm 0.76	0.18 \pm 0.06
t值		11.700	1.027	8.625	16.542	0.313	-0.669	-3.545
P值		0.000	0.310	0.000	0.000	0.756	0.507	0.001

表3 重症MPP患儿急性期和恢复期的D-D、CRP、血小板参数测定结果比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of the measurement results of D-D, CRP, PAF and platelet parameters in acute and convalescent period of children with severe MPP ($\bar{x} \pm s$)

时间	n	D-D($\mu\text{g/L}$)	CRP(mg/L)	PLT($\times 10^9/\text{L}$)	PAF(ng/mL)	PDW(%)	MPV(fl)	PCT(%)
急性期	139	1641.8 \pm 229.1	64.2 \pm 19.5	186.8 \pm 33.7	11.06 \pm 2.19	10.73 \pm 1.86	9.48 \pm 0.88	0.12 \pm 0.07
恢复期	139	377.9 \pm 88.3	14.2 \pm 5.0	256.4 \pm 55.4	5.94 \pm 1.13	10.61 \pm 1.80	9.71 \pm 0.81	0.21 \pm 0.08
t值		60.690	28.112	10.473	12.396	0.547	-2.267	5.545
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.585	0.024	0.000

3 讨论

MPP发病可急可缓,以发热、咳嗽为主要表现,大约25%的患儿可有肺外表现^[7]。近年来,MPP的发病率呈上升趋势^[8],已成为儿科医生关注的热点。目前,通过评估临床试验中的相关因素,有许多关于MPP临床治疗的报道^[9]。DD是与MPP密切相关的因素,它是体内异常凝血和纤维蛋白溶解的重要因素,也是MPP患者炎症反应的重要因素,可显著影响纤维蛋白溶解系统和凝血功能,血清DD水平可异常升高,CRP是由肝脏合成的蛋白质,是全身炎症的非特异性标志物,可反映各种感染和非感染性炎症。此外,CRP在病毒感染中的升高并不明显,CRP升高程度与肺炎的严重程度和原因有关,有助于MPP的检测。PAF在机体的多种组织及细胞中表达,具有活化血小板,介导炎症反应的作用,尤其在感染性疾病中,血液的高凝状态能够促导致循环阻力的增

加,尤其是小血管及微血管,进而促进PAF的表达,引起炎症反应及血小板的活化,进而加速微血栓的形成,不仅引起肺血管床的病变,也导致肺部换气功能的下降及气道反应性的增高,最终引起肺部病变的加重和肺部功能的下降^[10]。在MPP患儿中,PAF明显增高,随着病情的加重,重症组PAF增高,而且在伴有肺部实变的患儿,MPP增高的更为明显,提示PAF有助于MPP患儿病情的评估。

血小板有助于增加血液粘度和促进血液凝固,肺炎由于缺氧和毒素,肺泡血管内皮细胞经常受损,释放炎症因子致血管痉挛,血栓形成,血小板计数往往增加^[11]。因此,血小板计数与肺炎的严重程度和炎症因子的释放呈正相关。

结果显示MP感染可诱发MPP患儿血清D-D水平的改变,可能成为其肺外栓塞并发症的影响因素之一。CRP在MPP血液浓度的异常亦得到多个研究证实^[12],且与其病情相关。本研究结果提

示其与患儿病情可能相关,可能作为其病情评估的参考指标。在急性期,有明显的缺氧和CO₂潴留现象,导致产生大量氧自由基,攻击血小板并增加其损伤几率。

D-D也是反映凝血和纤溶的指标,其水平的异常可导致炎症反应的发生,故D-D水平对疾病的早期诊断、病情分级判断以及预后均有一定的临床价值,与某些临床研究结果一致^[13-14]。血小板活化因子参与气道的炎症反应,急性期时,重症患儿肺部微血管内皮损伤明显,多种凝血活性物质释放,血小板过度消耗,PLT、PCT较无肺实质病变患儿低。血小板参数可以作为早期预测及判断MPP患儿肺部损伤程度的有效指标之一,并且对患儿预后具有积极的指导作用。

杨雪等^[15]的研究表明,血小板参数PLT、PCT水平的变化,可早期诊断MPP并判断其病情变化。本研究从两方面说明炎症MPP的发病原因,确定了MPP引起的一系列变化,所验证的结果更加全面且更具有说服力,进一步为判断MPP的病情变化提供临床指导依据。本研究虽然取得了理想的实验结果,但也存在不足之处,本次研究纳入病例较少,今后在下一步的临床研究中应扩大样本量进行更加深入的研究。

参考文献

- [1] 孙志豪,张荣华,钟超珍,等. 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, 2019, 11(4):329-337
- [2] Søndergaard MJ, Friis MB, Hansen DS, et al. Clinical manifestations in infants and children with *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Plos One, 2018, 13(4):1-10.
- [3] 宋健波,付俊生. 不同影像表现肺炎支原体肺炎患儿血D-二聚体和CRP检测分析[J]. 北京医学, 2018, 40(7):654-656.
- [4] 陈启锋. 支原体肺炎患儿联合检测D-二聚体、LDH、CRP、ESR的临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(16):3813-3815.
- [5] 纵雪峰,种丽芳,刘道路,等. PCT、CRP在肺炎支原体肺炎患儿中的表达及与MP-IgM抗体的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7):964-967+973.
- [6] 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2002:744-771.
- [7] 中华医学会儿科学会呼吸学组. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17):1304-1308
- [8] Yoon IA, Hong KB, Lee HJ, et al. Radiologic findings as a determinant and no effect of macrolide resistance on clinical course of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Bmc Inf Dis, 2017, 17(1):402-404.
- [9] Liu F, Zhao YH, Lu JM, et al. Hyperoside inhibits proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 453(1):179-186.
- [10] 吴挺实,梁勇,陈钰,等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的血小板活化及氧化应激变化研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(16):2384-2386.
- [11] 郭冰冰,路明,武怡. 重症肺炎支原体肺炎患儿血清 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88 及 D-二聚体水平检测的意义 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(32):1712-1715.
- [12] 冯素芳,李军,秦洁,等. 儿童肺炎支原体肺炎血清学检测结果及分析[J]. 河北医药, 2018(1):2481-2484.
- [13] Hai-Yan GU, Wang Q, Zhao DY, et al. Analysis of the relationship between plasma levels of D-dimer and the severity of *mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Chin J Practical Pediatrics, 2016, 31(9):694-697.
- [14] Guo SC, Xu CW, Liu YQ, et al. [Changes in plasma levels of thrombomodulin and D-dimer in children with different types of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia]. [J]. Chin J Cont Pediatrics, 2013, 15(8):619-621.
- [15] 杨雪,林荣军,金蓉,等. 重症支原体肺炎患儿血小板参数测定的临床意义[J]. 中华诊断学电子杂志, 2018, 6(01):37-40.

miR-182-5p 通过 *HOXB7* 基因调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭迁移

肖飞* 辛士永 邵长帅 张建国 高中伟

[摘要] 目的 探讨微小RNA-182-5p(miR-182-5p)对膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其分子机制。方法 实时荧光定量PCR(qPCR)检测正常膀胱上皮细胞(HUC)和膀胱癌细胞(T24、5637、SW780)中miR-182-5p和同源异型盒基因B7(*HOXB7*)表达;生物学信息预测和双荧光素酶报告基因实验分析miR-182-5p和*HOXB7*的靶向关系;蛋白质印迹法(Western Blot)检测过表达miR-182-5p或抑制*HOXB7*表达对SW780细胞中*HOXB7*、P53和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)蛋白水平的影响;噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖,Transwell小室法检测细胞侵袭和迁移。共转染pcDNA-*HOXB7*和miR-182-5p模拟物,观察过表达*HOXB7*对miR-182-5p作用于膀胱癌细胞的影响。结果 HUC细胞相比,miR-182-5p在膀胱癌细胞系中表达下调($P<0.05$),*HOXB7* mRNA和蛋白表达上调($P<0.05$)。miR-182-5p在SW780细胞中的表达量最低。*HOXB7*是miR-182-5p的靶基因。miR-182-5p过表达可抑制细胞活力、侵袭和迁移,降低P53和MMP-2蛋白表达量,差异有统计学意义($P<0.05$),与抑制*HOXB7*表达结果相同。过表达*HOXB7*可以逆转miR-182-5p对膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用。结论 miR-182-5p通过靶向调控*HOXB7*表达抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移。

[关键词] 膀胱癌;细胞;miR-182-5p;*HOXB7*

miR-182-5p regulates the proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells through the *HOXB7* gene

XIAO Fei*, XIN Shiyong, SHAO Changshuai, ZHANG Jianguo, GAO Zhongwei

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China, 471000)

[ABSTRACT] Objective To explore the role of microRNA - 182 - 5p (miR - 182 - 5p) in cell proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells and the underlying mechanism. Methods The miR - 182 - 5p and homeobox B7 gene (*HOXB7*) mRNA expression levels in normal bladder epithelial cells (HUC) and bladder cancer cells (T24, 5637, SW780) were detected by real-time quantitative PCR (qPCR). The biological information and the dual luciferase reporter gene assay were applied to analyze the targeting relationship between miR-182-5p and *HOXB7*; Western blot was used to examine the effect of overexpressing miR-182-5p or inhibition of *HOXB7* expression on *HOXB7*, P53 and matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) protein levels in SW780 cells. MTT assay was employed to investigate cell proliferation, and Transwell assay was adopted to observed cell invasion and migration. The pcDNA-*HOXB7* and miR-182-5p mimics were co-transfected to investigate the impacts of *HOXB7* overexpression on bladder cancer cells. Results Compared with HUC cells, miR-182-5p expression was down-regulated in bladder cancer cells while *HOXB7* mRNA and protein expressions were up-regulated ($P<0.05$). SW780 cells got the lowest expression level of miR-182-5p. *HOXB7* was a target gene of miR - 182 - 5p. Besides, overexpression of miR - 182 - 5p, as well as inhibition

基金项目:河南省科技攻关计划基金资助项目(172102310588)

作者单位:河南科技大学第一附属医院泌尿外科,河南,洛阳 471000

*通信作者:肖飞, E-mail: 17566349@qq.com

expression of *HOXB7*, significantly suppressed cell proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells, reduced the levels of P53 and MMP-2 proteins, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In addition, overexpression of *HOXB7* reversed the inhibitory effects of miR-182-5p on cell proliferation, invasion and migration. **Conclusion** miR-182-5p inhibits cell proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells by targeting and regulating *HOXB7*.

[KEY WORDS] Bladder cancer; Cell; MiR-182-5p; *HOXB7*

膀胱癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率逐年上升。因此,揭示膀胱癌发生发展的分子机制,寻找早期诊断和治疗靶点极具意义。微小RNAs (microRNAs, miRNAs/miR) 是一种内源性非编码RNA,在膀胱癌等肿瘤中扮演着重要角色^[1-3]。证据表明,微小RNA-182-5p (microRNA-182-5p, miR-182-5p) 在膀胱癌细胞中低表达,上调其表达可抑制癌细胞增殖和迁移侵袭^[4]。但miR-182-5p参与膀胱癌细胞增殖和侵袭迁移的分子机制尚不明确。生物学信息软件预测出miR-182-5p可能靶向同源异型盒基因B7 (homeobox B7 gene, *HOXB7*),并且资料显示,*HOXB7*在皮肤鳞状细胞癌细胞中高表达,沉默miR-182-5p抑制癌细胞的增殖转移^[5]。而miR-182-5p是否通过靶向*HOXB7*调控膀胱癌细胞的增殖和侵袭迁移,这方面的研究鲜见报道。因此,本研究考察miR-182-5p对膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响,旨在阐明其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验主要试剂和仪器

正常膀胱上皮细胞(SV-HUC-1, HUU)和膀胱癌细胞(T24、5637、SW780)购自美国ATCC公司,miR-182-5p模拟物、阴性对照质粒(miR-NC)、荧光素酶报告载体购自上海吉玛生物有限公司,*HOXB7*、P53、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases2, MMP-2)蛋白抗体购自美国Cellular Signaling Technology公司。ABI 7500荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.2 细胞培养

HUC、T24、5637、SW780细胞置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基常规培养。

1.3 实时荧光定量PCR检测目的基因表达

采用Trizol试剂提取细胞总RNA,反转录成互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA),按照qPCR试剂盒说明书进行反应。条件为95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃退火45 s,72℃延

伸30 s,40个循环。收集Ct值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-182-5p、*HOXB7* mRNA相对表达量。

1.4 蛋白质印迹法(Western Blot)

细胞中加入蛋白裂解液提取总蛋白,经10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE),转移到聚偏二氟乙烯膜,常温下5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗,4℃孵育过夜,加入二抗,室温孵育1 h,化学发光液进行显色、曝光,以 β -actin为内参,计算蛋白相对表达量。

1.5 细胞转染、增殖

将SW780细胞接种于6孔板,生长至70%融合度,按照Lipofectamine 2000试剂说明书的指示,将miR-182-5p、anti-miR-182-5p、si-*HOXB7*及相应的阴性对照转染入细胞。

收集转染后的SW780细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板,培养24 h、48 h、72 h后,每孔加入100 μ L MTT溶液,37℃孵育4 h,加入200 μ L 二甲基亚砷,摇床孵育10 min,酶标仪检测细胞在490 nm处的吸光度值(OD_{490 nm}值)。

1.6 Transwell小室法检测细胞迁移和侵袭能力

细胞侵袭实验中,将Matrigel胶与无血清培养基混匀,加入Transwell上室。细胞用无血清培养基调整为 5×10^5 个/mL,吸取100 μ L于上室。下室加入含10%胎牛血清的培养基。37℃培养48 h后,用无菌棉签除去多余细胞和Matrigel胶,甲醛固定和结晶紫染色,显微镜下拍照、计数。

细胞迁移实验中,Transwell上室不加入Matrigel胶,其余步骤与侵袭实验相同。

1.7 靶基因预测及双荧光素酶基因报告

利用TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)软件筛选出miR-182-5p与*HOXB7*的3'非编码区(3'untranslated region, 3'UTR)区域具有部分结合位点。为了证实miR-182-5p与*HOXB7*是否存在靶向关系,分别构建野生型*HOXB7*(*HOXB7*-WT)和突变型*HOXB7*(*HOXB7*-MUT)的3'UTR荧光素酶报

告载体,并分别共转染 miR-182-5p 模拟物,37℃、5% CO₂培养 48 h,收集细胞,测定双荧光素酶活性。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计数资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,组间多重比较用 SNK-*q* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-182-5p 和 HOXB7 在正常膀胱上皮 HUC 细胞与膀胱癌细胞 T24、5637、SW780 中的表达

与 HUC 细胞相比, T24、5637、SW780 细胞中 miR-182-5p 表达量显著减少, HOXB7 mRNA 和蛋白表达量显著升高,差异有统计学意义(*P*<0.05)见表 1。

表 1 miR-182-5p 和 HOXB7 在正常膀胱上皮细胞和膀胱癌细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Expressions of miR-182-5p and HOXB7 in normal bladder epithelial cells and bladder cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	miR-182-5p	HOXB7 mRNA	HOXB7 蛋白
HUC	1.00±0.14	1.00±0.12	0.29±0.05
T24	0.46±0.04 ^a	4.16±0.35 ^a	0.73±0.05 ^a
5637	0.58±0.07 ^a	3.88±0.41 ^a	0.67±0.06 ^a
SW780	0.41±0.05 ^a	5.82±0.39 ^a	0.88±0.08 ^a
<i>F</i> 值	90.409	315.752	151.260
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

表 2 过表达 miR-182-5p 对 SW780 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effects of overexpression of miR-182-5p on cell proliferation, migration and invasion in SW780 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

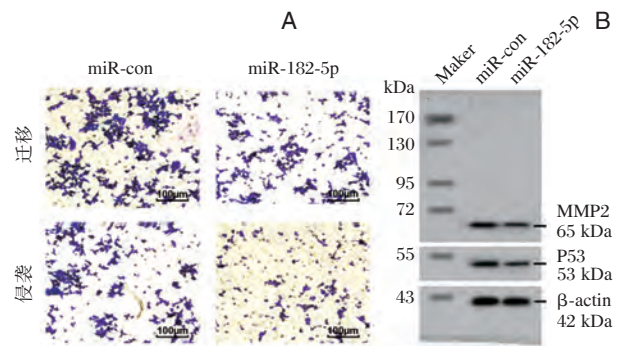
分组	miR-182-5p	细胞活力(OD _{490 nm})			细胞迁移数(个)	细胞侵袭数(个)	P53 蛋白	MMP-2 蛋白
		24 h	48 h	72 h				
miR-con	1.00±0.08	0.44±0.04	0.71±0.07	1.05±0.13	107.65±11.27	48.28±5.64	0.53±0.07	0.67±0.06
miR-182-5p	3.61±0.36	0.42±0.06	0.59±0.06	0.77±0.08	39.26±4.53	18.64±4.71	0.28±0.05	0.38±0.07
<i>t</i> 值	21.232	0.832	4.992	5.503	16.892	12.101	8.719	9.437
<i>P</i> 值	0.000	0.418	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 miR-182-5p 靶向调控 HOXB7 表达

TargetScan 网站预测发现 HOXB7 的 3' UTR 中含有与 miR-182-5p 互补的核苷酸序列(图 2A)。转染 miR-182-5p 模拟物明显降低 HOXB7 表达水平,转染 anti-miR-182-5p 模拟物显著提高 HOXB7 表达水平,差异有统计学意义(*P*<0.05)(图 2B)。双荧光素酶基因报告实验发现,miR-182-5p 显著抑制野生型 HOXB7(HOXB7-WT)报告基因的荧光素酶相对活性(*P*<0.05),而对突变型 HOXB7(HOXB7-MUT)荧光素酶相对活性无显著

