



主 管

中华人民共和国国家
卫生健康委员会

主 办

中国医师协会

协 办

河北以岭医药研究院

编 辑

疑难病杂志编辑委员会

顾 问

吴咸中 陈可冀 王正国 王永炎
张 运 李春岩 张伯礼 邱蔚六
郭应禄 葛均波 李 恩 于金明

总编辑

吴以岭

社长 主编

马 智

出 版

疑难病杂志社
050035 石家庄市天山大街 238 号
电话(传真):(0311)85901735
E-mail: ynbzz@163.com
网址: http://www. ynbzz. com

印 刷

石家庄市汇昌印刷有限公司

发行范围

国内外公开发售
国内: 中国邮政集团公司
河北省分公司
国外: 中国国际图书贸易集团
有限公司
(北京 399 信箱, 100044)
代号: DK 13017

订 购

全国各地邮电局
邮发代号: 18-187
网址: http://bk. 11185. cn

零 售

疑难病杂志编辑部

广告发布登记号

石高新 13010120190001 号

定 价

每期 12.00 元 全年 144.00 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1671-6450
CN 13-1316/R

2020 年版权归疑难病杂志社所有

本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会
的观点, 除非特别声明; 未经本刊编辑部
许可, 不得任意转载和摘编; 本刊如有印
刷问题, 请向本社调换

向抗击新冠肺炎疫情的最可爱的人致敬

目 次

论著·临床

MRP8/14 对缺血性心肌病患者心肌存活率的预测价值

..... 王雪 高珩 胡佳文 闫焯 邓超 郑小璞 217

膈下逐瘀汤联合替罗非班对急性心肌梗死患者 PCI

术后高凝状态及超声心动图参数的影响

..... 史亮 原斌 蔡晓庆 张鹏 222

缺血性小血管病变 MR 影像学表现与血管性

认知功能障碍的相关性

..... 李经国 卓丽华 龙拥军 张婕 张润峰 228

BDNF Val66Met 基因多态性与老年糖尿病患者

认知功能损害的相关性

..... 刘佳 罗鸿宇 王洁妤 张丽 但小娟 杨伟 232

危重深静脉血栓患者的临床特征和危险因素分析

..... 朱丽 左秀萍 张美霞 徐梦 张朋勃 宋娟 高苗 237

非酒精性脂肪性肝病与幽门螺杆菌感染的相关性

..... 唐君瑞 李明珂 曹光琼 吕俊衍 褚倚佑 李春媚

张丹 罗粟凤 王金香 马岚青 242

口服与内镜下喷洒西甲硅油在结肠镜检查中的应用价值比较

..... 丁瞿晨 王静静 朱悦 杨丽华 季国忠 248

美托洛尔联合治疗慢性肾脏疾病预后不良与 IL-6、

RDW 及高尿酸血症的相关性分析

..... 王丽媛 徐洁 唐小铁 于洋 孙唯言 戚婷 252

特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症

患者骨代谢异常的改善效果

..... 高倩 陈云霞 代嘉 王臣 刘春燕 白婧 257

miR-141-3p 和 miR-22-3p 在胰腺癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系	秦瑞峰 薛佳栋 霍浩然 张佳 袁增江	261
雌激素受体 β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性与子宫内膜异位症的关系研究	郝娜 田芸婕 贾亚静 路晓琳	266
PCOS 患者孕期血清 PTX-3、Adropin 水平变化及其与临床特点和左心功能的相关性	刘萍 温洁 赵楠楠 何艳舫 袁金灵	271
血清 miR-124、miR-143 水平与高血压性视网膜病变关系的研究	韩月圣 焦瑞雪 张爱雪 崔迎欣 张乘瑞	275
mRNAs 列线图模型对宫颈腺癌患者生存状况的预测价值	张钊红 关德凤 杨永秀	280
论著·基础		
过表达 miR-155 对强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡的影响及作用机制探讨	苟玉萧 吴霞 陈龙 汪佳利	285
肿瘤相关巨噬细胞 CD163 在乳腺癌组织中的表达及对乳腺癌细胞生物学特性的影响	陈馨 张薇 张伟杰 赵怡欣 吴鸿雁 姚永忠	292
罕见病例		
足细胞内陷性肾小球病 1 例	张丹阳 王少亭 胡晓舟 张瑾	298
重度低钾血症合并甲状腺功能减退症致横纹肌溶解综合征 1 例	雷玉英 王伟 李芳 张笑	299
以共济失调为主要表现的布氏杆菌病 1 例	赵京燕 李建军 张强胜 潘朝	301
综 述		
尿毒症心肌病的诊断与治疗研究进展	蒲玲 丁国华	302
循环 miRNA 作为癫痫诊断潜在生物标志物的研究进展	赵海燕 黄颖 李永男	307
免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌治疗中的研究进展	卢子龙 耿庆	311
局部雌激素在子宫内膜异位症发病机制中的作用	程冀妍 陈喆 江春花 曹颖	317
幽门螺杆菌感染与胃外疾病研究进展	张华洋 刘琦	321
作者·编者·读者		247,270

期刊基本参数: CN13-1316/R * 2002 * m * A4 * 112 * zh * P * ¥12.00 * 4 500 * 24 * 2020-03

本期责任编辑: 马智 英文编辑: 马晓海

CHINESE JOURNAL OF DIFFICULT AND COMPLICATED CASES

Monthly

Established in June 2002

Volume 19, Number 3

18 March, 2020

Responsible Institution

National Health Commission of
the People's Republic of China

Sponsor

Chinese Medical Doctor Association

Co-organizer

Hebei Yiling Medical Academy

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of Difficult
and Complicated Cases

Adviser

WU Xianzhong CHEN Keji WANG Zhengguo
WANG Yongyan ZHANG Yun LI Chunyan
ZHANG Boli QIU Weiliu GUO Yinglu
GE Junbo LI En YU Jinming

Editor-in-Chief

WU Yiling

Managing Director

MA Zhi

Publishing

Publishing House of Chinese Journal of
Difficult and Complicated Cases
238 Tianshan Street, Shijiazhuang
050035, China
Tel (Fax) : (0311) 85901735
E-mail: ynbzz@163.com
http://www.ynbzz.com

Printing

Shijiazhuang Huichang Printing House

Overseas Distributor

China International Book
Trading Corporation
P. O. Box 399, Beijing 100044, China
Code No. DK 13017

Overseas Price

\$ 12.00 per issue; \$ 144.00 a year

CSSN

ISSN 1671-6450 CN 13-1316/R

Copyright 2020 by Publishing House of Chinese
Journal of Difficult and Complicated Cases

All articles published represent the opinions of the
authors, do not reflect the official policy of the editori-
al board, unless clearly specified.