2.2 过表达 miR-182-5p 对 SW780 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与 miR-con 组比较,过表达 miR-182-5p 降低 SW780 细胞活力,且在 48 h 和 72 h 差异有统计学意义(*P*<0.05)。与 miR-con 组比较,过表达 miR-182-5p 显著降低 SW780 细胞的迁移、侵袭数(*P*<0.05)(图 1A),P53 和 MMP-2 蛋白的表达量显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05)。图 1B、见表 2。



注:A. Transwell 小室法检测 SW780 细胞迁移和侵袭的细胞数; B. Western blot 检测过表达 miR-182-5p 对 SW780 细胞增殖和迁移相关蛋白表达的影响。

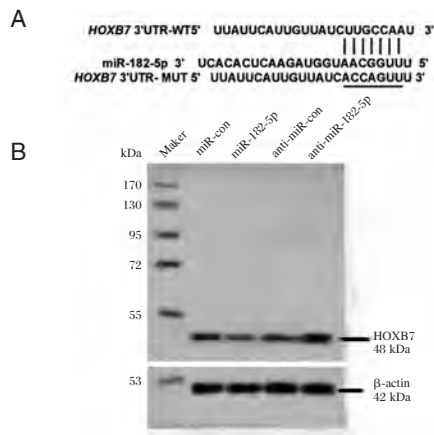
图 1 过表达 miR-182-5p 对 SW780 细胞迁移、侵袭和相关蛋白表达的影响 (CVS, ×100)

Figure 1 Effects of overexpression of miR-182-5p on migration, invasion and related protein expressions of SW780 cells (CVS, ×100)

影响,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 3。

2.4 抑制 HOXB7 表达对 SW780 细胞增殖、迁移和侵袭的作用

在 SW780 细胞中转染 si-HOXB7 载体,与 si-con 组相比,si-HOXB7 组细胞中 HOXB7 表达量明显降低,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与 si-con 组比较,si-HOXB7 组 SW780 细胞活力在 48、72 h 时显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),P53 和 MMP-2 的蛋白表达量显著下调,差异有统计学意义(*P*<0.05),细胞的迁移数和侵袭



注: A. HOXB7的3'UTR中含有与miR-182-5p互补的核苷酸序列; B. Western blot检测miR-182-5p对HOXB7蛋白表达的影响。

图2 miR-182-5p靶向调控HOXB7蛋白表达

Figure 2 miR-182-5p targeted and regulated HOXB7 protein expression

表3 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Dual luciferase reporter experiment ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	HOXB7-WT	HOXB7-MUT
miR-con	1.00±0.13	0.98±0.07
miR-182-5p	0.59±0.06	1.08±0.13
t值	8.591	2.032
P值	0.000	0.059

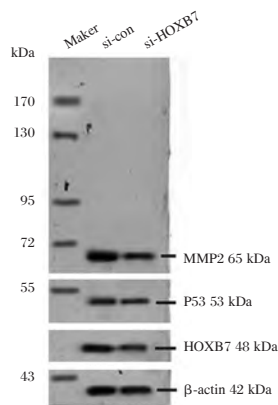


图3 Western blot检测SW780细胞HOXB7、P53和MMP-2蛋白表达

Figure 3 Western blot analysed expressions of HOXB7, proliferation and migration-related protein in SW780 cells

表4 抑制HOXB7表达对SW780细胞增殖、迁移和侵袭的作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

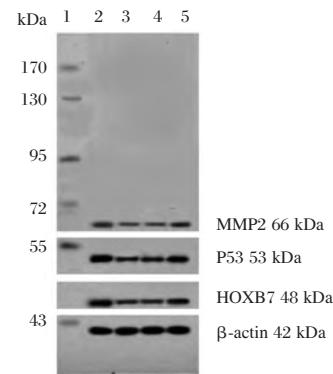
Table 4 Inhibition of HOXB7 expression on proliferation, migration and invasion of SW780 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	细胞活力 (OD _{490 nm})			细胞迁移数 (个)	细胞侵袭数 (个)	HOXB7蛋白	P53蛋白	MMP-2蛋白
	24 h	48 h	72 h					
si-con	0.42±0.04	0.68±0.05	1.09±0.07	113.69±13.19	53.47±6.16	0.88±0.08	0.63±0.07	0.74±0.08
si-HOXB7	0.38±0.05	0.45±0.04	0.76±0.08	42.53±8.55	25.29±4.29	0.27±0.06	0.31±0.08	0.37±0.06
t值	1.874	10.776	9.313	13.581	11.262	18.300	9.031	11.100
P值	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

数均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3、表4。

2.5 过表达HOXB7逆转了miR-182-5p对SW780细胞增殖、迁移和侵袭的作用

与miR-con相比,过表达miR-182-5p显著影响48 h和72 h的SW780细胞活力、细胞迁移、侵袭数目、P53和MMP-2表达,差异有统计学意义($P<0.05$),与2.2研究结果相同。另外,过表达miR-182-5p还减少HOXB7表达量。与共转染miR-182-5p和pcDNA相比,共转染miR-182-5p和pcDNA-HOXB7显著提升HOXB7、P53和MMP-2蛋白表达水平以及细胞迁移、侵袭数目($P<0.05$),以及提高SW780细胞活力,在48、72 h差异有统计学意义($P<0.05$)。见图4和表5。



注: 1. Maker; 2. miR-con; 3. miR-182-5p; 4. miR-182-5p+pcDNA; 5. miR-182-5p+pcDNA-HOXB7。

图5 SW780细胞HOXB7、增殖和迁移相关蛋白表达

Figure 5 Expressions of HOXB7, proliferation and migration-related protein in SW780 cells

3 讨论

miRNAs通过与互补信使RNA的3'UTR特异性结合来调控基因表达,影响细胞功能和多种生物学过程^[6-8],可作为癌症早期诊断和治疗的生物标志物,在膀胱癌等癌症中具有良好的应用价值^[9-10]。既往研究表明,在不同类型的癌症中,

表5 过表达 *HOXB7* 逆转了 miR-182-5p 对 SW780 细胞增殖、迁移和侵袭的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Table 5 Overexpression of *HOXB7* reversed the effects of miR-182-5p on proliferation, migration and invasion of SW780 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

分组	细胞活力(OD _{490 nm})			细胞迁移数 (个)	细胞侵袭数 (个)	HOXB7 蛋白	P53 蛋白	MMP-2 蛋白
	24 h	48 h	72 h					
miR-con	0.43±0.04	0.72±0.07	1.10±0.09	109.38±10.24	58.04±5.28	0.69±0.06	0.72±0.05	0.74±0.08
miR-182-5p	0.39±0.04	0.47±0.05 ^a	0.67±0.06 ^a	38.63±3.58 ^a	18.47±4.35 ^a	0.45±0.06 ^a	0.42±0.04 ^a	0.35±0.04 ^a
miR-182-5p+pcDNA	0.40±0.05	0.51±0.05	0.74±0.06	49.56±4.17	21.69±3.37	0.49±0.06	0.45±0.05	0.31±0.05
miR-182-5p+pcDNA-HOXB7	0.41±0.05	0.66±0.04 ^b	0.96±0.09 ^b	72.46±10.83 ^b	41.29±4.73 ^b	0.62±0.06 ^b	0.57±0.06 ^b	0.64±0.06 ^b
<i>F</i> 值	1.281	44.452	60.449	139.513	152.102	65.079	40.324	115.234
<i>P</i> 值	0.298	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-con 组比较, ^a $P<0.05$;与 miR-182-5p+pcDNA 组比较, ^b $P<0.05$ 。

miR-182-5p 作为癌基因或抑癌基因发挥生物学功能。一方面,扮演癌基因的角色促进细胞增殖或转移,如 miR-182-5p 在口腔鳞状细胞癌中表达上调;促进口腔鳞癌细胞增殖^[11]。胃癌组织和细胞系中 miR-182-5p 表达上调;miR-182-5p 下调了降低胃癌细胞的活力、迁移、侵袭和有丝分裂^[12]。另一方面,miR-182-5p 作为抑癌基因,抑制肿瘤的发生发展过程,如 miR-182-5p 在卵巢癌中表达下调,其上调导致卵巢癌细胞的增殖、克隆形成和迁移能力受到抑制^[13]。在结直肠癌中,miR-182-5p 表达显著下调;结直肠癌 SW620 细胞的增殖、侵袭和迁移能力被 miR-182-5p 过表达所抑制,miR-182-5p 显现出抗癌作用^[14]。本项实验发现,与卵巢癌^[13]、结直肠癌^[14]相同,miR-182-5p 在膀胱癌细胞系中的表达下调。过表达 miR-182-5p 抑制膀胱癌 SW780 细胞活力、迁移和侵袭能力,与 Wang 等^[4]研究相同。

本实验发现, *HOXB7* mRNA 和蛋白表达在膀胱癌中表达上调,提示 *HOXB7* 可能参与膀胱癌进程。*HOXB7* 是同源异形盒基因(homeobox gene, *Hox*)家族成员之一,与癌症发生发展密切相关。Huan 等^[15]和 Huo 等^[16]的研究表明, *HOXB7* 在肝癌、胶质瘤的表达上调,下调 *HOXB7* 表达会抑制肝癌、胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移。这些结果说明 *HOXB7* 具有致癌作用,可以促进癌细胞增殖和转移。本项实验同样证实了这一观点,即 *HOXB7* 对膀胱癌进程具有一定的促进作用,抑制 *HOXB7* 表达可以抑制膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭。

在不同的肿瘤中,多个基因已被证实为 miR-182-5p 的直接靶标,如丝切蛋白 1 (cofilin 1,

CFL1)^[2]、异粘蛋白(Metadherin, *MTDH*)^[14]等。本实验结果证明 miR-182-5p 抑制膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用可能是通过靶向调控 *HOXB7* 表达来实现的。

综上所述,miR-182-5p 可以通过靶向调控 *HOXB7* 的表达,从而影响膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。这为膀胱癌提供了新的治疗靶点和生物标志物。

参考文献

- [1] 田敬华, 杨金玲, 秦杰, 等. miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(1): 17-21.
- [2] Bhanvadia SK. Bladder cancer survivorship [J]. Curr Urol Rep, 2018, 19(12): 111.
- [3] Martinez RRH, Buisan RO, Ibarz L. Bladder cancer: Present and future[J]. Med Clin (Barc), 2017, 149(10): 449-455.
- [4] Wang F, Wu DL, Xu ZP, et al. miR-182-5p affects human bladder cancer cell proliferation, migration and invasion through regulating *Cofilin 1* [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1):42-31.
- [5] Gao D, Chen HQ. Specific knockdown of *HOXB7* inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell migration and invasion while inducing apoptosis via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(5): C675-C686.
- [6] 范幸, 周燕飞, 祖月娥. 微RNA-204 通过调控埃兹蛋白表达影响宫颈癌 Hela 细胞的侵袭性[J]. 中华生物医学工程杂志, 2016, 22(6):465-469.
- [7] Puik JR, Meijer LL, Le L, et al. miRNA profiling for diagnosis, prognosis and stratification of cancer treatment in cholangiocarcinoma[J]. Pharmacogenomics, 2017, 18(14): 1343-1358.
- [8] Yu L, Shen X, Zhong D, et al. Three-layer heterogeneous network combined with unbalanced random walk for miRNA-disease association prediction[J]. Front Genet, 2020, 10(1): 1316.

血清CYR61、IGF-1水平对胫骨平台骨折术后愈合延迟的预测价值

郑海亮 刘晶*

[摘要] **目的** 探究血清富含半胱氨酸蛋白61(CYR61)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)水平对胫骨平台骨折术后愈合延迟的预测价值。**方法** 收集2014年1月至2016年6月入院的胫骨平台骨折术后愈合延迟患者65例为愈合延迟组,同时招募胫骨平台骨折术后正常愈合的患者55例为正常愈合组,采用ELISA法于术前、术后4周及术后12周检测各组受试者血清CYR61、IGF-1水平,分析胫骨平台骨折术后愈合延迟与血清CYR61、IGF-1水平的关系,采用受试者工作曲线(ROC曲线)分析血清CYR61、IGF-1水平预测骨愈合延迟的价值。**结果** 术前两组血清CYR61、IGF-1水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);术后4周和12周时,愈合延迟组CYR61分别为(72.09±17.74)、(113.48±22.38)pg/mL,IGF-1分别为(289.63±29.75)、(410.55±48.56)ng/mL,均显著低于正常愈合组($P<0.05$);血清IGF-1水平对胫骨平台骨折术后患者愈合延迟的预测价值高且稳定($AUC_{术后4周}=0.732$, $AUC_{术后12周}=0.830$),CYR61水平在术后12周对胫骨平台骨折术后患者愈合延迟的预测效果最好($AUC_{术后4周}=0.651$, $AUC_{术后12周}=0.813$);胫骨平台骨折术后患者血清CYR61与IGF-1水平呈正相关($P<0.05$)。**结论** 胫骨平台骨折患者血清CYR61、IGF-1水平预测其术后愈合延迟有较高价值,可作为潜在的血清标志物。

[关键词] CYR61; IGF-1; 胫骨骨折; 愈合延迟; 预测

Predictive value of serum CYR61 and IGF-1 levels for healing delay after tibial plateau fracture surgery

ZHENG Hailiang, LIU Jing*

(Orthopedics Department, Yangguang Ronghe Hospital, Weifang, Shandong, China, 261042)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the predictive value of serum cysteine-rich protein 61 (CYR61) and insulin growth factor-1 (IGF-1) levels for healing delay after tibial plateau fracture surgery. **Methods** A total of 65 patients with healing delay after tibial plateau fracture surgery who were admitted to the hospital from January 2014 to June 2016 were enrolled as the healing delay group, while 55 patients with normal healing after tibial plateau fracture surgery were enrolled as the normal healing group. The levels of serum CYR61 and IGF-1 in each group were measured before surgery, at 4 weeks and 12 weeks after surgery by ELISA. The relationship between healing delay and serum CYR61, IGF-1 levels after tibial plateau fracture surgery was analyzed. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) was applied to analyze the predictive value of serum CYR61 and IGF-1 levels for bone healing delay. **Results** Before surgery, there were no significant differences in levels of serum CYR61 and IGF-1 between the two groups ($P>0.05$). At 4 weeks and 12 weeks after surgery, levels of CYR61 and IGF-1 in the healing delay group were [(72.09±17.74), (113.48±22.38)pg/mL] and [(289.63±29.75), (410.55±48.56)ng/mL], which significantly lower than those in the normal healing group ($P<0.05$). The predictive value of serum IGF-1 level was high and stable for heal-

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2017WS835)

作者单位:山东阳光融和医院骨科,山东,潍坊 261042

*通信作者:刘晶, E-mail:liujing-suh@sinosig.com

ing delay in patients after tibial plateau fracture surgery AUC at 4 week after surgery=0.732, AUC at 12 weeks after surgery=0.830). The predictive effect of CYR61 level was the best for healing delay of patients after tibial plateau fracture surgery on the 12th week after surgery (AUC at 4 week after surgery=0.651, AUC at 12 weeks after surgery=0.813). Serum CYR61 level was positively correlated with IGF-1 level after tibial plateau fracture surgery. Conclusion Serum CYR61 and IGF-1 levels in patients with tibial plateau fractures have a high value in predicting delayed healing after surgery, and can be used as potential serum markers.