CONTENTS

Original Article: Clinical Research

The predictive value of MRP8/14 on myocardial viability in patients with ischemic cardiomyopathy

..... Wang Xue, Gao Heng, Hu Jiawen, et al 217

Effect of *Gexiazhu* decoction combined with tirofiban on hypercoagulability and echocardiographic parameters in patients with acute myocardial infarction after PCI

..... Shi Liang, Yuan Bin, Cai Xiaoping, et al 222

Correlation between MR imaging and vascular cognitive dysfunction in ischemic small vessel disease

..... Li Jingguo, Zhuo Lihua, Long Yongjun, et al 228

Association of BDNF Val66Met gene polymorphism with cognitive impairment in elderly diabetic patients

..... Liu Jia, Luo Hongyu, Wang Jieyu, et al 232

Analysis of clinical characteristics and risk factors of patients with critical deep vein thrombosis

..... Zhu Li, Zuo Xiu ping, Zhang Meixia, et al 237

The relationship between non-alcoholic fatty liver disease and helicobacter pylori infection

..... Tang Junrui, Li Mingke, Cao Guangqiong, et al 242

Comparison of the application value of oral and endoscopic spraying of silicone oil in colonoscopy

..... Ding Quchen, Wang Jingjing, Zhu Yue, et al 248

The correlation analysis of IL-6, RDW and hyperuricemia in the treatment of chronic kidney disease with metoprolol

..... Wang Liyuan, Xu Jie, Tang Xiaotie, et al 252

Effect of tripeptide combined with raloxifene on bone metabolism in postmenopausal osteoporosis Improvement effect

..... Gao Qian, Chen Yunxia, Dai Jia, et al 257

Expression of miR-141-3p and miR-22-3p in pancreatic cancer and their relationship with clinicopathological features and prognosis

..... Qin Ruifeng, Xue Jiadong, Huo Haoran, et al 261

Study on the relationship between single nucleotide polymorphisms at rs1256064 and rs1256049 of estrogen receptor β gene and endometriosis	<i>Hao Na, Tian Yunjie, Jia Yajing, et al</i>	266
Changes of serum PTX-3 and adropin levels in pregnant women with PCOS and their correlation with clinical characteristics and left ventricular function	<i>Liu Ping, Wen Jie, Zhao Nannan, et al</i>	271
Relationships between levels of microRNA 124 and microRNA 143 in peripheral blood and hypertensive retinopathy	<i>Han Yuesheng, Jiao Ruixue, Zhang Aixue, et al</i>	275
The predictive value of mRNAs nomogram model of cervical adenocarcinoma to the survival status of patients	<i>Zhang Chaihong, Guan Defeng, Yang Yongxiu</i>	280
Original Article; Basic Research		
Effect of overexpression of miR-155 on apoptosis of synovial cells in ankylosing spondylitis and its mechanism	<i>Gou Yuxiao, Wu Xia, Chen Long, et al</i>	285
Expression of tumor-associated macrophage CD163 in breast cancer tissue and its effect on biological characteristics of breast cancer cells	<i>Chen Xin, Zhang Wei, Zhang Weijie, et al</i>	292
Rare Case Report		
Podocytic infolding glomerulopathy: a case report	<i>Zhang Danyang, Wang Shaoting, Hu Xiaozhou, et al</i>	298
Rhabdomyolysis syndrome caused by severe hypokalemia and hypothyroidism: a case report	<i>Lei Yuying, Wang Wei, Li Fang, et al</i>	299
Brucellosis with initial manifestation of ataxia: a case report	<i>Zhao Jingyan, Li Jianjun, Zhang Qiangsheng, et al</i>	301
Review		
Research progress in diagnosis and treatment of uremic cardiomyopathy	<i>Pu Ling, Ding Guohua</i>	302
Research progress of circulating miRNA as potential biomarker for epilepsy diagnosis	<i>Zhao Haiyan, Huang Ying, Li Yongnan</i>	307
Research progress of immune checkpoint inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer	<i>Lu Zilong, Geng Qing</i>	311
The role of local high estrogen in the pathogenesis of endometriosis	<i>Cheng Jiyan, Chen Zhe, Jiang Chunhua, et al</i>	317
Research progress of helicobacter pylori infection and extragastric diseases	<i>Zhang Huayang, Liu Qi</i>	321

MRP8/14 对缺血性心肌病患者心肌存活率的预测价值

王雪, 高珩, 胡佳文, 闫焱, 邓超, 郑小璞

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2019ZDLSF-01-01)

作者单位: 710061 西安交通大学医学院第一附属医院心血管外科

通信作者: 郑小璞, E-mail: zhengxp001@163.com

【摘要】目的 评估血浆髓系相关蛋白(MRP8/14)对心肌梗死后缺血性心肌病患者心肌存活率的预测价值。**方法** 收集 2014 年 6 月—2017 年 4 月西安交通大学医学院第一附属医院心血管外科符合纳入标准的心肌梗死后缺血性心肌病患者 59 例,根据心肌存活率不同分为心肌存活率 > 10% 组($n=27$)和心肌存活率 $\leq 10\%$ 组($n=32$)。收集患者临床指标、生化指标,所有患者均采用超声心动图测定心脏结构、左室收缩和舒张功能, SPECT $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI 和 18F-FDG 心肌双核素显像评估心肌存活率, ELISA 法检测入院 24 h 内空腹静脉血 MRP8/14。采用双变量线性相关分析 MRP8/14 水平与心脏结构、功能及心肌存活率的关系。**结果** 心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 MRP8/14 表达水平显著高于心肌存活率 > 10% 组($t=5.702, P<0.01$), 心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 LVEDD 显著高于心肌存活率 > 10% 组($t=2.217, P<0.05$); MRP8/14 表达水平与心肌存活率呈负相关($r=-0.574, P<0.01$); MRP8/14 预测心肌存活率 ROC 曲线下面积为 0.859, 敏感度为 78.1%, 特异度为 77.8%, 准确率为 78.0%。**结论** MRP8/14 表达水平与心肌存活率存在显著负相关, MRP8/14 表达水平是影响心肌存活率的危险因素, 其有望成为预测心肌存活率的指标之一。

【关键词】 髓系相关蛋白 8/14; 心肌存活率; 缺血性心肌病; 预测价值

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.001

The predictive value of MRP8/14 on myocardial viability in patients with ischemic cardiomyopathy Wang Xue, Gao Heng, Hu Jiawen, Yan Yang, Deng Chao, Zheng Xiaopu. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Zheng Xiaopu, E-mail: zhengxp001@163.com

Fund program: Key R & D Projects of Shaanxi Province(2019ZDLSF-01-01)

【Abstract】Objective To evaluate the predictive value of plasma MRP8 / 14 on myocardial survival in patients with ischemic cardiomyopathy after myocardial infarction. **Methods** From June 2014 to April 2017, 59 patients with ischemic cardiomyopathy after myocardial infarction who met the inclusion criteria in cardiovascular surgery of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College were collected. According to the different myocardial survival rates, the patients were divided into two groups: myocardial survival rate > 10% ($n=27$) and myocardial survival rate $\leq 10\%$ ($n=32$). The clinical and biochemical indexes were collected. Echocardiography was used to determine the structure of the heart, left ventricular systolic and diastolic function. SPECT $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ MIBI and 18F FDG myocardial binucleate imaging were used to evaluate myocardial viability. MRP8 / 14 of fasting venous blood was detected by ELISA within 24 hours after admission. The relationship between the level of MRP8 / 14 and cardiac structure, function and survival rate was analyzed by bivariate linear correlation. **Results** The expression level of MRP8/14 in the group with myocardial survival rate $\leq 10\%$ was significantly higher than that in the group with myocardial survival rate > 10% ($t=5.702, P<0.01$), and the LVEDD in the group with myocardial survival rate $\leq 10\%$ was significantly higher than that in the group with myocardial survival rate > 10% ($t=2.217, P<0.05$). The expression level of MRP8 / 14 was negatively correlated with myocardial survival rate ($r=-0.574, P<0.01$). The area under ROC curve of MRP8 / 14 was 0.859, the sensitivity was 78.1%, the specificity was 77.8%, and the accuracy was 78.0%. **Conclusion** The expression level of MRP8 / 14 has a significant negative correlation with myocardial survival rate. The expression level of MRP8 / 14 is a risk factor affecting myocardial survival rate, which is expected to become one of the indexes for predicting myocardial survival rate.