[KEY WORDS] CYR61; IGF-1; Tibial fracture; Healing delay; Prediction

胫骨平台是膝关节的重要负荷结构,骨折后容易对周围韧带和半月板造成损伤^[1]。临床上常用的治疗方法有关节镜辅助手术、经皮螺钉接骨板微创固定、内固定与外固定器联合使用等,然而由于骨折部血运差,且伴有韧带及半月板的损伤,术后容易发现愈合延迟的现象,对患者生理、心理及经济上均造成一定的负担,且严重影响患者术后生活质量^[2];因此,解决胫骨平台骨折患者术后出现的愈合延迟十分重要。富含半胱氨酸蛋白61 (Cysteine-rich 61, CYR61)可参与软骨组织、血管等生成^[3],胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)是骨生长刺激因子^[4], CYR61、IGF-1均在骨折愈合过程中有重要作用,但血清CYR61、IGF-1水平在胫骨平台骨折术后愈合延迟的应用价值,尚需进一步研究探讨。本研究通过检测胫骨平台骨折延迟愈合患者CYR61、IGF-1水平,探讨上述指标在胫骨平台骨折延迟愈合患者中的表达情况及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2014年1月至2016年6月入院治疗胫骨平台骨折患者110例为研究对象,其中正常愈合患者55例为正常愈合组,愈合延迟患者65例为愈合延迟组。愈合延迟组患者年龄21~55岁,平均(38.24±9.41)岁,男35例、女30例,AO分型:A型骨折20例、B型28例、C型17例,骨折类型:开放性11例、闭合性54例;正常愈合组患者年龄24~60岁,平均(39.05±8.49)岁,男29例、女26例,AO分型:A型骨折18例、B型25例、C型12例,骨折类型:开放性8例、闭合性47例。两组年龄、性别、AO分型、骨折类型等资料无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。

纳入标准:①所有患者经X光片检查确诊为胫骨平台骨折,均行外科手术治疗;②骨折愈合延迟的诊断标准^[5]为正常愈合时间内(4个月)未完全愈合;③年龄18~60岁;④依从性好;⑤临床资料

完整。排除标准:①病理性骨折;既往胫骨平台骨折史;②既往患肢外科手术史;③心、肝、肾等重要器官功能障碍;严重感染;④合并恶性肿瘤;⑤合并糖尿病等严重慢性疾病;⑥长期服用类固醇、钙化物、免疫抑制药物;⑦近期接受抗生素或激素治疗。

1.2 方法

所有受试者接受内固定手术后,于术前、术后4周及12周清晨空腹取血5 mL,抗凝处理后3 000 rpm离心5 min,取上清即为血清,于-80℃冰箱中保存待测。采用ELISA法检测血清CYR61、IGF-1的含量,ELISA试剂盒购自武汉默沙克生物科技有限公司(CYR61货号:69-21555,IGF-1货号:69-81154),操作过程参照ELISA试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0统计进行数据分析,计数资料用 $n(\%)$ 表示,用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较行 t 检验;相关性采用Pearson相关系数进行描述;采用ROC曲线分析血清CYR61、IGF-1水平预测骨折愈合延迟的价值,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基本资料比较

两组患者年龄、性别、AO分型、骨折类型等资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 两组患者血清CYR61、IGF-1水平的比较

ELISA检测显示,术前,两组患者血清CYR61、IGF-1水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与术前相比,患者术后4周和术后12周患者CYR61、IGF-1水平均显著升高($P<0.05$),且术后4周和术后12周时,愈合延迟组CYR61、IGF-1水平显著低于正常愈合组($P<0.05$),见表2。

2.3 血清CYR61、IGF-1水平预测患者术后愈合延迟的价值

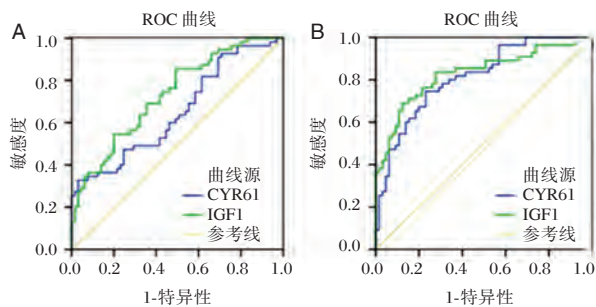
ROC曲线显示,血清CYR61水平预测胫骨平台骨折术后患者愈合延迟在术后12周时价值最

表1 两组患者基本资料的比较 ($\bar{x} \pm s$)

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

资料	正常愈合组 (n=55)	愈合延迟组 (n=65)	χ^2/t 值	P值
年龄(岁)	39.05±8.49	38.24±9.41	0.491	0.624
性别			0.015	0.902
男	29	35		
女	26	30		
AO分型			0.306	0.858
A型	18	20		
B型	25	28		
C型	12	17		
骨折类型			0.126	0.722
开放	8	11		
闭合	47	54		

高;血清 IGF-1 水平预测胫骨平台骨折术后患者愈合延迟的价值较高,且稳定,不同时间点均有较好的灵敏性和特异性,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1和表3。



注:A. 术后4周; B. 术后12周。

图1 血清CYR61、IGF-1水平预测胫骨平台骨折术后患者愈合延迟的ROC曲线分析

Figure 1 ROC curves of serum CYR61 and IGF-1 levels for predicting healing delay after tibial plateau fracture surgery

表2 两组患者血清CYR61、IGF-1水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum CYR61 and IGF-1 levels between the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	时间	正常愈合组(n=55)	愈合延迟组(n=65)	t值	P值
CYR61 (pg/mL)	术前	62.35±15.23	58.21±16.15	1.436	0.154
	术后4周	84.64±18.42 ^a	72.09±17.74 ^a	3.794	<0.001
	术后12周	146.15±24.63 ^a	113.48±22.38 ^a	7.608	<0.001
IGF-1 (ng/mL)	术前	148.23±22.15	152.32±21.46 ^b	1.025	0.307
	术后4周	325.61±35.41 ^a	289.63±29.75 ^a	6.050	<0.001
	术后12周	462.85±51.24 ^a	410.55±48.56 ^a	5.728	<0.001

注:与术前相比,^a $P < 0.05$ 。

表3 ROC曲线效能指标

Table 3 Efficiency indexes of ROC curves

变量	时间	AUC	临界值	灵敏性(%)	特异性(%)	95%CI
CYR61 (pg/mL)	术后4周	0.651	65.13	92.7	29.2	0.552~0.750
	术后12周	0.813	128.44	74.5	76.9	0.738~0.888
IGF-1 (ng/mL)	术后4周	0.732	288.30	85.5	50.8	0.644~0.820
	术后12周	0.830	414.96	83.6	72.3	0.753~0.906

2.4 血清CYR61、IGF-1水平相关性分析

Pearson 相关分析显示,本研究纳入患者术后血清 CYR61 为 (95.37 ± 19.42) pg/mL, IGF - 1 为 (336.89 ± 35.27) ng/mL,上述因子水平呈正相关($r = 0.519, P < 0.001$)。

3 讨论

胫骨平台骨折是骨科常见骨折类型之一,通常需要手术恢复关节面的平整,促使关节软骨再生,才能使得关节稳定^[6]。但胫骨平台骨折病情较复杂,常伴有周围韧带、半月板的损伤,使得患者膝关节功能障碍,严重影响患者日常生活^[7]。愈合延迟是胫骨平台骨折术后常见的并发症之一,主要是局部血运差引起的;研究表明,术后延迟愈合有明显的疼痛感,且影响患者患肢运动功能,降低患者健康水平和生活质量,且延迟愈合的治疗周期更长^[8-9]。因此,有效解决患者术后愈合延迟现象,可改善胫骨平台骨折预后。

CCN 家族是一类高度保守的分泌型基质蛋白,具有广泛的生物学功能,参与胚胎发育、血管生成、修复及肿瘤细胞生长等多种生命活动^[10]。富含半胱氨酸蛋白61是CCN家族成员之一,其结构中含10%的半胱氨酸残基,可促进软骨细胞、血管内皮细胞等的增殖和分化,具有促有丝分裂活性和趋化性,从而参与软骨、血管的生成及伤口修复等过程^[11]。早期CYR61在肿瘤方面的研究较多,研究显示CYR61可能参与多种肿瘤细胞的增殖和侵袭转移^[12],近几年发现CYR61在多种疾病

中参与血管的生成,柴克霞^[13]等研究显示 CYR61 在多发性肌炎、皮炎患者中呈高表达,且其水平与微血管密度呈正相关,参与新生血管的形成。本研究结果提示血清 CYR61 水平可能与胫骨平台骨折术后愈合有关,与李强^[14]等研究一致;可能是低水平 CYR61 会降低血管细胞的生长和修复功能,导致骨折部位血运差,最终引起骨折延迟愈合。ROC 曲线显示提示血清 CYR61 可作为预测胫骨平台骨折术后愈合延迟的潜在血清因子。

胰岛素样生长因子是一类具有促生长作用的多肽,广泛分布于心、肝、肾等组织中,IGF-1 可介导间质细胞生长,促进软骨细胞和成骨细胞的增殖,促进软骨组织的发育和膜内成骨^[15]。马乐园^[16]在颅脑损伤合并右侧胫骨骨折兔模型中发现,IGF-1 是促进骨折愈合的相关因素。本研究提示血清 IGF-1 水平可能与胫骨平台骨折术后愈合有关,与上述研究一致。ROC 曲线提示血清 IGF-1 水平可作为预测胫骨平台骨折术后愈合延迟的潜在血清因子。Pearson 相关分析显示,血清 CYR61、IGF-1 水平呈正相关,与 Sarkissyan^[18]等报道 IGF-1 为 CYR61 上游基因的研究结果一致,表明 CYR61 和 IGF-1 可能存在某种机制,共同作用于骨折愈合过程,但具体作用途径还有待进一步分析。

综上所述,胫骨平台骨折患者血清 CYR61、IGF-1 水平与其术后愈合延迟密切相关,且血清 CYR61、IGF-1 水平对于胫骨平台骨折术后愈合延迟的预测有较高价值,可为临床胫骨平台骨折患者术后康复作出科学指导,减少患者术后愈合延迟的发生,提高患者生活质量。但本研究术后观察时间较短,且检测结果可能受到样本量、样本倚性等多方面的影响,因此后期还需多中心、大样本量的研究,并延长观察时间深入研究。

参考文献

- [1] Chen H, Wu L. Surgical options for posterior tibial plateau fracture [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 8(11): 21421-21427.
- [2] Chen P, Gu WL, Gong MZ, et al. GIT1 gene deletion delays chondrocyte differentiation and healing of tibial plateau fracture through suppressing proliferation and apoptosis of chondrocyte [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 320-326.
- [3] Zhao G, Huang BL, Rigueur D, et al. CYR61/CCN1 Regulates Sclerostin Levels and Bone Maintenance [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(6): 1076-1089.
- [4] Chisalita SI, Chong LT, Wajda M, et al. Association of insulin-like growth factor-1, bone mass and inflammation to low-energy distal radius fractures and fracture healing in elderly women attending emergency care [J]. *Orthop Surg*, 2017, 9(4): 380-385.
- [5] Teng JW, Ji PF, Zhao ZG. MiR-214-3p inhibits β -catenin signaling pathway leading to delayed fracture healing [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 17-24.
- [6] Yang P, Du D, Zhou Z, et al. 3D printing-assisted osteotomy treatment for the malunion of lateral tibial plateau fracture [J]. *Injury*, 2016, 47(12): 2816-2821.
- [7] Doria C, Balsano M, Spiga M, et al. Tibioplasty, a new technique in the management of tibial plateau fracture: A multicentric experience review [J]. *J Orthopaed*, 2017, 14(1): 176-181.
- [8] Liu GY, Xiao BP, Ma WH. Results of a modified posterolateral approach for the isolated posterolateral tibial plateau fracture [J]. *Indian J Orthop*, 2016, 50(2): 117-122.
- [9] 陈克伟, 程少文, 顾运涛, 等. 自体骨髓移植治疗胫骨中下段骨折延迟愈合或不愈合的疗效研究 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2017, 32(6): 645-646.
- [10] Twigg S M. Regulation and bioactivity of the CCN family of genes and proteins in obesity and diabetes [J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(1): 359-368.
- [11] Song Y F, Xu Z B, Zhu X J, et al. Serum Cyr61 as a potential biomarker for diagnosis of colorectal cancer [J]. *Clin Translat Oncol*, 2017, 19(4): 1-6.
- [12] Han S, Bui NT, Ho MT, et al. Dexamethasone Inhibits TGF- β 1-induced cell migration by regulating the ERK and AKT pathways in human colon cancer cells via CYR61 [J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48(3): 1141-1153.
- [13] 柴克霞, 孔令爽, 陈玉琪, 等. 富半胱氨酸蛋白 61 结缔组织生长因子血管内皮生长因子和 CD105 标记的微血管密度在多发性肌炎皮炎患者肌肉组织中的表达及意义 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(11): 754-758.
- [14] 李强, 张志强, 尚雁峰, 等. 血管生成标志物 CYR61 与胫骨骨折延迟愈合的关系研究 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45(8): 1520-1523.
- [15] Rico-Llanos GA, Becerra J, Visser R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in vitro and in vivo, and together have a stronger osteogenic effect than when IGF-1 is combined with BMP-2 [J]. *J Biomed Mat Res A*, 2017, 105(7): 1867-1875.
- [16] 马乐园, 赵岩, 乔万庆, 等. 创伤性脑损伤合并骨折中加速骨折愈合过程中相关因子的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(32): 5115-5121.
- [17] Sarkissyan S, Sarkissyan M, Wu Y, et al. IGF-1 Regulates Cyr61 Induced Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion [J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e103534.

婴儿型炎症性肠病1例并文献分析

杨志 王玲 孙子发 方庆丰 程邦宁 陈必全*

[摘要] 目的 通过白介素10受体(IL-10R)A基因突变引起的炎症性肠病(IBD)病例进一步了解婴儿型IBD的临床特征。方法 报告1例婴儿型IBD临床症状、体征和肠镜结果,并用全外显子组测序(WES)明确病因。结果 患儿,男,32 d,生后4 d开始腹泻,进行性加重,持续发热,口腔及肛周可见多处病变,生长发育停滞,结肠镜示环形浅溃疡累及全部结肠。WES明确患儿系IL-10RA基因缺陷,Sanger测序验证患儿父母IL-10RA基因杂合突变。临床给予肠道内营养支持及小剂量激素等对症治疗后患儿大便逐渐成型,体重增加。结论 IL-10RA基因杂合突变导致婴儿型IBD。

[关键词] 炎症性肠病; 婴儿型; 白介素10受体A基因; 全外显子测序

A case of infantile inflammatory bowel disease and literature analysis

YANG Zhi, WANG Lin, SUN Zifa, FANG Qingfeng, CHENG Bangning, CHEN Biquan*

(Department of Infectious Disease, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei, Anhui, China, 230051)

[ABSTRACT] **Objective** To deepen the understanding of the characteristics of infantile IBD through one case of inflammatory bowel disease (IBD) caused by mutations in the IL-10RA gene. **Methods** An infant was diagnosed as infantile IBD based on his clinical manifestations and colonoscopy character. The whole exome sequencing (WES) was performed to confirm the gene deficiency. **Results** The child, male, 32-day-old, began to have diarrhea 4 days after birth, progressively worsening, persistent fever, multiple lesions in the oral cavity and perianal area, growth and development stagnation, colonoscopy showed that a circular shallow ulcer affected the entire colon. WES confirmed the IL-10RA gene defect in the child, and Sanger sequencing verified the heterozygous mutation in the IL-10RA gene of the parent of the child. After clinically given intestinal nutritional support and low-dose hormones and other symptomatic treatments, the children's stools gradually formed and their weight increased. **Conclusion** The Heterozygous mutations in IL-10RA gene cause infantile IBD.

[KEY WORDS] Inflammatory bowel disease; Infant type; IL-10RA gene; Whole exome sequencing

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组原因不明的慢性非特异性肠道炎症性疾病,可侵犯回肠、结肠、直肠甚至整个消化道,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩病(Crohn's disease, CD)及未定型IBD(IBD-unclassified, IBD-U)。在儿童IBD中不同年龄组患儿疾病表型不同,因此巴黎分型在蒙特利尔分型基础上对将发病年龄<6岁的IBD患儿定义为极早发型IBD(very early onset IBD, VEO-IBD),

其中<2岁的IBD患儿为婴儿型IBD(infantile IBD)^[1]。近年来儿童的IBD发病率呈上升趋势,VEO-IBD的患病率约15%^[2],且全球儿童IBD发病年龄逐年下降^[3]。现报道1例白介素10受体A基因突变导致的婴儿型IBD病例,并对相关文献进行复习。

1 临床资料

患儿,男,32 d,因“腹泻28 d,发热23 d”入

作者单位:安徽省儿童医院感染科,安徽,合肥 230051

*通信作者:陈必全, E-mail: anhuicbq4049@sina.com

院。现病史:患儿生后4 d出现腹泻,解黄色稀水便5~6次/日,5 d后出现持续低热,37.5℃~38.0℃波动,口腔内出现散在疱疹,在当地医院予以口服及静滴抗生素治疗1周(具体用药不详)。效果不佳仍有发热,半月后系高热,体温最高39.3℃,以“脓毒症、鹅口疮”入院。患儿起病来精神一般,吃奶量欠佳伴吐奶,无咳嗽、口吐泡沫,无呻吟,无抽搐发作,尿量正常。个人史:胎次1,产次1,过期产剖宫产,出生时无窒息抢救史,出生时体重4 070 g,人工喂养。家族史:父母非近亲结婚,身体健康。入院时体格检查:T37.5℃,HR160次/min,R35次/min,WT 4kg,神志清楚,精神一般,贫血貌,无其他特殊面容,全身未见明显皮疹,前囟平软,咽充血,口腔上颌处可见三处针头至米粒大小糜烂溃疡,腹稍膨胀,未触及包块,肝脾肋下未及,肠鸣音正常。肛门外侧截石位肛周3点、6点可见2处米粒大小糜烂面,余未见异常。

辅助检查:血常规:WBC $21.88 \times 10^9/L$, N 0.604, L 0.241, RBC $3.5 \times 10^{12}/L$, HB 113g/L, HCT 35.7%, PLT $332 \times 10^9/L$ 。肝功能、肾功能、心肌酶谱:正常,白蛋白:23.2 g/L, CRP 54 mg/L, ESR 11 mm/h, 免疫球蛋白:IgG 13.9 g/L, IgM 2.43 g/L, IgA 0.59 g/L; ANCA、ANA谱12项:均正常;血培养、尿培养、大便培养:均正常;TORCH(+);免疫组合:阴性;凝血五项:正常;血气分析:正常;粪尿常规:正常;大便常规+OB:阴性。脑脊液常规、生化及培养均正常。过敏原IgE检测:牛奶3级重度过敏 小麦0级轻度过敏余正常。

腹部彩超:肝胆胰脾未见占位性病变;盆腔未见积液;未见肿大阑尾炎。心脏彩超:房间隔缺损约0.24cm(继发孔)。血尿串联质谱遗传代谢病筛查:未发现特异性指标改变。腹部CT:腹部胃腔及肠腔内见弥漫性分布不规则高密度影。电子结肠镜:横结肠可见多发散在浅溃疡,溃疡周围粘膜粗糙且呈息肉样改变,降结肠及乙状结肠可见散在环形浅溃疡,直肠粘膜充血且可见片状红斑,肛管局部可见浅溃疡。肠镜病理:4块肠粘膜结构,降结肠组织3块,乙状结肠组织1块;(降结肠、乙状结肠)轻度慢性结肠炎,粘膜固有层散在淋巴、浆细胞,偶见嗜酸细胞(0~2个/HP)浸润。免疫组化:CMV(-);特殊染色:TB(-);原位杂交结果:EBER(-)。全外显子组测序(whole exome sequencing, WES):白介素10受体(IL-10R)A基因编