【Key words】 MRP8/14; Myocardial survival rate; Ischemic cardiomyopathy; Predictive value

血运重建是急性心肌梗死患者的主要治疗方式,然而经血运重建治疗的患者术后会出现不同程度的心室重构、心脏扩大,最终发展为缺血性心肌病,有研究显示,心肌存活率在缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)发生发展中占据重要地位,心肌存活率直接影响患者心室重构,其中最重要的机制为炎症反应^[1-2]。然而存活心肌的判定不能完全量化,且昂贵,操作时间长^[3]。故寻找预测心肌存活率的高特异度和敏感度指标是目前研究热点。髓系相关蛋白(MRP8/14)是由活化的炎症细胞产生的一种细胞因子,在心肌梗死后炎症早期和炎症迁延过程中其表达水平都有明显升高,与冠心病预后有关,能够加速血管损伤^[4-9]。MRP8/14 表达水平与缺血性心肌病患者心肌存活率的关系目前尚未见报道。本研究以缺血性心肌病患者为研究对象,通过检测 MRP8/14、心肌存活率,初步探讨 MRP8/14 与缺血性心肌病患者心肌存活率的关系,以寻找可以预测缺血性心肌病患者心肌存活率的新指标,并为揭示缺血性心肌病发生发展机制提供临床依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2014 年 6 月—2017 年 4 月在西安交通大学第一附属医院心血管外科急性心肌梗死并行血运重建患者,随访 1 年发生缺血性心肌病患者 59 例。入选标准:(1)诊断依据 WHO 缺血性心肌病的诊断标准,ECG 检查符合心肌缺血改变,心脏彩色超声符合左心室射血分数(LVEF) $\leq 50\%$,心肌梗死时间为 1 年,累及范围为广泛前壁;(2)临床表现为左心和/或全心功能不全;(3)女性左室舒张末期内径(LVEDD) > 50 mm,男性 LVEDD > 55 mm。排除标准:急性心肌梗死;其他继发性心肌病;严重肝、肾功能不全;慢性胃肠疾病、肿瘤、自身免疫性疾病;严重感染性疾病。其中男 42 例,女 17 例,平均年龄(65.7 ± 9.4)

岁,根据心肌存活率大小分为心肌存活率 $> 10\%$ 组($n = 27$)和心肌存活率 $\leq 10\%$ 组($n = 32$),本研究已通过西安交通大学第一附属医院伦理委员会审批,患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 研究方法 采用 Philips IE33 型超声诊断仪,应用简化 simpson 法测定 LVEF,应用 M 型超声测量左室舒张末期容积(LVEDV)、左室收缩末期容积(LVESV)、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、心输出量(CO)等心脏结构和功能指标;使用美国 GE 公司 Infinia Vc Hawkeye4 SPECT/CT 显像系统,嘱患者空腹 12 h 以上,SPECT $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MI-BI 和 18F-FDG 心肌双核素显像得出灌注靶心图,计算灌注异常部位占整个左心室的面积百分比,即灌注异常百分比;按同样方法得出代谢靶心图并计算代谢异常百分比;灌注异常百分比与代谢异常百分比相减,即灌注一代代谢不匹配百分比,表示心肌存活率。心肌存活率 = (心肌灌注显像评分 - 存活心肌显像评分) / 心肌灌注显像评分 $\times 100\%$ 。ELISA 法检测血浆中 MRP8/14 浓度,所用试剂购自美国 Sigma 试剂公司。

1.3 统计学方法 所有数据均采用 SPSS26.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的数据用中位数(四分位数)表示,组间比较采用秩和检验。计数资料采用频数或率($\%$)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用线性回归模型评估线性关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较 2 组患者在年龄、吸烟、BMI、糖尿病病史、外周血管病变、LDL-C、TG、TC、hs-CRP 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),心肌存活率 $\leq 10\%$ 组有高血压病史的患者明显高于心肌存活率 $> 10\%$ 组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 2 组患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	心肌存活率 $> 10\%$ 组($n = 27$)	心肌存活率 $\leq 10\%$ 组($n = 32$)	χ^2/t 值	P 值
男[例($\%$)]	18(66.7)	24(75.0)	0.496	0.481
年龄(岁)	66.9 ± 9.5	64.7 ± 9.2	-0.845	0.402
吸烟[例($\%$)]	11(40.7)	14(43.8)	0.054	0.816
BMI(kg/m^2)	24.24 ± 3.24	24.43 ± 4.23	0.180	0.857
高血压病史[例($\%$)]	13(48.1)	24(75.0)	4.515	0.034
糖尿病病史[例($\%$)]	8(29.6)	15(46.9)	1.831	0.176
外周血管病变[例($\%$)]	20(74.1)	25(41.7)	0.133	0.716
LDL-C(mmol/L)	2.08 ± 0.79	2.14 ± 0.98	0.221	0.826
TG(mmol/L)	1.58 ± 0.94	1.44 ± 0.90	-0.562	0.576
TC(mmol/L)	3.81 ± 1.94	3.89 ± 1.48	0.190	0.850
hs-CRP(mg/L)	4.94 ± 3.95	5.40 ± 4.11	0.429	0.669

2.2 2 组心脏结构及功能指标比较 与心肌存活率 $>10\%$ 组相比, 心肌存活率 $\leq 10\%$ 组在 pro-BNP、LVESD、LVEF、CO、LVEDV、LVESV 及室壁运动评分等比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 LVEDD 显著高于心肌存活率 $>10\%$ 组 ($P < 0.05$), 见表 2。

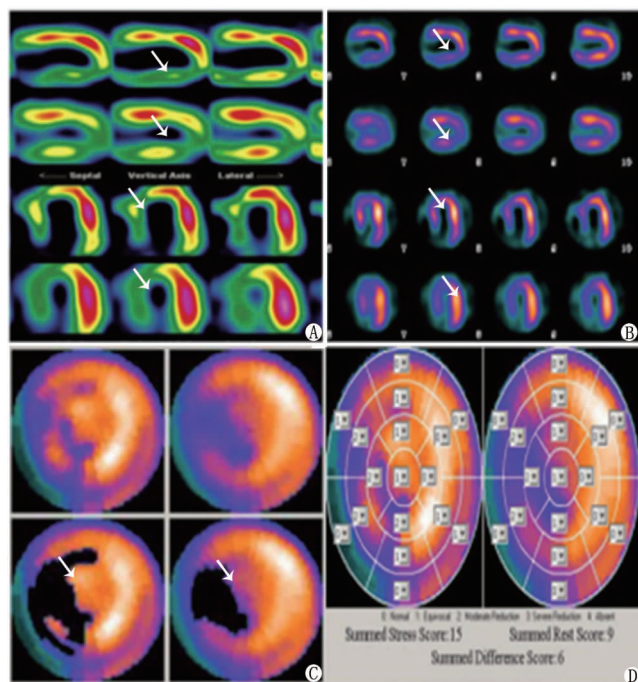
2.3 2 组 MRP8/14 表达水平比较 心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 MRP8/14 表达水平 ($3\ 356.29 \pm 1\ 238.06$) ng/ml, 显著高于心肌存活率 $>10\%$ 组 ($1\ 686.54 \pm 962.15$) ng/ml ($t = 5.702, P < 0.001$)。