码区外显子 c.301C>T (p.R101W) 和 c.349C>T (p.R117C) 2个杂合突变。其中 p.R101W 为 HGMD 和 Clinvar 数据库已报道的 IBD 致病突变, Sanger 测序验证患儿父亲携带该位点杂合突变; p.R117C 在 HGMD 数据库已报道的 IBD 致病突变, 验证发现患儿母亲携带该位点杂合突变, 故明确诊断婴儿型 IBD, 予稀释纽康特(1 勺奶粉配 40 mL 水)经胃管持续泵入, 口服双歧杆菌四联活菌片和小剂量泼尼松 1 mg/kg·d 治疗。1 月后门诊复诊患儿腹泻症状明显改善, 体质量增加, 疗效显著。

2 讨论

巴黎分型将发病年龄<6岁的IBD定义儿童VEO-IBD;小于2岁被定义为婴儿型IBD,是儿童VEO-IBD中的一种特殊亚组。VEO-IBD的特征^[4]是起病严重,发病年龄早,难以控制腹泻,影响生长发育,伴有严重的肛周病变和多种隐匿性基因缺陷;而婴儿型IBD^[5]具有遗传易感性强,临床症状严重,耐药率高,免疫抑制治疗无效等特点,常见的淋巴细胞浸润为特征的全结肠炎,伴有严重的肛周溃疡病和高死亡率。本病例生后4d起病,表现为进行性加重的腹泻,伴持续发热,查体口腔及肛周可见多处病变,伴有生长发育停滞甚至倒退、过度炎症反应和低蛋白血症等表现,结肠镜可见环形浅溃疡累及全部结肠,符合婴儿型IBD临床表型,但临床上口腔病变易被机械性认为鹅口疮;腹泻、营养不良易被误诊为牛奶蛋白过敏性疾病;发热、炎症指标易误诊为感染性疾病。因此,总结该患儿临床特征发现:细致的体格检查可明确黏膜病变性质,提示疾病特征;贫血、腹泻、便血、血小板增高提示炎症性肠病;口腔溃疡、肛周病变结合腹部影像提示全消化道病变,暗示克罗恩病;氨基酸奶粉有效,揭示牛奶蛋白过敏性肠病与炎症性肠病共存。所以我们在临床中诊断VEO-IBD需要结合肠道和肠外疾病的表型、适当的实验室检查与组织病理学由于组织病理学中组织学形式单一,IBD缺乏高度特异性和敏感性的肠组织学标记,并且无法根据IBD的标准组织学和免疫学特征进行分类,因此排除过敏性、代谢性、结缔组织病及感染性疾病,并与WAS来明确诊断与分类。本例WAS发现白介素10受体(IL-10R)A基因编码区外显子 c.301C>T (p.R101W) 杂合突变,这与Lv等^[6]报道IL-10RA基因位点突变相同,可

见基因检测是诊断该疾病的重要依据。

儿童IBD的发病机制尚不完全清楚,可能与感染、理化环境等多种因素有关。然而,VEO-IBD与遗传因素的关系更为密切,遗传易感性更强,且单基因遗传相对常见^[7]。自Glocker等^[8]首次报道IL-10R基因突变导致VEO-IBD以来,单基因缺陷导致的VEO-IBD备受关注。目前在VEO-IBD单基因突变研究中,最为常见的发现是IL-10及IL-10R(IL-10RA、IL-10RB)功能缺失性基因突变^[9]。IL-10基因位点位于染色体1q21-32,由4个内含子和5个外显子组成。受调控的IL-10是体内重要的抗炎因子,它受各种免疫细胞的调节,信号通路主要通过JAK-STAT途径实现抗炎生物表达,抑制各种促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1, IL-6和IL-12的释放,在维持免疫系统的稳定平衡中起重要作用。IL-10RA基因位于染色体11q23.3,IL-10RB位于21号染色体。IL-10R基因突变可导致IL-10R结构改变,导致下游JAK1、TYK2不能磷酸化IL-10R,下游STAT3分子无法形成P-STAT3二聚体,导致P-STAT3入核调控抗炎因子基因表达过程受阻,使IL-10介导的LPS诱导巨噬细胞、外周单核细胞中的TNF- α 异常增高,引起肠道炎症高表达^[10]。Kotlarz等^[11]对于VEO-IBD基因测定,16名患儿证明有IL-10或IL-10R缺陷,其中3名患儿存在IL-10突变,5名患儿存在IL-10RA突变,8名患儿存在IL-10RB突变,发病最小的年龄是3个月龄。

资料证实^[12]IBD具有遗传学背景,研究最多的是IL-10、IL-10R基因在内的单基因缺陷导致的VEO-IBD。通过大规模全基因组研究目前发现^[13]与IBD有关的遗传易感位点为163个,其中IL-10及IL-10R(IL-10RA、IL-10RB)高度相关的可能的单基因突变可能只占VEO-IBD群体的一小部分。因突变的基因预后和治疗策略各不相同,多数因不能明确病因得不到妥善治疗而导致较高病死率。由于IBD基因突变,传统的药物激素和免疫抑制剂治疗VEO-IBD,激素下调促炎因子以诱导缓解,免疫抑制剂参与抑制机体免疫反应,达到维持缓解治疗的目的^[14],但长期使用激素后患儿有很大的不良反应。对于激素无效,激素依赖性患者,可以联合使用免疫抑制剂或生物制剂,IBD症状只能暂时缓解,不能长期控制疾病活动^[15]。VEO-IBD的最佳治疗方法是同种异体干细胞移植

联合肠内营养支持治疗^[16]。

综上所述,临床上对于婴幼儿复发性腹泻伴肛周病变和低龄生长发育障碍的患儿,需结合仔细的体格检查和恰当的实验室检查,积极进行结肠镜组织病理学和基因检测,提高分子生物学诊断,探索已知或未知的基因缺陷,准确诊断精准治疗。

参考文献

- [1] Hyams JS. Standardized recording of parameters related to the natural history of inflammatory bowel disease: from Montreal to Paris[J]. *Dig Dis*, 2014,32(4):337-344.
- [2] Lopez RN, Evans HM, Appleton L, et al. Prospective Incidence of Paediatric Inflammatory Bowel Disease in New Zealand in 2015: Results From the Paediatric Inflammatory Bowel Disease in New Zealand (PINZ) Study [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2018,66(5):e122-e126.
- [3] Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M, et al. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2018,24(25):2741-2763.
- [4] Muise AM, Snapper SB, Kugathasan S. The age of gene discovery in very early onset inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2012,143(2):285-288.
- [5] Fang YH, Luo YY, Yu JD, et al. Phenotypic and genotypic characterization of inflammatory bowel disease in children under six years of age in China[J]. *World J Gastroenterol*, 2018,24(9):1035-1045.
- [6] Lv H, Qiao B, Fang L, et al. Neonatal Crohn's disease with Oral ulcer as the first symptom caused by a compound heterozygote mutation in IL-10RA: a case report [J]. *Hereditas*, 2019,156:38
- [7] Zeng Z, Mukherjee A, Zhang H. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease [J]. *Front Genet*, 2019,10:1017.
- [8] Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor[J]. *N Engl J Med*, 2009,361(21):2033-2045.
- [9] Zheng C, Huang Y, Hu W, et al. Phenotypic Characterization of Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease with Interleukin-10 Signaling Deficiency: Based on a Large Cohort Study[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019,25(4):756-766.
- [10] Zhu L, Shi T, Zhong C, et al. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterol Res*, 2017,10(2):65-69.
- [11] Kotlarz D, Beier R, Mumgan D, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy [J]. *Gastroenterology*, 2012,143(4):347-355.
- [12] Wawrzyniak M, Scharl M. Genetics and epigenetics of inflammatory bowel disease[J]. *Swiss Med Wkly*, 2018,148:w14671.

呼出气一氧化氮与支气管哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞相关性及其联合检测价值

江银玲¹ 杨万春^{1*} 沈欣²

【摘要】目的 探究呼出气一氧化氮(FeNO)与支气管哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞(EOS)相关性及其联合检测价值。方法 选取本院2018年4月至2019年9月118例支气管哮喘患者作为观察组,同期正常体检者55例作为对照组。检测比较两组FeNO、外周血EOS水平,采用ROC曲线评价FeNO、外周血EOS单独及联合诊断价值,并比较不同FeNO组患者治疗前后外周血EOS、第1秒用力呼气末容积(FEV₁)占预计值百分比(FEV₁%)、血清总IgE水平,分析FeNO与EOS、FEV₁%、血清总IgE相关性。结果 观察组FEV₁%低于对照组,血清总IgE高于对照组($P<0.05$);观察组FeNO、外周血EOS高于对照组($P<0.05$);多元线性逐步回归分析,将FEV₁%、血清总IgE其他因素控制后,FeNO、外周血EOS与支气管哮喘发病显著相关($P<0.05$);ROC曲线显示,FeNO与外周血EOS联合诊断线下面积(AUC)为0.881,95%CI为0.823~0.925,诊断敏感度为78.81%,特异度为89.09%,优于两者单独诊断;FeNO高水平患者治疗前、治疗12周后FeNO、外周血EOS、血清总IgE高于中水平患者、低水平患者,FEV₁%低于中水平患者、低水平患者($P<0.05$);Pearson相关性分析,治疗前、治疗12周后FeNO与外周血EOS、血清总IgE呈正相关,与FEV₁%呈负相关($r=0.625、0.765、-0.597、0.686、0.671、-0.699, P<0.05$)。结论 FeNO与支气管哮喘患者外周血EOS具有正相关关系,联合检测具有重要辅助诊断价值,还有助于评估病情改善情况,为临床提供数据支持。

【关键词】 支气管哮喘;呼出气一氧化氮;嗜酸性粒细胞;相关性;检测价值

Correlation between exhaled nitric oxide and peripheral blood eosinophils in patients with asthma and the value of combined detection

JIANG Yinling¹, YANG Wanchun^{1*}, SHEN Xin²

(1. Department of Respiratory, The Hefei Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230000; 2. Functional Examination Department, The Hefei Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, China, 230000)

【ABSTRACT】 Objective To explore the correlation between exhaled nitric oxide (FeNO) and peripheral blood eosinophils (EOS) in patients with asthma and the value of joint detection. Methods From April 2018 to September 2019, 118 patients with asthma in our hospital were selected as the observation group, and 55 patients with normal physical examination during the same period were selected as the control group. The levels of FeNO and peripheral blood EOS were measured and compared between the two groups. The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of FeNO and peripheral blood EOS alone and in combination. The peripheral blood EOS, forced end-expiratory volume in first second (FEV₁) accounted for the predicted value (FEV₁%), and the total serum IgE levels before and after treatment in different FeNO groups

基金项目:光华基金科研项目[(2018)125-16号]

作者单位:1. 安徽医科大学附属合肥医院呼吸内科,安徽,合肥 230000

2. 安徽医科大学附属合肥医院功能检查科,安徽,合肥 230000

*通信作者:杨万春, E-mail: ywc.hf@163.com

were compared. The correlation between FeNO and EOS, FEV1%, total serum IgE was analyzed. Results FEV1% of the observation group was lower than that of the control group, and total serum IgE was higher than that of the control group ($P<0.05$). FeNO and EOS in the observation group were higher than those in the control group ($P<0.05$). After controlling FEV1%, serum total IgE and other factors, Multiple linear stepwise regression analysis showed that FeNO and peripheral blood EOS were significantly correlated with the onset of bronchial asthma ($P<0.05$). The ROC curve showed that the area under the diagnostic line (AUC) of FeNO and EOS in peripheral blood was 0.881, 95%CI was 0.823~0.925, the diagnostic sensitivity was 78.81%, and the specificity was 89.09%, which is better than the two alone. Patients with high levels of FeNO before treatment and after 12 weeks of treatment, FeNO, peripheral blood EOS, and total serum IgE were higher than those with intermediate and low levels, and FEV1% was lower than those with intermediate and low levels ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that FeNO was positively correlated with peripheral blood EOS and serum total IgE before treatment and 12 weeks after treatment, and negatively correlated with FEV1% ($r=0.625, 0.765, -0.597, 0.686, 0.671, -0.699, P<0.05$). Conclusion FeNO has a positive correlation with the peripheral blood EOS in patients with asthma. Combined detection has important auxiliary diagnostic value. It also helps to assess the improvement of the condition and provide clinical data support.

[KEY WORDS] Asthma; Exhaled nitric oxide; Eosinophils; Correlation; Detection value

支气管哮喘是临床常见呼吸系统疾病,目前全世界范围内有3亿左右哮喘患者,其中我国约3 000万,需给予高度重视^[1]。研究表明,多种呼吸疾病与炎症相关,其中支气管哮喘本质为慢性气道炎症疾病,检测无创气道炎症标志物对支气管哮喘诊断、治疗、评估预后、预测复发等均具有重要指导意义^[2-3]。呼出气一氧化氮(Fractional exhaled nitric oxide, FeNO)是近年来气道炎症的关注点,具有检测简便、快速、无创、重复性好等特点,与支气管哮喘气道高反应性及炎症反应密切相关^[4]。嗜酸性粒细胞(Eosinophils, EOS)是一种炎性细胞,参与多种类型哮喘发病过程,可有效反映气道炎症情况,在评估支气管哮喘病情严重程度方面具有良好价值^[5]。既往虽有研究探讨两者的关系,但鲜有分析两者联合检测在支气管哮喘中的价值。为此,本研究尝试分析FeNO与外周血EOS相关性及其联合检测价值,旨在为临床诊治支气管哮喘提供数据支持。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院2018年4月至2019年9月118例支气管哮喘患者作为观察组,同期正常体检者55例作为对照组。两组年龄、性别、体质指数(BMI)、吸烟史等一般资料相比,差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。

纳入标准:①观察组均符合《支气管哮喘防治指南(2016年版)》中支气管哮喘相关诊断标准^[6];②对照组体检各项指标均显示正常;③两组临床资料完整,且均知情本研究方案,自愿签订知情同意书。排除标准:①参与本研究前4周内伴有呼吸道感染、肺部感染者;②存在严重心肾等其他脏器功能异常者;③合并严重全身性疾病者;④无法进行FeNO与肺功能检测者;⑤处于妊娠期、哺乳期的患者;⑥近期出现过过敏性皮炎病史或其他过敏疾病病史者;⑦参与本研究前1个月内接受吸入糖皮质激素治疗者。研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 FeNO检测方法

对照组、观察组治疗前、治疗12周后均根据欧洲呼吸学会(ERS)制定方法采用瑞典Aerocrine公司FeNO测定仪进行检测,检测前向所有受检者介绍检测方法与步骤,所有受检者于静息状态下进行FeNO检测。

1.2.2 外周血EOS、血清总IgE检测方法

对照组、观察组治疗前、治疗12周后于清晨空腹状态下取5 mL静脉血,其中2 mL采用全自动血细胞计数分析仪检测外周血EOS;剩余3 mL离心处理,离心速率为3 000 r/min,时间为15 min,取上清液,采用电化学发光法检测血清总IgE水平,试剂盒购自美国雅培公司,所有操作步骤严格遵循试剂盒说明书。

1.2.3 肺功能检测方法

采用德国 JaegerMasterScreen 系列肺功能仪检测第1秒用力呼气末容积(FEV₁)占预计值百分比(FEV₁%),每人重复检测3次,取最佳值作为最终结果,并准确记录。

1.2.4 治疗方法

观察组均给予祛痰、吸氧、平喘等对症治疗。持续治疗12周。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间用 *t* 检验,多组间采用方差分析。计数资料以 *n*(%)表示, χ^2 检验,以 ROC 曲线评价诊断价值,Pearson 进行相关性分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、性别、BMI、吸烟史相比,差异无统计学意义(*P*>0.05);观察组 FEV₁% 低于对照组,血清总 IgE 高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表1。

表1 两组一般资料比较 [*n*(%),($\bar{x} \pm s$)]
Table 1 Comparison of general data between 2 groups [*n*(%),($\bar{x} \pm s$)]

资料	观察组 (<i>n</i> =118)	对照组 (<i>n</i> =55)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	38.26±8.02	39.17±8.63	0.678	0.499
性别				
男	46(38.98)	21(38.18)	0.010	0.920
女	72(61.02)	34(61.82)		
BMI(kg/m ²)	22.09±1.72	22.31±1.19	0.857	0.393
吸烟史				
有	36(30.51)	16(29.09)	0.036	0.850
无	82(69.49)	39(70.91)		
FEV ₁ %	72.16±3.86	84.14±6.09	15.677	<0.001
血清总 IgE (U/mL)	332.50±94.62	41.17±10.05	22.739	<0.001

2.2 两组 FeNO、外周血 EOS 水平比较

观察组 FeNO、外周血 EOS 高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表2。

表2 两组 FeNO、外周血 EOS 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of FeNO and EOS in peripheral blood between 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	FeNO(ppb)	外周血 EOS(%)
观察组	118	48.93±10.14	5.02±1.03
对照组	55	12.64±3.18	1.97±0.64
<i>t</i> 值		25.919	20.200
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.3 多元线性逐步回归分析

将 FEV₁%、血清总 IgE 等其他因素控制后,多元线性逐步回归分析,FeNO(偏回归系数为 0.602)、外周血 EOS(偏回归系数为 0.724)与支气管哮喘发病显著相关(*P*<0.05),见表3。

表3 多元线性逐步回归分析

Table 3 Multiple linear stepwise regression analysis

因变量	自变量	β 值	SE值	β^2	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
支气管哮喘发病	常量	9.043	1.105	-	8.774	<0.001
	FeNO	0.602	0.027	0.681	7.105	<0.001
	外周血 EOS	0.724	0.033	0.803	9.021	<0.001

2.4 FeNO、外周血 EOS 诊断价值

根据 FeNO、外周血 EOS 水平绘制 ROC 曲线,两者联合诊断 AUC 为 0.881,95%CI 为 0.823~0.925,Z 统计=14.754,诊断敏感度为 78.81%,特异度为 89.09%,优于两者单独预测,见图1,表4。