2.4 2 组存活心肌比较 心肌存活率 $>10\%$ 组患者静息状态下后壁及后侧壁不显影, 在代谢情况下, 下后壁部分显影, 而后侧壁未见显影, 证明下后壁有存活心肌存在, 后侧壁无存活心肌。提示在静息状态下, 下后壁及后侧壁缺损较多, 在代谢情况下, 下后壁和后侧壁缺损减少, 有所填充, 缺血半定量评分减少 6 分, 进一步说明有存活心肌存在, 见图 1。下后壁及间壁心肌存活率 = $(15 - 9) / 16 \times 100\% = 37.5\%$ (评分法)。心肌存活率 $\leq 10\%$ 组患者静息状态下后壁及间壁不显影, 在代谢情况下, 后壁及间壁不显影, 证明无存活心肌。在静息状态下, 下后壁及间壁缺损较多, 在代谢情况下, 下后壁和间壁缺损较静息更多, 没有填充, 缺血半定量评分增加 4 分, 进一步说明无存活心肌存在, 见图 2。下后壁及间壁心肌存活率 = $(16 - 20) / 46 \times 100\% = -8.6\% < 0$ (评分法)。

2.5 MRP8/14 与心脏结构、功能指标及心肌存活率相关性分析

2.5.1 MRP8/14 与 LVEDD 的相关性分析: MRP8/14 不符合正态分布 (K-S 统计量 = 0.117, $P = 0.043$), LVEDD 不符合正态分布 (K-S 统计量 = 0.089, $P = 0.200$), 利用 Spearman 相关分析, MRP8/14 表达水平和 LVEDD 无相关性 ($r = 0.167, P > 0.05$)。

2.5.2 MRP8/14 与心肌存活率的相关性分析:



注: A. 患者静息状态下后壁及后侧壁不显影; B. 在代谢情况下, 下后壁部分显影, 而后侧壁未见显影, 说明有下后壁存活心肌存在, 后侧壁无存活心肌; C. 在静息状态下, 下后壁及后侧壁缺损较多 (上半部分), 在代谢情况下, 下后壁和后侧壁缺损减少, 有所填充 (箭头所指); D. 缺血半定量评分减少 6 分, 进一步说明有存活心肌存在

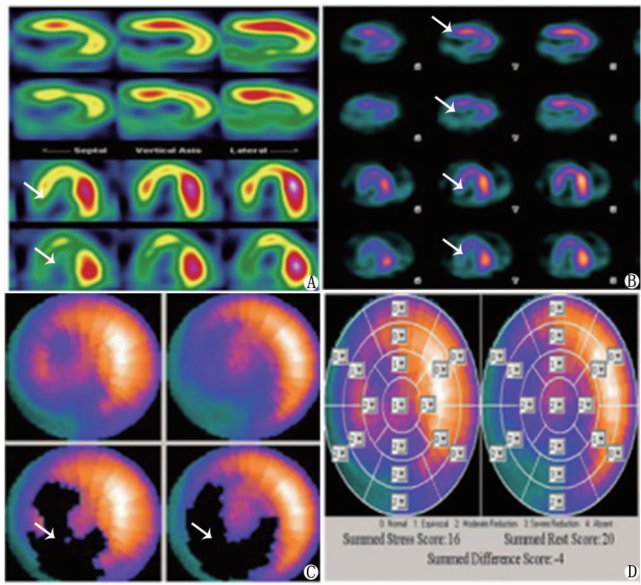
图 1 心肌存活率 $>10\%$ 患者的静息灌注显像及代谢显像

MRP8/14 不符合正态分布, 心肌存活率不符合正态分布 (K-S 统计量 = 0.257, $P = 0.000$), Spearman 相关分析, MRP8/14 表达水平与心肌存活率呈负相关 ($r = -0.574, P < 0.01$), MRP8/14 为心肌存活率的危险因素。

2.5.3 MRP8/14 与高血压病史的相关性分析: MRP8/14 不符合正态分布, 高血压病史为二分类变量, Kendall's 相关分析, MRP8/14 表达水平和高血压病史无相关性 ($r = 0.090, P > 0.05$)。

表 2 2 组患者心脏结构和功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	心肌存活率 $>10\%$ 组 ($n = 27$)	心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 ($n = 32$)	t 值	P 值
pro-BNP (pg/ml)	$2\ 373.81 \pm 2\ 626.95$	$2\ 765.42 \pm 2\ 808.81$	0.549	0.585
LVEDD (mm)	61.51 ± 4.76	65.06 ± 7.06	2.217	0.031
LVESD (mm)	46.81 ± 6.30	50.84 ± 9.62	1.864	0.067
LVEF (%)	40.67 ± 7.62	38.26 ± 9.06	-1.091	0.280
CO (L/min)	5.76 ± 1.75	6.16 ± 1.77	0.866	0.390
LVEDV (ml)	216.67 ± 74.51	210.31 ± 62.33	-0.357	0.723
LVESV (ml)	118.30 ± 57.08	120.08 ± 49.77	0.128	0.899
室壁运动评分 (分)	30.11 ± 6.06	27.41 ± 6.37	-1.661	0.102



注:A. 患者静息状态下后壁及间隔不显影;B. 在代谢情况下,后壁及间隔不显影,证明无存活心肌;C. 在静息状态下,下后壁及间隔缺损较多(上半部分),在代谢情况下,下后壁和间隔缺损较静息更多(箭头所指),没有填充;D. 缺血半定量评分增加 4 分,进一步说明无存活心肌

图 2 心肌存活率 $\leq 10\%$ 患者的静息灌注显像及代谢显像

2.6 MRP8/14 表达水平预测心肌存活率的价值 绘制 ROC 曲线,MRP8/14 水平预测心肌存活率的曲线下面积为 0.859,临界值为 2 603.25 ng/ml, > 临界值时,心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 25 例,心肌存活率 $> 10\%$ 组 6 例;< 临界值时,心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 7 例,心肌存活率 $> 10\%$ 组 21 例;敏感度为 78.1%,特异度为 77.8%,准确率为 78.0%,约登指数为 0.559,阳性预测值为 80.6%,阴性预测值为 75.0%,见图 3。

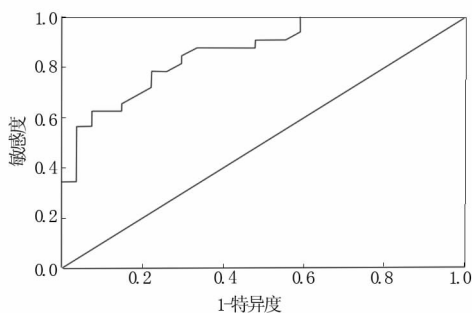


图 3 MRP8/14 预测心肌存活率的 ROC 曲线

3 讨论

缺血性心脏病是全球死亡的主要原因,一项为期 30 年的全球调查统计显示,缺血性心脏病是目前影响寿命最高的因素^[10-12]。在缺血性心脏病患者中,由于

冠状动脉狭窄或闭塞引起冠状动脉微循环灌注减少,微血管内皮缺血,局部受损,外周循环和局部产生白细胞介素、细胞黏附因子及肿瘤坏死因子等炎症因子。研究发现,在缺血性心肌病发生发展过程中,心肌存活率和炎症反应均影响心室重构^[13-15]。

存活心肌包括顿抑心肌及冬眠心肌,存活心肌多少决定了心脏受损程度,可能机制是由于心肌供血不足,氧及营养物质不能正常运输到心肌微循环中进行物质交换,线粒体不能正常进行物质代谢,产生大量炎症物质,加重心脏微循环障碍,促进心室重构^[16-18]。

目前临床上急性心肌梗死患者药物治疗效果不理想,血运重建是较好的治疗手段,然而血运重建治疗取决于存活心肌的量,心肌存活量越大,获益越大,但临床上评估心肌存活率价格昂贵,耗时较长,无量化指标,寻找一个简单、精确、与心肌存活率相关性较好的指标是当前的研究热点及重点^[19-20]。

MRP8/14 是近年来发现的一种新的炎症因子或促炎性因子,属于钙结合蛋白,参与炎症反应,被认为具有良好的临床应用前景。MRP8/14 主要来源于中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞,具有多种生物学功能,如抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、调节免疫、参与炎症反应等,在许多急慢性炎症性疾病中发现其表达水平明显升高。目前国内外对 MRP8/14 的研究逐渐从肠道延伸至心血管系统,在动脉粥样硬化患者中,MRP8/14 分布于动脉粥样硬化(AS)斑块中,周围伴有巨噬细胞等炎症细胞。研究还发现易损斑块 MRP8/14 蛋白水平明显高于稳定斑块,可作为动脉粥样斑块稳定性的判定物,能够加重动脉粥样硬化血管损伤,与冠心病预后有一定关系^[21],机制可能为 MRP8/14 与 TLR4 和 RAGE 结合,触发 MyD88 介导的 TLR4 信号,导致 NF- κ B 的活化和促炎性因子如 TNF- α 和 IL-17 的分泌,也可促进血管内皮细胞分泌 IL、细胞间黏附分子(ICAM)、血管细胞黏附分子(VCAM)及单核细胞趋化蛋白(MCP)等细胞因子表达,加速动脉粥样硬化的形成,导致心肌功能障碍及缺血后心室重构。

本研究探讨 MRP8/14 表达水平与存活心肌的关系。结果发现心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 MRP8/14 表达水平显著高于心肌存活率 $> 10\%$ 组($P < 0.01$),心肌存活率 $\leq 10\%$ 组 LVEDD 显著高于心肌存活率 $> 10\%$ 组($P < 0.05$)。进一步对缺血性心肌病组的心肌存活率与 MRP8/14 表达水平进行相关性分析,MRP8/14 表达水平与心肌存活率呈负相关($r = -0.574, P < 0.01$)。MRP8/14 和心肌存活率 ROC 曲线显示,ROC 曲线下面积为 0.859,MRP8/14 预测心肌存活率的敏

敏感度为 78.1%, 特异度为 77.8%, 准确率为 78.0%, 进一步说明 MRP8/14 可预测心肌存活率。故本研究认为 MRP8/14 在缺血性心肌病患者中高表达, MRP8/14 表达水平与心肌存活率呈显著负相关, MRP8/14 表达水平是影响心肌存活率的危险因素, 提示 MRP8/14 有望成为预测心肌存活率的指标之一, 可能机制为通过炎症反应, 加重动脉粥样硬化血管损伤, 加速受损心肌的坏死及凋亡, 从而降低心肌存活率。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

王雪: 统计分析, 论文撰写; 高珩: 统计分析, 修改论文; 胡佳文、邓超: 实施研究过程, 资料搜集整理; 闫场: 课题设计, 论文修改; 郑小璞: 提出研究思路, 分析试验数据, 论文修改

参考文献

- [1] Echavarría-Pinto M, van de Hoef TP, Nijjer S, et al. Influence of the amount of myocardium subtended to a coronary stenosis on the index of microcirculatory resistance. Implications for the invasive assessment of microcirculatory function in ischaemic heart disease[J]. *Euro Intervention*, 2017, 13(8): 944-952. DOI: 10.4244/EIJ-D-16-00525.
- [2] Stujanna EN, Murakoshi N, Tajiri K, et al. Rev-erb agonist improves adverse cardiac remodeling and survival in myocardial infarction through an anti-inflammatory mechanism[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189330. DOI: 10.1371/journal.pone.0189330.
- [3] Greene SJ, Vaduganathan M, Gheorghiade M. Finding the road to recovery: Therapeutic and clinical trial implications of dysfunctional viable myocardium in heart failure with reduced ejection fraction[J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(7): 870-872. DOI: 10.1002/ehf.842.
- [4] Jonasson L, Grauen LH, Lundberg AK, et al. Stress-induced release of the S100A8/A9 alarmin is elevated in coronary artery disease patients with impaired cortisol response[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17545. DOI: 10.1038/s41598-017-17586-6.
- [5] Shi S, Yi JL. S100A8/A9 promotes MMP-9 expression in the fibroblasts from cardiac rupture after myocardial infarction by inducing macrophages secreting TNF α [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3925-3935. DOI: 10.26355/eurrev_201806_15278.
- [6] 杨小芹, 李杏, 白永坤, 等. MRP8、MRP14 及 MRP8/14 促进体外培养的小鼠骨髓来源树突状细胞的表型成熟[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(7): 627-631. DOI: 10.13423/j.cnki.cjemi.008655.
- [7] 黄林, 杨晨, 梁婕, 等. NF- κ B 介导 MRP8/14 诱导的人肺泡上皮 A549 细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(4): 701-706. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2016.04.020.
- [8] 王娟, 陈小欢, 李磊, 等. p38 MAPK 在 MRP8/14 诱导小鼠胚胎成纤维细胞凋亡中的作用[J]. *山东医药*, 2017, 57(28): 28-32.

- DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2017.28.008.
- [9] 杨晨, 王俊, 黄林, 等. 咯利普兰通过 NF- κ B 抑制 MRP8/14 在 RAW264.7 细胞中促炎性因子的释放[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(6): 1098-1103. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.06.023.
- [10] Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, et al. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: The global burden of disease 2010 study [J]. *Circulation*, 2014, 129(14): 1493-1501. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004046.
- [11] 袁桂莉, 郭继忠, 要彤, 等. 和肽素及 Tei 指数诊断急性心肌梗死后心力衰竭的临床价值[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(6): 545-548. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.06.002
- [12] 韩娟萍, 张卫泽, 林丽霞, 等. 前列地尔对急性 ST 段抬高型心肌梗死 PCI 术后心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(7): 657-660. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.07.003
- [13] Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction [J]. *Circ J*, 2017, 81(8): 1174-1182. DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0949.
- [14] 郝萌, 周蓉, 任延平. 心理应激与传统压力应激诱发稳定型冠状动脉粥样硬化性心脏病心肌缺血的发生率及性别差异的 Meta 分析[J]. *中国医药*, 2019, 14(9): 1289-1293. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2019.09.003
- [15] 陈要起, 穆金兴, 陈洪波, 等. 冠状动脉内应用伐伐卢定对急性非 ST 段抬高型心肌梗死高危患者早期 PCI 术预后的影响[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(8): 765-769, 774. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.08.003
- [16] Kwon DH, Obuchowski NA, Marwick TH, et al. Jeopardized myocardium defined by late gadolinium enhancement magnetic resonance imaging predicts survival in patients with ischemic cardiomyopathy: Impact of revascularization[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(22): e009394. DOI: 10.1161/JAHA.118.009394.
- [17] De Kleijn DPV, Chong SY, Wang X, et al. Toll-like receptor 7 deficiency promotes survival and reduces adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(12): 1791-1803. DOI: 10.1093/cvr/cvz057.
- [18] Soares LL, Drummond FR, Rezende LMT, et al. Voluntary running counteracts right ventricular adverse remodeling and myocyte contraction impairment in pulmonary arterial hypertension model [J]. *Life Sci*, 2019, 238: 116974. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116974.
- [19] 李文远, 李维, 冷燕, 等. lncRNA 与糖尿病心肌缺血再灌注关系的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(22): 50-53.
- [20] 张英, 王亚柱, 张皓然, 等. 心肌缺血再灌注损伤不同表现形式的临床研究[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(23): 64-68.
- [21] 汪彪, 卓柳安, 陈宇, 等. 急性冠状动脉综合征患者髓样相关蛋白 8/14 水平及其临床意义[J]. *广西医学*, 2018, 40(16): 1818-1820. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2018.16.13.