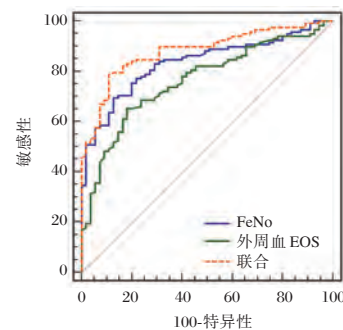


图1 FeNO、外周血 EOS 诊断价值

Figure 1 Diagnostic value of FeNO and EOS in peripheral blood

表4 FeNO、外周血 EOS 诊断价值

Table 4 Diagnostic value of FeNO and EOS in peripheral blood

指标	AUC	95%CI	Z统计	<i>P</i> 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)
FeNO	0.834	0.770~0.886	10.984	<0.001	>31.02 ppb	69.49	87.27
外周血 EOS	0.763	0.693~0.825	7.115	<0.001	>3.64%	65.25	81.82
两者联合	0.881	0.823~0.925	14.754	<0.001	-	78.81	89.09

2.5 不同 FeNO 水平患者治疗前后 FeNO、外周血 EOS、FEV₁%、血清总 IgE 水平
高水平患者治疗前、治疗 12 周后 FeNO、外周血

EOS、血清总 IgE 高于中水平患者、低水平患者, FEV₁% 低于中水平患者、低水平患者 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 不同 FeNO 水平患者治疗前后 FeNO、外周血 EOS、FEV₁%、血清总 IgE 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of FeNO, EOS, FEV₁% and total IgE in peripheral blood of patients with different FeNO levels before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	n	FeNO(ppb)	外周血 EOS(%)	FEV ₁ %	血清总 IgE
治疗前	低水平患者	31	21.83±4.24	2.78±0.81	78.03±4.39	124.79±35.12
	中水平患者	40	43.06±7.09	4.93±1.02	74.11±4.10	286.57±73.26
	高水平患者	47	71.80±13.28	6.57±1.44	66.63±3.75	508.59±137.40
	F 值		264.019	99.299	81.255	148.513
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
治疗 12 周后	低水平患者	31	18.34±3.26 ^a	2.02±0.53 ^a	83.26±4.51 ^a	66.10±20.57 ^a
	中水平患者	40	25.58±6.52 ^a	2.67±0.61 ^a	79.10±4.22 ^a	117.32±31.19 ^a
	高水平患者	47	57.19±11.34 ^a	4.05±0.94 ^a	75.03±3.39 ^a	280.64±52.28 ^a
	F 值		255.776	77.467	40.211	332.836
	P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与同组治疗前相比, ^a $P < 0.05$; FeNO > 50 ppb 为高水平; FeNO 25 ~ 50 ppb 为中水平; FeNO < 25 ppb 为低水平。

3 讨论

支气管哮喘具有无法根治的特点, 但早期诊断、规范治疗可达到控制哮喘的目的^[8]。目前, 支气管哮喘诊治主要依靠肺功能与临床症状, 其中肺功能检测受患者瞬时状态、配合能力等因素干扰, 临床症状则主观因素较大, 均无法客观、准确地反映支气管哮喘病情严重程度^[9]。因此, 寻找一种简便、客观的方法诊断、监测疗效成为支气管哮喘研究热点。

FeNO 是人体内生物活性物质, 主要来自于呼吸道上皮细胞, 与气道炎症反应密切相关。阿选德等^[10]研究表明, FeNO 在支气管哮喘患者中升高明显早于肺功能异常与临床症状发生时间, 能及早反映气道炎症及哮喘病变情况。本研究发现, FeNO 升高与支气管哮喘联系紧密。原因在于, 气道炎症发生过程中, 炎性因子可直接刺激 NO 合酶转录上调, 增加 FeNO 水平, 还诱导 NO 合酶表达增加, 促使 NO 合成加快, 导致 FeNO 表达升高^[11]。故 FeNO 在支气管哮喘气道炎症发生早期便可出现明显改变。同时, 本研究证实, FeNO 可作为重要辅助诊断价值。但最佳截断值与王霞等^[12]研究结果不一致, 可能与纳入对象病情、检测方法、患者个体差异性等因素有关。

临床实践表明, EOS 不仅参与支气管哮喘炎症发生进展过程, 亦是主要炎症效应细胞, 可直接反映支气管哮喘炎症及病情程度^[13]。本研究结果显示, 支气管哮喘患者外周血 EOS 异常升高与其

发病显著相关。原因在于, EOS 趋化因子通过高选择性结合 CCR3 受体, 促使微血管内皮上 EOS 黏附增多, 经由微血管壁进入肺部, 从而产生颗粒蛋白, 引发气道炎症反应, 并增加支气管黏膜及血液中 EOS 含量^[14]。既往相关文献指出, 支气管哮喘 FeNO 与 EOS 浸润关系密切, 可反映 EOS 炎症程度^[15]。在此基础上, 本研究发现, FeNO 与 EOS 具有显著正相关关系。提示联合检测两者水平可能是支气管诊治的新途径。ROC 曲线分析, FeNO 与外周血 EOS 联合检测可为临床诊断支气管哮喘提供可靠依据。联合检测 FeNO 与外周血 EOS 可作为评估疗效的重要指标。

此外, 大量研究表明, 血清总 IgE、FEV₁% 与支气管哮喘疾病进展、气道炎症反应关系密切^[16]。本研究发现, 说明 FeNO 还与肺功能、气道免疫反应有关, 能从不同方面反映支气管哮喘变化情况。但本研究未详细探讨 FeNO 对支气管哮喘患者远期预后的影响, 需作进一步分析与探究。

综上所述, FeNO 与支气管哮喘患者外周血 EOS 具有正相关关系, 联合检测具有重要辅助诊断价值, 还有助于评估病情改善情况, 为临床提供参考依据。

参考文献

- [1] Despotovic M, Stoimenov TJ, Stankovic I, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in Serbian patients with bronchial asthma: a case-control study [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11): 3986-3992. (下转第 1132 页)

急性脑梗死合并医院获得性肺炎患者的病原菌分布变迁情况及耐药性分析

田敬华* 杨品娜 刘清泉

【摘要】 目的 探究急性脑梗死(ACI)合并医院获得性肺炎(HAP)患者的病原菌分布变迁情况及耐药性,为给予合理抗菌药物提供参考依据。方法 以本院2018年1月至2019年12月收治的206例ACI合并HAP患者作为研究对象,均进行细菌培养及药敏试验,统计病原菌分布情况、2018~2019年病原菌变迁情况及耐药性。结果 206例ACI合并HAP患者共分离出272株病原菌,其中革兰阴性菌202(74.26%),其次是革兰阳性菌、真菌;2019年病原菌中革兰阴性菌比例有所下降,但仍占主要地位,占72.90%;鲍曼不动杆菌对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦耐药率较低,分别为15.00%、18.33%;肺炎克雷伯菌对头孢呋辛、头孢唑林、环丙沙星、哌拉西林耐药率较高;大肠埃希菌对头孢呋辛、头孢唑林耐药率较高;金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、表皮葡萄球菌对青霉素、氨苄西林耐药率较高,均达到90%及以上,对万古霉素无耐药性。结论 ACI合并HAP病原体以革兰阴性菌为主,病原菌分布表现变迁迹象,且致病菌对常用抗生素均存在不同程度耐药性,对头孢类药物耐药性最高,未见耐万古霉素革兰氏阳性菌。

【关键词】 急性脑梗死; 医院获得性肺炎; 病原菌分布; 耐药性; 抗菌药物; 药敏试验

Analysis of pathogenic bacteria distribution and drug resistance in hospital-acquired pneumonia patients with acute cerebral infarction

TIAN Jinghua*, YANG Pinna, LIU Qingquan

(Department of Capital Medical, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing, China, 100010)

【ABSTRACT】 Objective To explore the distribution and drug resistance of pathogenic bacteria in patients with acute cerebral infarction (ACI) combined with hospital-acquired pneumonia (HAP), and to provide reference basis for the administration of reasonable antibacterial drugs. Methods A total of 206 patients with ACI combined with HAP who were admitted to our hospital from January 2018 to December 2019 were taken as research subjects. All of them were tested for bacterial culture and drug sensitivity. The distribution of pathogenic bacteria, the changes of pathogenic bacteria and drug resistance in 2018-2019 were counted. Results A total of 272 pathogenic bacteria were isolated from 206 ACI patients with HAP, of which 202 were Gram-negative bacteria, accounting for 74.26%, followed by Gram-positive bacteria and fungi; the proportion of Gram-negative bacteria in pathogens had declined in 2019, but it still occupied the main position, accounting for 72.90%; the resistance rates of *Acinetobacter baumannii* to piperacillin and piperacillin/tazobactam were low, which were 15.00% and 18.33%, respectively; *Klebsiella pneumoniae* had a high resistance rate to cefuroxime, cefazolin, ciprofloxacin, and piperacillin; the resistance rate of *Escherichia coli* to cefuroxime and cefazolin was relatively high; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus epidermidis* had higher resistance rates to penicillin and ampicillin, all of which reached 90% and above, and had no resistance to vancomycin. Conclusion ACI combined with HAP pathogens are mainly

基金项目:国家科技支撑计划,科技重大专项2017年度立项课题(2017ZX10305501);北京市财政项目(PXM2020_026273_000001)

作者单位:首都医科大学附属北京中医医院检验科,北京100010

*通信作者:田敬华, E-mail:jinghua1022@sina.com

Gram-negative bacteria, the distribution of pathogenic bacteria shows signs of change, and the pathogenic bacteria have different degrees of resistance to commonly used antibiotics, and have the highest resistance to cephalosporins, no vancomycin-resistant Gram-positive bacteria have been found.

[KEY WORDS] Acute cerebral infarction; Hospital-acquired pneumonia; Distribution of pathogenic bacteria; Drug resistance; Antibacterial drugs; Drug sensitivity test

医院获得性肺炎(Hospital acquired pneumonia, HAP)是患者入院48 h后由真菌、细菌等病原体感染引起的各种类型肺实质炎症^[1]。HAP在院内感染中患病率约10%~20%,病死率占据获得性感染首位^[2]。急性脑梗死(Acute cerebral infarct, ACI)因发病急、病情危重,多需长期住院治疗、康复,加之此类患者生理机能降低,极易继发医院感染,成为HAP高发群体^[3]。ACI合并HAP不仅会加重病情,甚至危及患者生命,而其难以控制的一个主要原因是抗生素耐药。随 β -内酰胺类抗菌药物广泛应用致耐药菌株迅速出现,尤其是初期抗感染的经验性治疗非常重要,若抗菌药物应用不当可引起耐药菌株出现,导致抗感染治疗失败^[4-5]。感染菌谱、药敏性会随时间及抗菌药物的应用而出现变化,临床明确ACI合并HAP病原学特点,是早期有效实施经验性治疗,积极控制感染的前提。本研究分析ACI合并HAP患者的病原菌分布及耐药性,旨在为临床合理应用抗菌药物提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

以本院2018年1月至2019年12月收治的206例ACI合并HAP患者作为研究对象,其中男127例,女79例,平均年龄(64.35±9.67)岁,合并高血压者67例,合并冠心病者21例,合并糖尿病患者33例。明确ACI诊断标准^[6];入院48 h后出现咳痰、咳嗽等症状,肺部听诊有湿罗音,且至少伴以下情况之一者,a、体温 $\geq 38^\circ\text{C}$;b、白细胞计数 $\geq 10 \times 10^9/\text{L}$;c、肺部X线、CT扫描示炎性浸润性病变。排除标准:入组前已伴感染性疾病者;存在免疫功能缺陷者;伴肺不张、肺水肿、心力衰竭者。

1.2 方法

①标本获取:生理盐水漱口,采集晨痰送检,若痰不易咳出或痰量较少采取咽拭子取痰;昏迷患者、气管切开或插管患者采取灭菌管吸取下呼吸道分泌物或纤支镜刷检痰标本。②细菌培养及药敏试验:采取VITEK 2 Compact全自动微生物生

化鉴定仪完成病原体鉴定,每例连续2次培养出同一病原体即确诊为感染病原体或同一培养皿得出2种以上病原体,且属优势生长。药敏试验采取纸片扩散法(K-B),试验药物包含头孢呋辛、头孢唑林、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、替卡西林/克拉维酸、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、阿米卡星、头孢替坦、妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、青霉素、氨苄西林、头孢曲松、苯唑西林、头孢哌酮/舒巴坦、万古霉素等。药敏分析按中华人民共和国国家卫生健康委员会官网公布中国卫生行业标准-抗菌药物敏感性试验的技术要求标准执行。

1.3 观察指标

①统计病原菌分布情况。②2018~2019年病原菌变迁情况。③分析革兰阴性菌耐药性。④分析主要革兰阳性菌耐药性。

2 结果

2.1 病原菌分布情况

206例急性脑梗死合并医院获得性肺炎患者,共分离出272株病原菌,包含革兰阴性菌202株,占74.26%;革兰阳性菌63株,占23.16%;真菌7株,占2.57%,见表1。

表1 病原菌分布情况
Table 1 Distribution of pathogens

病原菌	株数	占比(%)
革兰阴性菌		
肺炎克雷伯菌	81	29.78
鲍曼不动杆菌	60	22.06
大肠埃希菌	34	12.50
铜绿假单胞菌	27	9.93
革兰阳性菌		
金黄色葡萄球菌	25	9.19
溶血性葡萄球菌	20	7.35
表皮葡萄球菌	11	4.04
肺炎链球菌	4	1.47
粪肠球菌	3	1.10
真菌		
热带念珠菌	3	1.10
白色念珠菌	4	1.47
总计	272	100.00

2.2 2018~2019年病原菌变迁情况

2018年病原菌以革兰阴性菌为主,占75.15%;革兰阳性菌次之,占22.42%,真菌占2.42%,前五位病原菌分别为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌;2019年病原菌中革兰阴性菌比例有所下降,但仍占主要地位,占72.90%;革兰阳性菌、真菌比例有所升高,分别占24.30%、3.85%,前五位病原菌分别为鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌,其中鲍曼不动杆菌替代肺炎克雷伯菌成为最主要的细菌,具体见表2、图1~2。

表2 2018~2019年病原菌变迁情况

Table 2 Changes of pathogenic bacteria from 2018 to 2019

病原菌	2018年(165株)		2019年(107株)	
	株数	占比(%)	株数	占比(%)
革兰阴性菌				
肺炎克雷伯菌	56	33.94	25	23.36
鲍曼不动杆菌	29	17.58	31	28.97
大肠埃希菌	21	12.73	13	12.15
铜绿假单胞菌	18	10.91	9	8.41
革兰阳性菌				
金黄色葡萄球菌	15	9.09	10	9.35
溶血性葡萄球菌	12	7.27	8	7.48
表皮葡萄球菌	6	3.64	5	4.67
肺炎链球菌	2	1.21	2	1.87
粪肠球菌	2	1.21	1	0.93
真菌				
热带念珠菌	1	0.61	2	1.87
白色念珠菌	3	1.82	1	0.93
总计	165	100.00	107	100.00

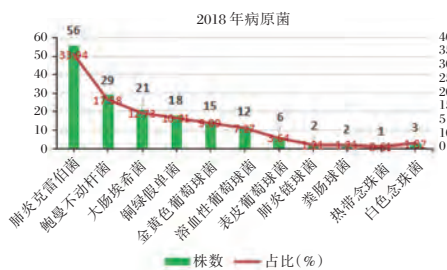


图1 2018年病原菌株数

Figure 1 Number of pathogenic strains in 2018

2.3 革兰阴性菌耐药性

肺炎克雷伯菌对头孢呋辛、头孢唑林、环丙沙星、哌拉西林耐药率较高,鲍曼不动杆菌对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦耐药率较低;大肠埃希菌对头孢呋辛、头孢唑林耐药率较高;铜绿假单

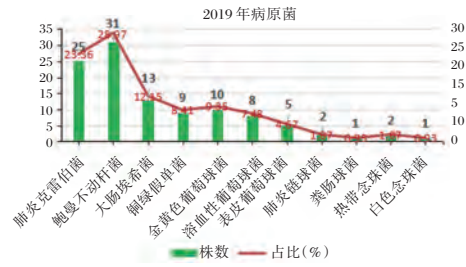


图2 2019年病原菌株数

Figure 2 Number of pathogenic strains in 2019

胞菌对头孢呋辛、头孢唑林、头孢替坦耐药率较高。见表3。

2.4 主要革兰阳性菌耐药性分析

金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、表皮葡萄球菌对青霉素、氨苄西林耐药率较高,均达到90%及以上,对万古霉素无耐药性,均为0.00%,具体见表4。

3 讨论

HAP是ACI常见并发症之一,患病率约8%~20%^[7]。ACI合并HAP主要机制为口咽部定植菌移位至下呼吸道所致,但口咽部定植菌种类繁多,且近年抗菌药物不规范应用致病原菌耐药性升高,提高了抗感染难度^[8]。

ACI合并HAP具有流行病、地方病双重特征,病原谱分布依地区不同而存在一定差异,且与先期抗感染治疗、基础疾病、病原菌来源等多种因素有关,随时间变迁,病原菌谱亦发生不同变化^[9]。本研究结果显示,在本院,ACI合并HAP致病菌主要为革兰氏阴性菌,占比74.26%。革兰阳性菌占比23.16%,真菌占比2.57%。与Baker D等^[10]报道存在一定差异,这与ACI合并HAP地方性特征相吻合^[11]。此外,本研究还对2018-2019年病原菌变迁情况进行研究,发现2019年病原菌分布依次是革兰阴性菌、革兰阳性菌、真菌,占比分别为72.90%、24.30%、3.85%,与2018年病原菌分布75.15%、22.42%、2.42%对比,革兰阴性菌略有降低,革兰阳性菌、真菌略有升高。分析原因可能是:①临床较重视革兰阴性菌感染防控,长期应用抗菌药物致菌群紊乱,人体微生态平衡被破坏,同时造成细菌普遍性而快速出现耐药性,革兰阳性菌、真菌成为相对优势菌^[12]。②ACI患者自身生理机能降低,尤其是存在意识障碍者引起吞咽障碍致咽分泌物、部分食物误吸诱发吸入性感染肺炎,且中枢神经系统