(收稿日期: 2019-09-26)

膈下逐瘀汤联合替罗非班对急性心肌梗死患者 PCI 术后高凝状态及超声心动图参数的影响

史亮, 原斌, 蔡晓庆, 张鹏

基金项目: 陆军军医大学第一附属医院课题(2017MPRC-03005)

作者单位: 730000 兰州, 中国人民解放军联勤保障部队 940 医院心血管内科

通信作者: 史亮, E-mail: zczhlwfb@126.com

【摘要】目的 探讨膈下逐瘀汤联合替罗非班对急性心肌梗死(AMI)患者经皮冠状动脉介入(PCI)术后高凝状态及超声心动图参数的影响。**方法** 选取 2017 年 6 月—2019 年 6 月中国人民解放军联勤保障部队 940 医院心血管内科 AMI 患者 129 例,按照随机数字表法分为 3 组各 43 例。3 组均行 PCI 术,常规治疗基础上,对照 A 组给予替罗非班,对照 B 组给予膈下逐瘀汤,联合组给予膈下逐瘀汤 + 替罗非班。比较 3 组疗效,治疗前后超声心动图参数[舒张早期/舒张晚期最大血流速度(E/A)、左心室射血分数(LVEF)、左室收缩末期内径(LVESD)]、高凝状态指标[凝固时间(K)、凝血综合指数(CI)、最大血块强度(MA)]、血清炎症因子指标[血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)、高迁移率蛋白 1(HMGB1)、白介素-6(IL-6)]水平。记录近期心血管不良事件(MACE)发生率、不良反应发生率。**结果** 联合组治疗总有效率为 93.02%,高于对照 A 组 67.44%、对照 B 组 69.77% ($\chi^2 = 9.642, P = 0.008$);治疗后联合组 LVEF、E/A 高于对照 A 组、对照 B 组,LVESD 小于对照 A 组、对照 B 组 ($F = 13.987, 5.958, 166.954, P$ 均 < 0.01);治疗后联合组 K 水平高于对照 A 组、对照 B 组,CI、MA 水平低于对照 A 组、对照 B 组 ($F = 88.549, 12.121, 24.354, P$ 均 $= 0.000$);治疗后联合组血清 sVCAM-1、HMGB1、IL-6 水平低于对照 A 组、对照 B 组 ($F = 4.513, 30.506, 176.672, P$ 均 < 0.05);联合组治疗期间 MACE 发生率 4.65%,与对照 A 组 13.96%、对照 B 组 6.98% 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);联合组不良反应发生率 16.28%,与对照 A 组 11.63%、对照 B 组 4.65% 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 膈下逐瘀汤联合替罗非班应用于 AMI 患者 PCI 术后,可减轻炎症反应,纠正高凝状态,改善超声心动图参数,提高治疗效果,且安全性较高。

【关键词】 心肌梗死,急性;经皮冠状动脉介入术;替罗非班;膈下逐瘀汤;高凝状态;超声心动图

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.002

Effect of Gexiazhu decoction combined with tirofiban on hypercoagulability and echocardiographic parameters in patients with acute myocardial infarction after PCI Shi Liang, Yuan Bin, Cai Xiaoqing, Zhang Peng. Department of Cardiovascular Medicine, 940 Hospital of The Joint Service Support Force of the Chinese people's Liberation Army, Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Shi Liang, E-mail: zczhlwfb@126.com

Fund program: Project of the First Affiliated Hospital of Army Medical University (2017MPRC-03005)

【Abstract】Objective To explore the effect of Gexiazhu decoction combined with tirofiban on hypercoagulability and echocardiographic parameters in patients with acute myocardial infarction (AMI) after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** From June 2017 to June 2019, 129 patients with AMI in Cardiovascular Department of the 940 Hospital of the Joint Service Support Force of the People's Liberation Army were selected. According to the random number table, 43 cases were divided into three groups. Based on routine treatment, tirofiban was given to control group A. Control group B was given Gexiazhu decoction. The combined group was given Gexiazhu decoction + tirofiban. Before and after treatment, echocardiographic parameters (E/A, LVEF, LVESD), hypercoagulable state index (K, CI, MA) and serum inflammatory factor index (vascular cell adhesion molecule) were compared 1 (sVCAM-1), HMGB1, IL-6. The incidence of recent adverse cardiovascular events (MACE) and adverse reactions were recorded. **Results** The total effective rate of the combined group was 93.02%, higher than 67.44% of the control group A and 69.77% of the control group B ($\chi^2 = 9.642, P = 0.008$). After treatment, LVEF and E/A of the combined group were higher than those of the control group A and B, and

LVEDD was lower than those of the control group A and B ($F=13.987$, $F=5.958$, $F=166.954$, $P<0.01$). After treatment, the K level of the combined group was higher than that of the control group A and B, and the CI and MA levels were lower than that of the control group A and B ($F=88.549$, $F=12.121$, $F=24.354$, $P=0.000$). After treatment, the serum levels of sVCAM-1, HMGB1 and IL-6 in the combined group were lower than those in the control group A and B ($F=4.513$, $F=30.506$, $F=176.672$, $P<0.05$). The incidence of mace in the combined group was 4.65%, compared with 13.96% in group A and 6.98% in group B, there was no significant difference ($P>0.05$). The incidence of adverse reactions in the combined group was 16.28%, compared with 11.63% in the control group A and 4.65% in the control group B, there was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** The combination of *Gexiazhuyu* decoction and tirofiban can reduce the inflammatory reaction, correct the hypercoagulable state, improve the parameters of echocardiography, improve the therapeutic effect, and have high safety.

【Key words】 Myocardial infarction acute; PCI; Tirofiban; *Gexiazhuyu* decoction; Hypercoagulable state; Echocardiogram

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的治疗主要依赖于经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 术, 其能快速开通闭塞血管, 恢复血流灌注, 控制临床症状, 促进预后改善, 但手术会破坏血管内皮, 暴露粥样硬化斑块, 激活凝血系统, 再次形成血栓, 阻塞血管^[1-2]。替罗非班作为血小板糖蛋白 (GP) II b/III a 拮抗剂, 可抑制血栓形成, 改善患者高凝状态, 恢复缺血再灌注^[3]。随着中医对 AMI 研究的不断深入, 中西医结合治疗成为当前研究热点。中医学认为, AMI 是由饮食不节、思虑过度、外邪侵袭、劳逸失度、脏腑虚弱引起的气滞、热结、血瘀、寒凝、痰饮, 治疗当以化瘀止痛、行气活血为主。膈下逐瘀汤出自《医林改错》, 具有破症消结、活血逐瘀之功, 主治血瘀气滞病症。相关研究指出, 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1)、血管细胞黏附分子-1 (sVCAM-1) 等炎症因子可促进血小板聚集, 增加血液黏稠度, 加重心肌缺血再灌注^[4-5]。鉴于此, 本研究选取 129 例 AMI 行 PCI 术后患者, 从炎症因子、高凝状态及超声心动图参数方面, 探讨替罗非班联合膈下逐瘀汤的疗效, 报道

如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 6 月—2019 年 6 月中国人民解放军联勤保障部队 940 医院心血管内科收治的 AMI 患者 129 例, 按照随机数字表法, 分为对照 A 组、对照 B 组、联合组各 43 例。3 组性别、年龄、梗死部位、合并疾病、美国纽约心脏病学会 (NYHA) 分级、吸烟史等资料比较差异无统计学意义, 具有可比性 ($P>0.05$), 见表 1。本研究经医院伦理委员会审核批准, 患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准: ①西医标准符合《内科学》第 8 版诊断标准^[6]; 发病至治疗时间不足 12 h, 胸痛时间超过 30 min, 心电图检查结果显示 2 个导联 ST 段抬高, 肌酸激酶同工酶 (CK-MB) >26 mmol/L; ②中医标准符合《中医病证诊断疗效标准》诊断标准^[7]: 主症, 胸部绞痛、刺痛、憋闷; 次症, 面色苍白、倦怠少言、头晕乏力、心悸气短; 舌脉, 舌淡紫、脉细涩; ③具备明确 PCI 术指征; ④18 岁 $\leq$ 年龄 $\leq$ 70 岁; ⑤NYHA 分级 II ~ IV 级。(2) 排除标准: ①凝血功能异常; ②对研

表 1 3 组临床资料比较 [例(%)]

临床资料		对照 A 组 (n = 43)	对照 B 组 (n = 43)	联合组 (n = 43)	F/χ ² /U 值	P 值
男/女(例)		21/22	23/20	25/18	0.747	0.688
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)		44.47 ± 9.75	44.02 ± 10.12	43.51 ± 10.88	0.094	0.910
梗死部位	前间壁	14(32.56)	11(25.58)	10(23.26)	9.334	0.053
	下壁	9(20.93)	11(25.58)	7(16.28)		
	前壁	20(46.51)	21(48.84)	26(60.46)		
合并疾病	糖尿病	11(25.58)	15(34.88)	12(27.91)	0.970	0.616
	高血压	13(30.23)	16(37.21)	14(32.56)	0.488	0.783
NYHA 分级	Ⅱ	15(34.88)	11(25.58)	11(25.58)	2.114	0.550
	Ⅲ	21(48.84)	24(55.81)	22(51.16)		
	Ⅳ	7(16.28)	8(18.61)	10(23.26)		
吸烟史		20(46.51)	19(44.19)	18(41.86)	0.189	0.910

究药物不耐受;③肝、肾等脏器功能不全;④伴出血史;⑤近 3 个月接受抗血栓治疗;⑥精神疾病;⑦原发性血小板计数减少;⑧未完成研究。

1.3 治疗方法 3 组均行 PCI 术,术后给予抗血小板聚集、抗凝、吸氧、纠正酸碱及水电解质失衡、利尿等常规治疗。术后当天,对照 A 组给予替罗非班(武汉武药制药有限公司),静脉注射 10 μg/kg,随后以 0.15 μg·kg⁻¹·min⁻¹速度持续静脉滴注 36 h。对照 B 组给予膈下逐瘀汤,组方:赤芍 15 g,香附 15 g,牡丹皮 15 g,延胡索 15 g,川芎 15 g,当归 15 g,乌药 15 g,枳壳 10 g,桃仁 10 g,五灵脂 10 g,红花 10 g,甘草 5 g。于医院煎药室煎煮,取上述药物放入 1 000 ml 冷水中煎煮,取汁 450 ml,150 ml/次,3 次/d,治疗时间为 4 周。联合组给予膈下逐瘀汤+替罗非班,膈下逐瘀汤用法用量同对照 B 组,替罗非班用法用量同对照 A 组。

1.4 观察指标与方法 (1)超声心动图参数指标检测:3 组治疗前、治疗 4 周后应用 PihpsSo-nos5500 型彩色超声心动图检测舒张早期/舒张晚期最大血流速度(E/A)、左心室射血分数(LVEF)、左室收缩末期内径(LVESD)。(2)最大血块强度(MA)、凝固时间(K)、凝血综合指数(CI)测定:3 组治疗前、治疗 4 周后清晨,抽取空腹肘静脉血 4 ml,分为 2 份,各 2 ml,1 份行肝素抗凝处理,选用美国血液技术公司生产 TEG5000 血栓弹力仪自动记录血栓弹力图,当检测出血栓最大幅度值后继续描记 30 min 后结束,获取 MA、K、CI。(3)血清 HMGB1、sVCAM-1、IL-6 水平检测:上述另 1 份血液样本行离心处理,3 000 r/min,离心 10 min,取上清液,保存于-70℃冰箱。以酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 sVCAM-1、HMGB1、白介素-6(IL-6)水平。试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司,参照试剂盒说明书操作。(4)记录 3 组不良反应发生率,包括恶心、头痛、出血等。(5)记录 3 组治疗期间

主要心血管不良事件(MACE)发生率,包含心律失常、心力衰竭、心绞痛等。

1.5 疗效评定标准 参照《中医病证诊断疗效标准》对治疗前后胸痛、气短、心悸等中医证候进行评分,根据严重程度分级,0 分为正常,2 分为轻度,4 分为中度;6 分为重度,上述症状得分相加为每个患者中医证候积分。疗效指数=(治疗前分值-治疗后分值)/治疗前分值×100%。疗效指数≥70%为显效,疗效指数 30%~69%为有效,疗效指数≤29%为无效,总有效率=(显效+有效)/总例数×100%。

1.6 统计学方法 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析。正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验;计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验;等级资料的比较采用秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组疗效比较 治疗 4 周后联合组治疗总有效率为 93.02%,高于对照 A 组的 67.44%和对照 B 组的 69.77%(*P*<0.01),见表 2。

表 2 3 组患者疗效指数比较 [例(%)]

组别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)
对照 A 组	43	10(23.26)	19(44.18)	14(32.56)	67.44
对照 B 组	43	9(20.93)	21(48.84)	13(30.23)	69.77
联合组	43	18(41.86)	22(51.16)	3(6.98)	93.02
<i>U</i> / χ^2 值			<i>U</i> =9.132		χ^2 =9.642
<i>P</i> 值			0.027		0.008

2.2 3 组超声心动图参数指标比较 治疗前 3 组 LVEF、E/A、LVESD 比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),治疗后联合组 LVEF、E/A 高于对照 A 组、对照 B 组,LVESD 低于对照 A 组、对照 B 组(*P*<0.01),见表 3。

表 3 3 组患者超声心动图参数指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	LVEF(%)	E/A	LVESD(mm)
对照 A 组 (<i>n</i> =43)	治疗前	41.02±5.39	0.85±0.38	51.23±1.97
	治疗后	48.35±6.62	0.95±0.44	47.35±1.22
对照 B 组 (<i>n</i> =43)	治疗前	40.54±5.83	0.89±0.34	52.01±1.05
	治疗后	49.56±6.85	1.03±0.48	44.18±1.34
联合组 (<i>n</i> =43)	治疗前	40.13±6.15	0.87±0.36	51.72±1.42
	治疗后	55.22±5.77	1.29±0.51	42.71±1.03
<i>t</i> / <i>P</i> 对照 A 组内值		5.631/0.000	1.128/0.263	10.980/0.000
<i>t</i> / <i>P</i> 对照 B 组内值		6.576/0.000	1.561/0.122	30.161/0.000
<i>t</i> / <i>P</i> 联合组内值		11.734/0.000	4.412/0.000	33.680/0.000
<i>F</i> / <i>P</i> 治疗后组间值		13.987/0.000	5.958/0.003	166.954/0.000

2.3 3 组高凝状态指标比较 治疗前 3 组 K、CI、MA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后联合组 K 水平高于对照 A 组、对照 B 组,CI、MA 水平低于对照 A 组、对照 B 组($P<0.01$),见表 4。