表3 革兰阴性菌耐药性分析

Table 3 Analysis of drug resistance of gram-negative bacteria

抗菌药物	肺炎克雷伯菌(n=81)		鲍曼不动杆菌(n=60)		大肠埃希菌(n=34)		铜绿假单胞菌(n=27)	
	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)
头孢呋辛	42	51.85	38	63.33	26	76.47	17	62.96
头孢唑林	40	49.38	40	66.67	27	79.41	16	59.26
环丙沙星	34	41.98	37	61.67	7	20.59	0	0.00
哌拉西林	31	38.27	9	15.00	12	35.29	3	11.11
左氧氟沙星	25	30.86	29	48.33	7	20.59	0	0.00
庆大霉素	17	20.99	31	51.67	10	29.41	0	0.00
替卡西林/克拉维酸	15	18.52	37	61.67	11	32.35	5	18.52
头孢他啶	9	11.11	38	63.33	10	29.41	5	18.52
头孢吡肟	6	7.41	38	63.33	10	29.41	6	22.22
亚胺培南	3	3.70	38	63.33	2	5.88	5	18.52
头孢替坦	3	3.70	39	65.00	14	41.18	17	62.96
阿米卡星	2	2.47	26	43.33	12	35.29	0	0.00
妥布霉素	2	2.47	23	38.33	10	29.41	0	0.00
哌拉西林/他唑巴坦	2	2.47	11	18.33	16	47.06	2	7.41

表4 主要革兰阳性菌耐药性分析

Table 4 Analysis of drug resistance of main gram-positive bacteria

抗菌药物	金黄色葡萄球菌(n=25)		溶血性葡萄球菌(n=20)		表皮葡萄球菌(n=11)	
	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)
青霉素	24	96.00	19	95.00	10	90.91
氨苄西林	23	92.00	18	90.00	10	90.91
头孢曲松	10	40.00	10	50.00	5	45.45
左氧氟沙星	10	40.00	9	45.00	4	36.36
环丙沙星	10	40.00	6	30.00	3	27.27
哌拉西林	9	36.00	7	35.00	4	36.36
头孢他啶	9	36.00	7	35.00	4	36.36
苯唑西林	8	32.00	6	30.00	3	27.27
哌拉西林/他唑巴坦	7	28.00	5	25.00	2	18.18
头孢哌酮/舒巴坦	6	24.00	5	25.00	3	27.27
亚胺培南	5	20.00	4	20.00	2	18.18
万古霉素	0	0.00	0	0.00	0	0.00

损害多需长期卧床发生 HAP 风险会显著升高。上呼吸道属致病菌第一道防线,若患者存在延髓麻痹,咳嗽反射,吸痰等侵入性操作增多可将口腔内革兰阳性菌带入下呼吸道;③已有研究证实,鼻饲是 HAP 的独立危险因素^[13]。胃内细菌移生会诱发 HAP,有研究显示,胃液 pH 与 HAP 发病率关系密切,而胃内细菌除幽门螺旋杆菌外超过 50% 属革兰阳性菌,如葡萄球菌、链球菌等^[14]。④人工气道呼吸,如气管插管、气管切开等应用呼吸机通气 ACI 者,易出现下呼吸道感染^[15]。

有研究显示,美洛培南、亚胺培南等碳青霉烯类抗生素对革兰氏阴性菌表现优越抗菌活性^[16]。本研究结果显示,肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌对

哌拉西林/他唑巴坦具有较高敏感性。革兰氏阴性菌对头孢呋辛、头孢唑林敏感性较低。多数 ACI 合并 HAP 感染的革兰氏阴性菌对加酶抑制剂的抗生素敏感性稍高。他唑巴坦是一种不可逆性 β -内酰胺酶抑制剂,抗菌谱较替卡西林/克拉维酸广,不仅可强效抑制质粒介导 β -内酰胺酶活性,且有一定染色体诱导保护作用,利于阻止耐药菌产生^[17]。因此,临床选取抗菌药物时需同时兼顾药敏性及对细菌耐药基因突变选择能力方面,以延缓或避免高耐药株出现、蔓延。

综上,ACI 合并 HAP 病原体以革兰阴性菌为主,且致病菌对常用抗生素均存在不同程度耐药性。

参考文献

- [1] Shen CF, Wang SM, Ho TS, et al. Clinical features of community acquired adenovirus pneumonia during the 2011 community outbreak in Southern Taiwan: Role of host immune response[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1):196.
- [2] Li C, Duan J, Liu S, et al. Assessing the risk and disease burden of Clostridium difficile infection among patients with hospital-acquired pneumonia at a University Hospital in Central China[J]. Infection, 2017, 45(5):621-628.
- [3] Jin X, Zou Y, Zhai J, et al. Refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia with concomitant acute cerebral infarction in a child: A case report and literature review[J]. Med (Baltimore), 2018, 97(13):e0103.
- [4] 熊兴林,潘俊辰,顾良莹,等. ICU获得多重耐药菌感染现状及危险因素分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(10):1254-1256, 1270.
- [5] 杨燕文,吴梦莹,张庆. 脑卒中合并医院获得性肺炎患者的病原菌分布与耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(19):2842-2844.
- [6] 国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会,中华医学会神经外科学分会神经介入学组,中华医学会放射学分会介入学组,等. 急性大血管闭塞性缺血性卒中血管内治疗中国专家共识(2019年修订版)[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35(9):868-879.
- [7] Zi W, Wang H, Yang D, et al. Clinical Effectiveness and Safety Outcomes of Endovascular Treatment for Acute Anterior Circulation Ischemic Stroke in China[J]. Cerebrovasc Dis, 2017, 44(5-6):248-258.
- [8] 亚强,张梅,薛敏. 血清前白蛋白与急性缺血性脑卒中中相关感染的临床研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(08):722-726.
- [9] Han TS, Lean ME, Fluck D, et al. Impact of delay in early swallow screening on pneumonia, length of stay in hospital, disability and mortality in acute stroke patients[J]. Eur J Clin Nutr, 2018, 72(11):1548-1554.
- [10] Baker D, Quinn B. Hospital Acquired Pneumonia Prevention Initiative-2: Incidence of nonventilator hospital-acquired pneumonia in the United States[J]. Am J Inf Cont, 2018, 46(1):2-7.
- [11] Dat VQ, Geskus RB, Wolbers M, et al. Continuous versus intermittent endotracheal cuff pressure control for the prevention of ventilator-associated respiratory infections in Vietnam: Study protocol for a randomised controlled trial [J]. Trials, 2018, 19(1):217.
- [12] 李飞,李丽娟,梁德志,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2):101-106, 140.
- [13] 刘又宁. 机械通气相关性肺炎能否与医院获得性肺炎完全分离[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(7):513-513.
- [14] 马晨,卫婧雅,惠博,等. 神经重症患者胃液 pH 值监测与医院获得性肺炎的相关性[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(11):864-868.
- [15] Cuomo G, Brancaccio G, Stornaiuolo G, et al. Bacterial pneumonia in patients with liver cirrhosis, with or without HIV co-infection: a possible definition of antibiotic prophylaxis associated pneumonia (APAP) [J]. Inf Dis (Lond), 2018, 50(2):125-132.
- [16] Hassan NA, Awdallah FF, Abbassi MM, et al. Nebulized Versus IV Amikacin as Adjunctive Antibiotic for Hospital and Ventilator-Acquired Pneumonia Postcardiac Surgeries: A Randomized Controlled Trial [J]. Crit Care Med, 2018, 46(1):45-52.
- [17] Agarwal M, Larson EL. Risk of drug resistance in repeat gram-negative infections among patients with multiple hospitalizations[J]. J Crit Care, 2018, 43(1):260-264.
- [9] Blanca A, Cheng L, Montironi R, et al. Mirna expression in bladder cancer and their potential role in clinical practice [J]. Curr Drug Metab, 2017, 18(8):712-722.
- [10] 舒峰,刘宗来,胡宗贵,等. 转录因子 SETDB1 和 ANXA6 在膀胱癌中的表达水平及其临床意义[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(9):1094-1098.
- [11] Li N, Nan CC, Zhong XY, et al. miR-182-5p promotes growth in oral squamous cell carcinoma by inhibiting CAMK2N1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(4):1329-1341.
- [12] Li YL, Chen SD, Shan ZF, et al. miR-182-5p improves the viability, mitosis, migration, and invasion ability of human gastric cancer cells by down-regulating RAB27A [J]. Bioscience Rep, 2017, 37(3):BSR20170136.
- [13] Jia XN, Yin SD, Wei Y, et al. MiR-182-5p inhibited proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting BNIP3 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8):3270-3276.
- [14] Jin Y, Zhang ZL, Huang Y, et al. MiR-182-5p inhibited proliferation and metastasis of colorectal cancer by targeting MTDH [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(4):1494-1501.
- [15] Huan HB, Yang DP, Wen XD, et al. HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition [J]. J Exp Clin Oncol, 2017, 36(1):86-99.
- [16] Huo XY, Zhang XY, Yuan F, et al. HOXB7 promotes proliferation and metastasis of glioma by regulating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(6):2476-2485.

(上接第 1107 页)

关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 对人工肱骨头置换术术后感染的诊断价值及与术后康复的关系

徐兵¹ 汪华清¹ 黄强开¹ 肖强¹ 刘艳¹ 吴飞鹏² 虎琼华^{3*}

【摘要】目的 探讨关节液 α 防御素-1(AD-1)、基质细胞衍生因子1(SDF-1)、可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)对人工肱骨头置换术术后感染的诊断价值,以及与愈合时间、肩关节功能的关系。**方法** 选取本院42例人工肱骨头置换术术后感染患者作为研究组,另选同期86例人工肱骨头置换术术后未感染患者作为对照组。检测对比两组关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1水平,分析关节液各指标对术后感染的诊断价值,以及关节液各指标与愈合时间、Neer评分的关系。**结果** 研究组关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1水平高于对照组($P<0.05$);三者联合诊断人工肱骨头置换术术后感染具有较高的敏感性(73.81%)、特异性(91.86%),且AUC高达0.882;此外,关节液中的AD-1、SDF-1、sICAM-1与愈合时间存在显著正相关关系($r=0.623、0.477、0.490, P<0.05$),与Neer评分存在显著负相关关系($r=-0.826、-0.794、-0.747, P<0.05$)。**结论** AD-1、SDF-1、sICAM-1与人工肱骨头置换术术后感染的发生密切相关,三者联合诊断在人工肱骨头置换术术后感染诊断方面具有较高的临床诊断价值,且与感染患者愈合时间、肩关节功能存在密切相关性,有助于评估感染患者预后。

【关键词】 人工肱骨头置换术;感染; α 防御素-1;基质细胞衍生因子1;可溶性细胞间黏附分子-1

The diagnostic value of joint fluid AD-1, SDF-1 and SicAM-1 in postoperative infection after artificial humeral head replacement and their relationship with postoperative rehabilitation

XU Bing¹, WANG Huaqing¹, HUANG Qiangkai¹, XIAO Qiang¹, LIU Yan¹, WU Feipeng², HU Qionghua^{3*}

(1. Department of Orthopaedics, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610017; 2. Department of Orthopaedics, Panzhuhua Central Hospital, Panzhuhua, Sichuan, China, 617067; 3. Department of ICU, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan, China, 610017)

【ABSTRACT】Objective To investigate the diagnostic value of joint fluid defensin-1 (AD-1), stromal cell derived factor 1 (SDF-1), and soluble intercellular adhesion molecule sicAM-1 (SICAM-1) in postoperative infection after artificial humeral head replacement, and their relationship with healing time and shoulder joint function. **Methods** 42 patients infected with artificial humeral head replacement in our hospital were selected as the study group, and 86 patients without infection after artificial humeral head replacement during the same period were selected as the control group. Detecting and comparing the levels of AD-1, SDF-1, and sICAM-1 in joint fluid between the two groups, and analyzing the diagnostic value of joint fluid indicators for postoperative infection and the relationship between the indexes of joint fluid and healing time and Neer score. **Results** The levels of joint fluid AD-1, SDF-1, and sICAM-1 in the study group were higher than those in

基金项目:成都市医学科研课题项目(2018033)

作者单位:1. 成都市第二人民医院骨科,成都,四川 610017

2. 攀枝花市中心医院骨科,攀枝花,四川 617067

3. 成都市第二人民医院ICU,成都,四川 610017

*通信作者:虎琼华, E-mail: ddamma@163.com

the control group ($P<0.05$); the AUC of postoperative infection after joint diagnosis of joint fluid indicators was as high as 0.882, the best diagnostic sensitivity was 73.81%, and the specificity was 91.86%; the joint fluid AD-1, SDF-1 and sICAM-1 had a significant positive correlation with healing time ($r=0.623, 0.477, 0.490, P<0.05$) and a negative correlation with Neer score ($r=-0.826, -0.794, -0.747, P<0.05$). Conclusion AD-1, SDF-1 and sICAM-1 are closely related to the occurrence of infection after artificial humeral head replacement. The combination of the three indicators has a high application value in the diagnosis of postoperative infection, and is closely related to the healing time of the infected patients and the function of the shoulder joint, which is helpful to assess the prognosis of infected patients.

[KEY WORDS] Artificial humeral head replacement; Infection; Alpha defensin-1; Stromal cell-derived factor 1; Soluble intercellular adhesion molecule-1

人工肱骨头置换术为临床治疗肱骨粉碎性骨折患者的常用方法,相关报道显示,初次关节置换者人工关节感染发生率为1%~2%,翻修手术则达3%~5%^[1-2]。术后感染不仅诊断难度大,治疗难度高,很大程度上增加患者痛苦及经济负担^[3]。因此,明确术后感染相关因素,或于发病早期检出,采取针对性预防或早期干预治疗措施,对改善患者预后具有重要意义。相关研究指出,发生感染者血液中 α 防御素-1(Alph defensin-1, AD-1)及可溶性细胞间黏附分子-1(Soluble intracellular adhesion molecule - 1, sICAM-1)水平显著升高,与感染发生具有密切关系^[4-5]。此外,基质细胞衍生因子1(Stromal cell-derived factor-1, SDF-1)属骨髓基质细胞所生成趋化因子,在感染性疾病、免疫炎症反应等多种生理学过程中均有重要促进作用^[6-7]。基于此,本研究首次分析关节液中AD-1、SDF-1、sICAM-1在人工肱骨头置换术术后感染患者变化情况,三者联合检测对人工肱骨头置换术术后感染的诊断价值,旨在为临床诊治术后感染提供参考依据。报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2019年6月本院42例人工肱骨头置换术术后感染患者作为研究组,均为切口感染。另选同期86例人工肱骨头置换术术后未感染患者作为对照组,两组在年龄、骨折至就诊时间、骨折原因、体重、合并症、性别等方面差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表1。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 选例标准

研究组纳入标准:①经X线或CT确诊为肱骨粉碎性骨折;②新鲜骨折;③首次接受人工肱骨头

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

Table 1 Comparison of two groups of general data

项目	研究组 ($n=42$)	对照组 ($n=86$)	t/χ^2 值	P 值
性别(女/男)	18/24	35/51	0.054	0.816
年龄(岁)	68.14 \pm 4.72	66.82 \pm 5.17	1.395	0.166
体重(kg)	66.21 \pm 8.39	67.60 \pm 8.69	0.865	0.389
骨折至就诊时间(h)	11.32 \pm 4.15	10.81 \pm 3.90	0.680	0.498
手术时间(min)	73.26 \pm 5.86	72.55 \pm 4.77	0.732	0.465
术中出血量(mL)	173.41 \pm 19.20	170.85 \pm 19.92	0.691	0.491
骨折原因(例)				
交通事故	22(52.38)	41(47.67)		
意外摔伤	10(23.81)	25(29.07)	0.706	0.872
钝器击打	7(16.67)	12(13.95)		
其他	3(7.14)	8(9.30)		
合并症(例)				
高血压	5(11.91)	8(9.30)	0.021	0.647
糖尿病	8(19.05)	10(5.81)	1.285	0.257
高血脂	3(7.14)	8(9.30)	0.005	0.941

置换术治疗;④无其他部位骨折;⑤研究组均于术后4周内发生感染;⑥患者知晓本研究,已签署同意书。研究组排除标准:①伴有严重脏器损伤者;②精神疾病患者;③骨折前3周内具有感染性疾病史者;④恶性肿瘤患者;⑤血液系统疾病、免疫性疾病患者;⑥合并脓毒症、系统性红斑狼疮等疾病者。对照组纳入标准:①经X线或CT确诊为肱骨粉碎性骨折;②新鲜骨折;③首次接受人工肱骨头置换术治疗;④无其他部位骨折;⑤术后未发生感染;⑥患者知晓本研究,已签署同意书。对照组排除标准同研究组。

1.3 方法和观察指标

方法:入组后24h内采集患肢关节液1mL,以3500 r/min转速离心处理5min,取上层清液,由专业检测师采用酶标仪(厂家:美国Bio-RAD公司,型号:Bio-RAD550)、酶联免疫吸附检测试剂盒(厂家:苏州浩欧博生物医药有限公司,规格:96人份/

盒,批号:20150623),以酶联免疫吸附法测定AD-1、SDF-1、sICAM-1水平。

观察指标:①两组关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1水平。②分析关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1单独及联合对术后感染的诊断价值。③感染发生后,随访3~5个月,比较不同关节液水平患者愈合时间、肩关节功能,骨折愈合标准:局部无压痛、纵向叩击痛,无异常活动;X线片检查显示骨折线已模糊,骨折部位有连续性骨痂;可向前平举1 kg重物达1 min;连续观察两周骨折处不变形。感染愈合标准:红肿、疼痛、血性或者脓性渗出物等症状完全消失。采用Neer评分系统^[8]评估肩关节功能,总分100分,总分90分以上为优,80~89分为良,70~79分为可,70分以下为差。④分析关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1与愈合时间、Neer评分关联性。

1.4 统计学方法

数据处理采用SPSS 22.0软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两两比较采用 t 检验;计数资料以 n (%)表示,行 χ^2 检验,采用Pearson进行相关性分析,采用ROC曲线分析诊断价值, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 两组关节液各指标水平

研究组关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1水平较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 两组关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1水平比较
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of AD-1, SDF-1 and sICAM-1 in the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AD-1 ($\mu\text{g/L}$)	SDF-1 ($\mu\text{g/L}$)	sICAM-1 (ng/mL)
研究组	42	275.03 \pm 75.67	728.34 \pm 160.12	831.19 \pm 215.75
对照组	86	211.14 \pm 70.36	573.49 \pm 122.56	622.05 \pm 148.30
t 值		4.705	6.052	6.416
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 关节液各指标对术后感染的诊断价值

关节液SDF-1诊断术后感染的AUC为0.798,大于AD-1及sICAM-1,当截断值>691.61 $\mu\text{g/L}$ 时,诊断敏感度为69.05%,特异度为81.40%。见表3、图1。

表3 ROC分析结果

Table 3 ROC analysis results

指标	AUC	95%CI	Z统计	截断值	敏感度(%)	特异度(%)	P 值
AD-1	0.717	0.631~0.793	4.379	>263.13 $\mu\text{g/L}$	57.14	81.40	<0.001
SDF-1	0.798	0.718~0.864	6.738	>691.61 $\mu\text{g/L}$	69.05	81.40	<0.001
sICAM-1	0.787	0.705~0.854	6.116	>789.55 ng/mL	66.67	86.05	<0.001

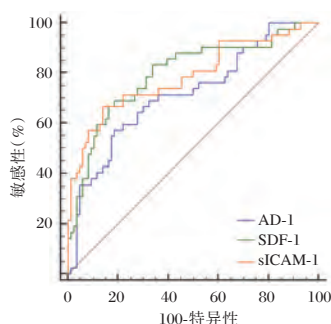


图1 各指标诊断术后感染ROC曲线

Figure 1 ROC curve of postoperative infection diagnosed by each index

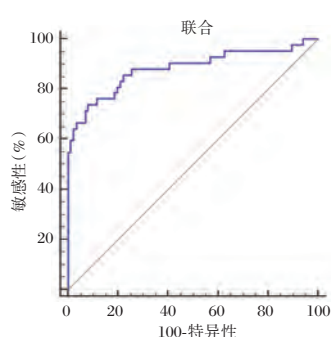


图2 各指标诊断术后感染ROC曲线

Figure 2 ROC curve of postoperative infection diagnosed by each index

2.3 联合诊断

关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1联合诊断术后感染的AUC为0.882,95%CI为0.813~0.932,截断值诊断敏感度为73.81%,特异度为91.86%,见图2。

2.4 关节液各指标不同表达情况术后感染患者的愈合时间、Neer评分

关节液AD-1、SDF-1、sICAM-1高表达的术后感染患者愈合时间长于低表达者,Neer评分低于低表达者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表4 关节液各指标不同表达情况的术后感染患者愈合时间、Neer评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of healing time and Neer score of postoperative infection patients with different expression levels of various indicators of joint fluid ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	愈合时间(周)	Neer评分(分)
AD-1	高表达者	28	15.34±2.10
	低表达者	14	13.29±1.93
	t值		3.061
	P值		0.004
SDF-1	高表达者	30	15.57±2.24
	低表达者	12	12.39±1.82
	t值		4.365
	P值		<0.001
sICAM-1	高表达者	31	15.10±1.75
	低表达者	11	13.42±1.39
	t值		2.871
	P值		0.007

2.5 术后感染患者关节液各指标水平与愈合时间、Neer评分关联性

关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 与愈合时间呈正相关,与 Neer 评分呈负相关($P<0.05$),见表5,图3。

表5 关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 与愈合时间、Neer评分关联性

Table 5 Correlation of joint fluid AD-1、SDF-1 and sICAM-1 with fracture healing time and neer score

项目	AD-1		SDF-1		sICAM-1	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
愈合时间	0.623	<0.001	0.477	<0.001	0.490	<0.001
Neer评分	-0.826	<0.001	-0.794	<0.001	-0.747	<0.001

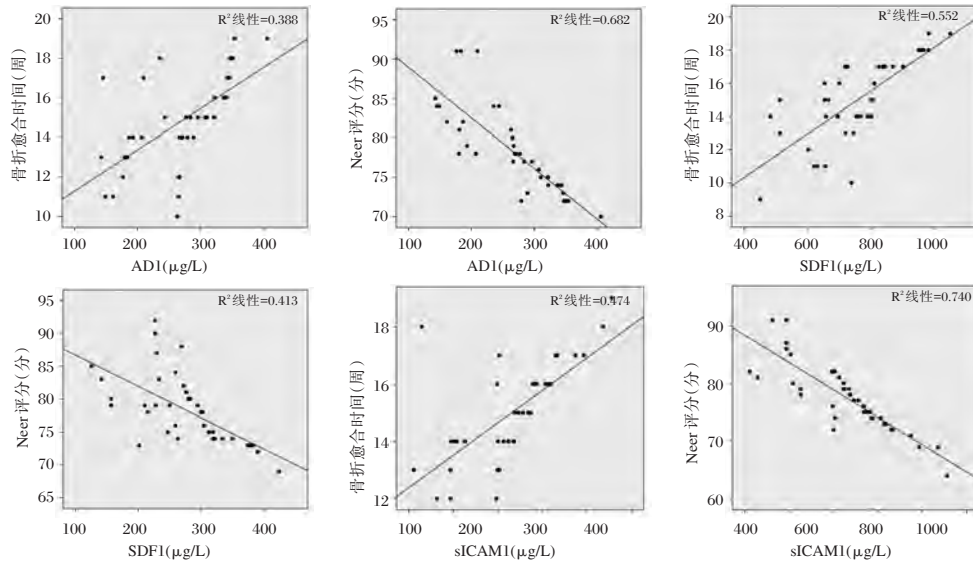


图3 术后感染患者关节液各指标水平与愈合时间、Neer评分的相关性

Figure 3 Correlation between the levels of all indicators of joint fluid and healing time and Neer score in postoperative infected patients

3 讨论

AD-1 为宿主非特异抗感染免疫的重要组成部分,是一种具有广谱抗菌性的活性小分子肽类,在抵御细菌、病毒、真菌侵袭机体过程中均具有重要作用^[9]。洪海峰^[10]研究指出,在脓毒症、细菌感染患者血液及各种体液中,AD-1 表达水平均有明显升高。本研究结果中,人工股骨头置换术发生术后感染者关节液 AD-1 显著高于未发生感染者,表明 AD-1 与术后感染的发生具有一定关系,当机体发生感染时,细菌等大量侵入感染部位,机体防御

机制开启,释放大量 AD-1 以抵抗感染,从而引起 AD-1 表达水平升高。SDF-1 是一种新型 CXC 类趋化蛋白,广泛表达于多种细胞和组织中,同时参与感染性疾病、炎症反应及造血细胞的调控^[11]。王宇强等^[12]对 80 例开放性骨折术后感染患者进行的一项研究发现,SDF-1 参与骨组织的多种生理过程,在牵引成骨区和骨折区的表达差异明显,参与骨折术后感染的发生发展。本研究发现,人工股骨头置换术发生术后感染者关节液 sICAM-1 水平显著升高。近年来国内外多项研究指出,在 sICAM-1 水平在感染性疾病患者体内显著升高,感染消除

后其水平很快恢复正常,是评估感染病情的敏感性指标^[13-15]。本研究发现术后感染患者关节液 sICAM-1 水平显著升高,感染发生后,病原微生物释放的毒性代谢物可刺激淋巴细胞、中性粒细胞等大量释放炎性介质及细胞因子,促进上皮细胞 sICAM-1 的 mRNA 表达增加,引起 sICAM-1 水平增高^[16]。基于上述结论,此次研究进一步采用 ROC 曲线分析,发现关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 在术后感染诊断方面具有较高应用价值,联合应用 3 种指标能有效提高诊断效能,可为临床诊断人工股骨头置换术后感染提供重要依据。

术后感染患者关节液中 AD-1、SDF-1、sICAM-1 表达增强,反映出关节部位感染程度及炎症反应增加,从而影响术后康复,本研究结果中,关节液 AD-1、SDF-1、sICAM-1 水平与愈合时间及 Neer 评分存在密切相关性,提示监测上述各指标表达情况有助于临床制定针对性干预措施,以改善患者预后。

综上所述,人工股骨头置换术后感染患者关节液中 AD-1、SDF-1、sICAM-1 呈异常高表达状态,均为感染的发生密切相关,在感染诊断中应用价值较高,且能作为评估感染患者预后的重要指标。但本研究仍存在一定不足,如未详细探讨愈合后各指标变化趋势及对疾病转归的影响,有待日后进一步分析与探究。

参考文献

- [1] 王铭,李洪峰,王云力,等. 老年股骨头近端粉碎性骨折人工股骨头置换与锁定加压钢板固定的对比[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(16): 1463-1467.
- [2] Kishimoto M, Yamana H, Inoue S, et al. Suspected periprosthetic joint infection after total knee arthroplasty under propofol versus sevoflurane anesthesia: a retrospective cohort study; Infection articulaire périprothétique soup? onnée après arthroplastie totale de genou sous anesthésie par [J]. Can J Anaesth, 2018, 65(8): 893-900.
- [3] 孙永,周新社. 人工关节假体感染细菌生物膜诊断的研究进展[J]. 安徽医药, 2017, 21(9): 1570-1573.
- [4] 左强. Alpha-防御素(α -defensin)作为诊断关节置换术后假体周围感染生物标记物的研究[D]. 山东大学, 2017.
- [5] 项和平,何小军,宋磊,等. 血清 S100A12、sICAM-1 和 PCT 联合检测对重症急性胰腺炎并发感染的早期诊断价值[J]. 中华急诊医学杂志, 2018, 27(8): 917-920.
- [6] 高静,李晓岚,王敏哲,等. 血管内皮生长因子、基质细胞衍生因子-1 基因对人微血管内皮细胞增殖、迁移、凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2019, 23(9): 1784-1789.
- [7] 雷雨,都庆国,薛飞,等. 趋化因子受体 7 和基质细胞衍生因子-1 在胃癌组织中的表达[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(12): 1278-1280.
- [8] 杨聪林,陈元标,马绍华,等. 半肩置换治疗老年复杂肱骨近端骨折的疗效分析[J]. 实用骨科杂志, 2019, 25(6): 551-553.
- [9] Hui Q, Donde OO, Tian CC, et al. Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1 [J]. J Biosci Bioeng, 2018, 126(3): 339-345.
- [10] 洪海峰. 关节液 α 防御素-1 检测在人工关节感染诊断中的应用[D]. 福建医科大学, 2016.
- [11] Wang GD, Liu YX, Wang X, et al. The SDF-1/CXCR4 axis promotes recovery after spinal cord injury by mediating bone marrow-derived from mesenchymal stem cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11629-11640.
- [12] 王宇强,贾永森,苏学涛,等. 开放性骨折患者术后感染病原菌分布及对血清 MMPs, SDF-1, VEGF 和 TNF- α 表达影响研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(22): 2223-2226.
- [13] Abo-Hagar HH, Abo-Elezz EB, Mehrez M, et al. Diagnostic Efficacy of Serum Amyloid A Protein and Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 in Pediatric Ventilator-Associated Pneumonia [J]. J Intensive Care Med, 2019, 34(6): 503-510.
- [14] 何澄,刘训志,项卫卫. 血清可溶性细胞间黏附分子-1 及皮肤温度对全膝关节置换假体周围感染的诊断作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(18): 2816-2819.
- [15] Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, et al. Increased levels of soluble forms of E-selectin and ICAM-1 adhesion molecules during human leptospirosis [J]. Plos One, 2017, 12(7): e0180474.
- [16] 何澄,刘训志,项卫卫. 血清可溶性细胞间黏附分子-1 及皮肤温度对全膝关节置换假体周围感染的诊断作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(18): 2816-2819.

(上接第 1114 页)

- [13] Loddio I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis [J]. Front Immunol, 2015, 6(1): 551.
- [14] Shim JO. Recent Advance in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease [J]. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2019, 22(1): 41-49.
- [15] Aloï M, Lionetti P, Barabino A, et al. Phenotype and disease

- course of early-onset pediatric inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2014, 20(4): 597-605.
- [16] Bakhtiar S, Gámez-Díaz L, Jarisch A, et al. Treatment of Infantile Inflammatory Bowel Disease and Autoimmunity by Allogeneic Stem Cell Transplantation in LPS-Responsive Beige-Like Anchor Deficiency [J]. Front Immunol, 2017, 8(1): 52.

宫颈病变流行病学分析及宫颈冷冻治疗新进展

曹欢 刘冰* 王晓丹

[摘要] 宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,严重威胁女性的健康,其发生率居女性癌症首位,且随着人们生活方式改变,其发生率呈上升、年轻化趋势。宫颈癌病变的发生、发展是一个多因素过程,多数患者由低级别鳞状上皮内瘤变(CIN1)到浸润癌(ICC)需要数十年,由高危人乳头瘤病毒(HR-HPV)持续感染引起。因此,临床上加强宫颈疾病流行病学分析、发病特点研究,能为患者早期诊断、治疗提供依据。宫颈冷冻治疗是一种物理治疗方法,利用制冷剂(常为二氧化碳),使得局部病变组织反复冻融、使之坏死或变性脱落,经组织修复达到临床治疗目的。因此,本研究以宫颈病变为起点,分析宫颈病变流行病学、发病特点,探讨宫颈冷冻治疗在宫颈病变患者中的临床效果,旨在为临床宫颈病变治疗提供依据。

[关键词] 宫颈癌;宫颈病变;流行病学;发病特点;冷冻治疗

Epidemiological analysis of cervical lesions and new development of cervical cryotherapy

CAO Huan, LIU Bing*, WANG Xiaodan

(Department of gynaecology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, 100026)

[ABSTRACT] Cervical cancer is a common malignant tumor in women, which seriously threatens women's health. The incidence ranks first among women's cancers. With changes in people's lifestyles, its incidence is rising and younger. The occurrence and development of cervical cancer is a multifactorial process. It takes decades for most patients to change from low-grade squamous intraepithelial neoplasia (CIN1) to invasive carcinoma (ICC), and most patients are due to high-risk human papillomavirus (HR-HPV) caused by persistent infection. Therefore, clinically strengthening the epidemiological analysis and pathogenesis of cervical diseases can provide a basis and reference for early diagnosis and treatment of patients. Cervical cryotherapy is a physical therapy method that uses a refrigerant (usually liquid nitrogen) to repeatedly freeze and thaw local diseased tissues, necrosis or degeneration, and to achieve clinical treatment through tissue repair. Thus, this study uses cervical lesions as a starting point to analyze the epidemiology and pathogenesis of cervical lesions, and to explore the clinical effects of cervical cryotherapy in patients with cervical lesions, and to provide evidence and reference for clinical cervical lesion treatment.

[KEY WORDS] Cervical cancer; Cervical lesions; Epidemiology; Incidence characteristics; Cryotherapy; Clinical effects

宫颈癌(cervical cancer, CC)是临床发病率较高的恶性肿瘤,在当前女性最为普遍的三种恶性疾病之一,其发生率、死亡率居第二位。既往研究表明,宫颈癌的发生、发展是一个多因素过程,普

遍认为与年龄、区域及国家等因素有关^[1]。数据报道显示^[2]全世界范围内,平均每年约有53万新增病例,且约有27.5万人死于该疾病,而上述患者中85.0%新发病例与87.0%的死亡病例发生在发展中

基金项目:2019年北京妇产医院中青年学科骨干培养专项课题(FCYY201916)

作者单位:首都医科大学附属北京妇产医院妇科,北京100026

*通信作者:刘冰, E-mail:liubing03112126.com

国家。Manthiram K^[3]研究表明持续的高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染能增加宫颈癌发生率。数据报道显示50.0%~70.0%的人群医生中感染过HPV,但是多数患者HPV感染后能经过机体的自身免疫实现病毒清除(一般需要1~2年)^[4]。李丽^[5]研究表明高级别上皮内瘤变的发生、发展与HR-HPV感染有关,而低级别上皮内瘤变法则与低位HPV有关。本研究以宫颈病变为起点,分析宫颈病变流行病学、发病特点,探讨宫颈冷冻治疗在宫颈病变患者中的临床效果,综述如下。

1 宫颈病变患者HPV感染流行病学分析

宫颈病变是一个多因素过程,且多数患者与HPV感染有关,尤其是良性皮肤黏膜等。流行病学调查结果表明,当前临床上发现的HPV已经超过200种,但是能引起宫颈癌的HPV仅有30种^[6]。既往研究表明:宫颈病变的发生常见危险因素包括:初次性生活年龄 ≤ 20 岁、吸烟、流产次数 > 1 次、使用避孕套避孕及性生活前、后清洗外阴等。①初次性生活年龄 ≤ 20 岁。对于性生活年龄过小者,该年龄段女性的生殖系统尚未发育成熟,性生活后能影响局部宫颈细胞代谢活跃程度;②吸烟。国外学者研究表明:无论是主动吸烟还是被动吸烟均是宫颈疾病发生的独立危险因素,可能与尼古丁的致癌作用有关,且被动吸烟人是引起女性宫颈疾病的主要因素。③流产次数 > 1 次。流产会对子宫内膜造成较大的影响,对于多次流产者,将会影响子宫功能与形态,增加宫颈疾病发生率。④性生活前、后清洗外阴。国内学者研究表明:性生活前、后清洗外阴是宫颈疾病的保护因素。

流行病学调查结果表明:HPV年发生率为10.0%~15.0%,且至少80.0%成年女性感染过HPV亚型中的一种或多种^[7]。高楠研究表明,HPV16型最为常见^[8]。王从素^[9]以宫颈疾病患者作为对象,结果表明:宫颈疾病在 < 25 岁人群中HPV感染率最高,而高危型HPV感染及单一感染中比较存在明显的差异性。但是,55岁后HPV感染率呈下降趋势,说明HPV的感染与性行为活跃程度有关,且随着患者年龄的增加,疾病发生率呈下降趋势。

2 宫颈病变患者发病特点

宫颈病变是临床上常见的宫颈疾病,具有癌变倾向,但是临床诊断、定位存在争议,该疾病既

然不是原位恶性肿瘤,亦非良性疾病,且患者持续发展容易增加癌变率^[10]。国内学者研究表明^[11]:宫颈癌的发生、发展是一个多因素、长病程过程,患者从感染到发病需要经历数十年的演变,且根据疾病严重程度可以分为轻度、中度、中度上皮内瘤样病变、早期浸润癌及浸润癌等,影响患者健康、生活。研究表明^[12]:宫颈疾病病因复杂,普遍认为与高危型HPV持续感染等有关。

宫颈重度上皮内瘤样病变是癌前病变,具有可逆性,即一部分病变能自然消失,但是具有进展性,病灶能持续发展,严重者可发生癌变,与其可逆性、病变范围及程度有关。对于轻度上皮内瘤样病变自然消失患者明显大于中、重度。重度上皮内瘤样病变患者发展为癌的可能性明显大于轻度与中度患者。国内学者研究表明:对于良性异常增殖患者,能自行痊愈^[13-14]。既往研究表明^[15]:宫颈病变患者发病初期临床症状不明显,可能会出现轻微的不适症状。

3 冷冻治疗在宫颈疾病中的应用及优缺点

3.1 冷冻治疗宫颈疾病的定义及原理

冷冻技术最早起源于19世纪,但是该治疗方法最早并非用于宫颈疾病中,更多的用于皮肤病治疗中。临床研究表明^[16]:冷冻治疗是一种物理治疗方法,不仅能提高皮肤病变疾病,亦可用于慢性宫颈疾病中。近年来,随着医疗技术的不断发展,冷冻技术开始用于宫颈上皮内瘤变、慢性宫颈炎,并将其当作标准治疗方法,且2009年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)建议用于宫颈上皮内瘤变。①细胞损伤。细胞冷冻时细胞内和外的环境水会形成冰晶,导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、pH值改变、蛋白变性,引起细胞死亡。国内学者研究表明:冷冻与解冻过程中细胞膜并不稳定,当细胞内温度发生变化后,将会引起细胞水分丧失,而在解冻过程中则会引起细胞再次膨胀,从而发生细胞溶解^[17];②血管损伤。崔世红以兔为研究对象^[18],发现微血管内皮细胞在冷冻后1h内将会受到破坏,而解冻时则会引起血小板发生聚集、间质肿胀,部分兔可伴有红细胞渗出、血管内皮细胞发生分离。③免疫损伤^[19]。目前,临床上对于免疫损伤机制尚未明确,普遍认为存在两种不同说法:一是抗肿瘤抗体的产生。抗体能形成诱导补体相互结合,

引起嗜中性粒细胞、巨噬细胞的聚集,上述细胞均能释放大量的自由基与生物酶,能直接杀死病灶细胞^[20]。二是能诱导细胞毒性T细胞。Eltit F研究表明^[21]:冷冻技术能改变细胞毒素T细胞的敏感性或改变抗原呈递;亦可刺激自然杀伤细胞活性。

3.2 冷冻治疗宫颈疾病禁忌症及治疗方法

①禁忌症。该方法不宜用于妊娠期女性、急性或特殊生殖道感染者;处于月经期、宫颈浸润癌;宫颈管刮治手术阳性表现;合并严重内、外科疾病而无法耐受者^[22]。②冷冻治疗宫颈疾病方法。既往研究表明:冷冻治疗宫颈疾病一般在月经干净后3~7 d内完成,且应暂时禁止性生活。手术前完善有关检查,正确指导患者排空膀胱,取膀胱截石位,对手术部位进行常规消毒后放置窥阴器,充分暴露宫颈。结合宫颈病变范围,选择合适的冷冻治疗探头^[23]。同时,患者治疗前在宫颈与阴道间隔部位放置生理盐水棉球,使得阴道壁与宫颈隔开,避免损伤阴道壁。结合患者情况选择合适型号、大小的探头,经生理盐水充分洗涤、润滑后置于宫颈中,保证探头能与宫颈病变组织相互贴合。上述手术前准备完成后打开仪器,开始降低病灶部位及周围组织温度,可见探头接触部位出现小白霜,并逐渐形成致密的厚霜覆盖物,连续进行3 min治疗后停止,开始解冻复温,连续完成5 min解冻后,再次开始冷冻,反复上述操作,治疗完毕后待宫颈组织与冷冻探头完毕解冻、分离后取出^[24]。

国内学者^[25]以宫颈疾病患者50例作为对象,所有患者均拟行冷冻治疗,结果表明:患者治疗后HPV有效率为96.0%,HPV转阴率为86.0%。既往研究表明:冷冻用于CIN患者中亦可获得良好的治疗效果,患者治疗后有效率为86.0%,患者病情得到明显改善^[26-27]。但是,冷冻治疗临床使用时亦存在一定的局限性与不足,患者治疗过程中少部分患者属于敏感体质,可伴有轻微下腹痛,但是患者均可耐受^[28];部分患者术后3周发生阴道排液,但是上述不良反应均不需要特殊处理,手术后数周即可消失^[29]。郝敏^[30]研究表明:冷冻治疗用于宫颈疾病中不良反应发生率较低,治疗创伤较小,能获得较高的安全性。

综上所述,宫颈疾病是临床上发生率较高的妇科疾病,且多数患者由于HPV感染引起,患者发病早期临床症状缺乏典型性,导致患者早期诊断、治疗难度较大。为了提高宫颈疾病患者治疗效果,治疗前

应完善有关检查,评估患者身体状态,善于根据患者恢复调整相关参数,促进患者恢复。但是,冷冻治疗临床使用时亦存在一定的风险性、创伤性,治疗过程中应加强患者生命体征监测,善于根据患者恢复与耐受调整有关,巩固治疗效果。

参考文献

- [1] 胡利丹,卢雪映,胡月南,等. 宫颈病变患者HPV感染的流行病学调查及危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(22): 5212-5215.
- [2] 许惠惠,朱海燕,章彤彤,等. 高危型人乳头状瘤病毒感染在宫颈病变进展中的风险研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2017, 31(4): 302-306.
- [3] Manthiram K, Lapidus S, Edwards K. Unraveling the pathogenesis of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis through genetic, immunologic and microbiologic discoveries: an update [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2017, 29(5): 493-499.
- [4] 张薇,王桂香,李鹏,等. 冷冻治疗及环形电切锥切术对宫颈高度病变疗效的对照研究[J]. 河北医药, 2017, 39(13): 1975-1977.
- [5] 李丽,杨亚玲,闫翠起,等. 陕西地区宫颈病变患者HR-HPV感染的流行病学调查及与宫颈病变的相关性分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(9): 106-108.
- [6] 赵晓峰,宋淑芳,卢建军,等. p16、Ki-67表达及人乳头瘤病毒型别在子宫颈上皮内瘤变Ⅱ级治疗分流中的作用[J]. 肿瘤研究与临床, 2018, 30(3): 157-160.
- [7] Ahn S Y, Li C, Zhang X, et al. Mitofusin-2 expression is implicated in cervical cancer pathogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(6): 3419-3426.
- [8] 高楠,李大鹏,盛修贵,等. 早期宫颈癌术后伴高危复发因素患者不同治疗方式疗效和并发症的观察[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(4): 312-316.
- [9] 王从素,桂定清,张力忆,等. 术前新辅助化疗对宫颈癌组织病理学动态变化及近远期疗效观察[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(6): 920-923.
- [10] Meijer CJLM, Steenbergen RDM. Gynaecological cancer: novel molecular subtypes of cervical cancer-potential clinical consequences [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 397-398.
- [11] Mark Schiffman, Nicolas Wentzensen. The orderly incorporation of continuing technologic advances into cervical cancer screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2020, 11(3): 106-109.
- [12] Johan A den Boon, Dohun P, Sophia SW, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(25): 3255-3264.
- [13] 宋全明,李海. 冰冻病理检查诊断宫颈上皮内瘤变Ⅲ级和评估锥切组织边缘状态的作用[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(11): 131-133.

- [14] 黄秀丽,朱立娟. 河北省25128例35~64岁农村妇女宫颈癌病变调查[J]. 中国妇幼保健, 2017,32(17):4233-4234.
- [15] 韩淑霞,赵俊杰,李晓雯. TNF- α 介导的凋亡相关基因SNP与宫颈癌发生的分子流行病学研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2017,16(9):851-854.
- [16] Morris G, Puri BK, Frye RE, et al. The putative role of environmental mercury in the pathogenesis and pathophysiology of autism spectrum disorders and subtypes[J]. *Mol Neurobiol*, 2018,55(6):4834-4856.
- [17] 赵虹,卢丹. 冷冻术治疗宫颈高危型人乳头瘤病毒感染疗效研究[J]. 中国全科医生, 2011,14(14):1526-1528.
- [18] 崔世红,吕晓峰,刘灵,等. 外泌体在宫颈癌发病及诊断与治疗中的研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2018,35(5):444-448.
- [19] 宋妮娜,唐荣荣,刘佳佳,等. TLRs在宫颈HPV16持续性感染及宫颈病变中的作用研究[J]. 实用妇产科杂志, 2017,33(2):132-136.
- [20] 张珊珊. 早期宫颈癌前病变干预治疗中宫颈环形电切除术的应用研究[J]. 中国妇幼保健研究, 2017,28(S2):459-460.
- [21] Eltit F, Assiri A, Garbuz D, et al. Adverse reactions to metal on polyethylene implants: Highly destructive lesions related to elevated concentration of cobalt and chromium in synovial fluid[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017,105(7):1876-1886.
- [22] 李娇,李娜,赵静妮,等. 人乳头状瘤病毒少见亚型在宫颈病变患者分布状况的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018,58(6):367-371.
- [23] 孙晓东,刘敏,鲍慧,等. 不同年龄段宫颈癌患者的病理特点及预后分析[J]. 现代肿瘤医学, 2018,245(11):127-130.
- [24] 赵祖红,齐立宁. CT联合MRI在宫颈癌患者的诊断效果及影像学特点研究[J]. 中国性科学, 2018,219(4):115-118.
- [25] 石莹,张秀兴,郭芝亮. 冷冻治疗术对宫颈CINI和HPV感染的疗效观察[J]. 吉林医学, 2014,(33):1526-1528.
- [26] Gubbala K, Laios A, Madhuri TK, et al. Results from survey to assess current trends in surgical practice in the management of women with early stage cervical cancer within the BGCS community with an emphasis on routine frozen section examination[J]. *Int J Surg Oncol Actions*, 2017,20(17):296-300.
- [27] Gubbala PK, Laios A, Wang Z, et al. Routine intraoperative frozen section examination to minimize bimodal treatment in early-stage cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer Actions*, 2016,26(6):1148-1153.
- [28] 热米拉·热扎克. E6癌蛋白对宫颈癌及癌前病变的风险分层及长期风险预测作用研究:基于中国人群的前瞻性队列研究[J]. 中华预防医学杂志, 2017,51(8):750-750.
- [29] 段宁娟,王振威,杨永秀. 微小染色体维持蛋白在宫颈不典型增生癌前病变及宫颈癌中的作用及研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2017,32(6):1342-1344.
- [30] 郝敏,蔺莉. 绝经后妇女宫颈上皮内瘤变II级及以上患者临床特点分析[J]. 中国微创外科杂志, 2017,17(2):155-158.

(上接第1118页)

- [2] 邵亮,李南方. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与炎症细胞因子[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013,5(5):73-76.
- [3] 赵晨曲,杜娟. 支气管哮喘的诊治进展[J]. 贵州医药, 2018,42(9):1060-1062.
- [4] 买智涛,姜明明,万善志. FeNO联合血清ECP、IgE检测对支气管哮喘的临床诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020,12(5):625-628+633.
- [5] Cooper K, Frampton G, Harris P, et al. Reslizumab for Treating Asthma with Elevated Blood Eosinophils Inadequately Controlled by Inhaled Corticosteroids: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal[J]. *Pharmacoeconomics*, 2018,36(5):545-553.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016,39(9):675-697.
- [7] Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011,184(5):602-615.
- [8] 魏亚强,张晓飞. 海珠喘息定片联合生物共振诊断治疗仪治疗支气管哮喘临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2017,39(9):789-793.
- [9] Nagano T, Katsurada M, Dokuni R, et al. Crucial Role of Extracellular Vesicles in Bronchial Asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(10):2589.
- [10] 荣庆娜,赵晓玲,李霞,等. 呼出气一氧化氮测定在支气管哮喘急性发作期早期诊断及病情评估中的应用[J]. 临床误诊误治, 2019,32(8):45-49.
- [11] Turner S, Fielding S, Pijnenburg M, et al. Do changes in spirometric indices and FeNO predict asthma outcomes in children? An individual patient data analysis using results from seven FeNO trials[J]. *Chest*, 2019,155(2):331-341.
- [12] 王霞,魏春华,王新强,等. 呼出气一氧化氮对支气管哮喘的诊断价值及其与气道炎症的相关性分析[J]. 国际呼吸杂志, 2017,37(12):905-910.
- [13] Yan Y, Bao HP, Li CL, et al. Wentong decoction cures allergic bronchial asthma by regulating the apoptosis imbalance of EOS[J]. *Chin Med*, 2018,13(1):21.
- [14] 雒志明,高赏,任魁,等. 支气管哮喘控制测试评分与外周血嗜酸性粒细胞计数的相关性研究[J]. 中国病案, 2018,19(1):91-94.
- [15] 雒志明,高赏,任魁,等. 支气管哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞计数与诱导痰嗜酸性粒细胞百分比和呼出气一氧化氮的相关性[J]. 山西医科大学学报, 2017,48(10):69-73.
- [16] 王惠妮,李雪. FeNO、Dmin、FEV1%opred相关性及其在支气管哮喘诊断中的价值[J]. 新疆医科大学学报, 2018,41(3):295-299.

陆道培分子医学团队及实验室介绍

陆道培分子医学团队现有 68 名全职员工,包括博士 4 人、硕士 19 人,专注于血液病基因检测的临床应用和相关研究。团队成员的专业背景包括临床医学、医学检验学、临床药学、遗传学和生物信息学。经过 14 年的建设,已发展为同时具有分子诊断技术、项目开发、生物信息分析、基因变异临床意义解读和应用的综合实力的团队。

团队成员分为 15 个项目组分工协作,为临床提供专业、准确和快速的检测服务,并持续推动检验项目的改进和相关医学研究。骨干成员包括实验室主管王芳、负责血液肿瘤基因突变/CNV 分析项目组的张阳、负责融合基因分析项目组的陈雪、负责遗传病和遗传多态性分析项目组的聂代静、负责药物基因组项目组的陈佳琦、负责质量保证体系的吴祁生、负责生物信息组的曹泮翔、主要从事相关分子医学研究的周晓苏,以及其他基因组分析团队成员马小丽、房建成、马秀娟、刘铭等。多名团队骨干成员分别任中国中西医结合学会检验医学专业委员会分子诊断专家委员会/血液系统疾病实验诊断专家委员会、北京医学检验学会血液和体液检验学分会、北京非公立医疗机构协会检验学会、北京医学会检验分会质量控制与实验室管理学组、等多个专业学会/学组委员,和中国医学装备协会基因检测分会委员兼副秘书长等。

分子医学实验室现配备 PCR 仪 20 余台、荧光定量 PCR 仪 20 台、Sanger 基因测序仪 3 台、NGS 测序仪 2 套、基因片段分析仪 3 台、高性能生物信息服务器 1 套。所开展的检验项目主要包括血液肿瘤融合基因/基因突变分析、血液系统遗传病基因变异/遗传多样性分析、药物基因组分析、分选/不分选细胞的移植供体细胞嵌合率分析、免疫多样性分析、基于全基因组/深度全外显子组/转录组测序的组学分析、病原微生物检测/宏基因组分析等。

团队注重产学研综合发展,已与北京大学、青岛大学、哈尔滨医科大学等联合培养硕士、博士研究生和博士后数名。在血液病方面的研究成果已累计于美国血液学会年会(ASH)、美国人类遗传学会年会(ASHG)、日本血液学会年会(JSH)等国际学术会议报告 70 余人次,以主要作者于 Nature Medicine、Cancer、British Journal of Cancer、British Journal of Haematology 等国内外学术期刊发表论文 100 余篇,参编血液病实验诊断专家共识 3 篇、专业书籍 3 本,申请发明专利 4 项。团队专家多次应邀参与编写血液病分子诊断相关的国内专家共识和专业书籍。每年举办的陆道培分子医学研讨会已成为业内具有影响力的年度学术会议。



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。