2.4 3 组血清炎性因子指标比较 治疗前 3 组血清 sVCAM-1、HMGB1、IL-6 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),治疗后 3 组血清 sVCAM-1、HMGB1、IL-6 水平均较治疗前降低,且联合组低于对照 A 组、对照 B 组($P<0.01$),见表 5。

2.5 3 组治疗期间 MACE 发生率比较 联合组治疗期间 MACE 发生率为 4.65%,与对照 A 组 13.96%、对照 B 组 6.98% 比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.584, P>0.05$),见表 6。

表 6 3 组患者近期 MACE 发生率比较 [例(%)]

组 别	例数	心力衰竭	心律失常	心绞痛	总发生率(%)
对照 A 组	43	1(2.33)	3(6.98)	2(4.65)	13.96
对照 B 组	43	1(2.33)	2(4.65)	0	6.98
联合组	43	0	2(4.65)	0	4.65

2.6 3 组不良反应发生率比较 联合组不良反应发生率为 16.28%,与对照 A 组 11.63%、对照 B 组

4.65% 比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.045, P>0.05$),见表 7。

表 7 3 组患者不良反应比较 [例(%)]

组 别	例数	恶心	头痛	出血	总发生率(%)
对照 A 组	43	2(4.65)	1(2.33)	2(4.65)	11.63
对照 B 组	43	0	2(4.65)	0	4.65
联合组	43	3(6.98)	2(4.65)	2(4.65)	16.28

3 讨 论

随介入治疗技术不断发展与改进,PCI 术已成为临床治疗 AMI 主要手段,能快速恢复心肌组织细胞血液灌注,预防心功能进一步受损,然而球囊、支架植入会诱发炎症反应,致使冠状动脉血小板黏附、聚集,形成新的血栓,再次阻塞血管^[8-10]。因此,加强 AMI 患者 PCI 术后抗炎及抗血小板活性治疗,对提高手术效果,改善患者生存质量意义重大^[11-13]。

替罗非班为临床常用抗血小板药物,可抑制血小板糖蛋白 II b/III a 受体结合纤维蛋白原,阻碍血小板与受损内皮细胞黏附,发挥抗血小板作用^[14]。大量研究证实,PCI 术后应用替罗非班,能有效恢复心肌灌注,抑制血小板聚集,预防血栓形成^[15-16]。但单纯西

表 4 3 组患者高凝状态指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	K(min)	CI	MA(mm)
对照 A 组 (n=43)	治疗前	1.78 ± 0.30	2.51 ± 0.50	81.61 ± 11.68
	治疗后	2.23 ± 0.54	1.55 ± 0.69	74.03 ± 7.15
对照 B 组 (n=43)	治疗前	1.76 ± 0.33	2.58 ± 0.43	79.02 ± 12.44
	治疗后	2.99 ± 0.47	1.34 ± 0.41	70.24 ± 7.03
联合组 (n=43)	治疗前	1.74 ± 0.35	2.55 ± 0.44	80.84 ± 13.11
	治疗后	3.44 ± 0.18	1.01 ± 0.38	63.56 ± 6.95
t/P 对照 A 组内值		4.777/0.000	7.387/0.000	3.630/0.000
t/P 对照 B 组内值		14.045/0.000	13.686/0.000	4.030/0.000
t/P 联合组内值		28.324/0.000	17.370/0.000	7.636/0.000
F/P 治疗后组间值		88.549/0.000	12.121/0.000	24.354/0.000

表 5 3 组患者血清炎性因子指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	sVCAM-1(μg/L)	HMGB1(μg/L)	IL-6(ng/L)
对照 A 组 (n=43)	治疗前	685.68 ± 92.34	142.51 ± 10.96	7.99 ± 1.30
	治疗后	488.13 ± 83.29	125.58 ± 12.38	5.89 ± 0.78
对照 B 组 (n=43)	治疗前	688.12 ± 89.91	141.38 ± 11.52	8.05 ± 1.24
	治疗后	479.27 ± 86.82	116.05 ± 11.71	4.57 ± 0.59
联合组 (n=43)	治疗前	687.35 ± 90.44	140.99 ± 12.84	8.02 ± 1.27
	治疗后	436.45 ± 85.61	106.23 ± 10.27	3.18 ± 0.62
t/P 联合组内值		13.211/0.000	13.863/0.000	22.457/0.000
t/P 对照 A 组内值		10.417/0.000	6.714/0.000	9.083/0.000
t/P 对照 B 组内值		10.957/0.000	10.112/0.000	16.618/0.000
F/P 治疗后组间值		4.513/0.013	30.506/0.000	176.672/0.000

药治疗效果有限,需联合多种作用机制不同药物。中西结合治疗 AMI 近年来取得较大进展,现已成为当前研究重点。AMI 属中医学“真心痛”范畴,最早记录于《灵枢·厥痛》:“其痛甚,但在心,手足青者,即名真心痛,旦发夕死,夕发旦死。”其病理病机是气病而致瘀,亦即气虚血瘀及气滞血瘀。而 PCI 术后多为邪实未去,正气已虚,营卫失调,外邪直中经络,脉络瘀阻,气机郁滞,致水运乏权,血行失畅,从而加剧病情进展。因此,中医提出以通络止痛、益气养阴等法治之。膈下逐瘀汤中红花、桃仁活血祛瘀,共为君药;枳壳、香附理气止痛,五灵脂、当归活血化瘀,为臣药,使气行血活,瘀散痛止,佐以赤芍、牡丹皮发挥清热活血、凉血散瘀功效;乌药、延胡索、川芎祛瘀止痛、行气活血,特别是川芎,不仅具有养血活血功效,更能行血中之气,增强逐瘀之功;甘草为使药,能缓和诸药峻猛之性,并扶助中气,全方以行气、活血祛瘀药物居多,能更好发挥活血逐瘀、破症消结之功。在此背景下,本研究尝试将膈下逐瘀汤和替罗非班联合应用于 PCI 术后 AMI 患者,结果发现,联合组治疗总有效率高于对照 A 组、对照 B 组($P < 0.01$),治疗后联合组 LVEF、E/A 高于对照 A 组、对照 B 组,LVESD 小于对照 A 组、对照 B 组($P < 0.01$),说明替罗非班联合膈下逐瘀汤具有协同效应,能有效抑制血小板聚集,恢复冠状动脉血流,减轻心肌再灌注损伤,逆转心肌重塑,改善心功能,提高治疗效果,且具有较高安全性。

AMI 发生后,促凝因素占主导,纤溶系统功能较弱,机体呈现高凝状态^[17-18]。PCI 术治疗后,局部形成大量凝血酶,可刺激血小板,激活凝血系统,导致机体凝血纤溶失衡^[19-20]。血栓弹力仪可检测凝血至纤溶全过程,是当前诊断机体高凝状态的重要手段。其主要参数 K 为血细胞凝集成块形成时间,提示凝血动力状态;CI 主要反映不同条件下整个凝血过程综合状态;MA 反映已形成凝块最大硬度及强度^[21]。文献报道,当血液凝固性降低时,MA 值减小,K 值增加,反之血液凝固性增高^[22]。本研究数据显示,治疗后联合组 K 水平高于对照 A 组、对照 B 组,CI、MA 水平低于对照 A 组、对照 B 组($P < 0.01$),可见替罗非班与膈下逐瘀汤联合应用抗凝血效果更理想。可能机制为替罗非班能预防血小板聚集所致远端栓塞,改善微循环障碍,纠正凝血状态;现代药理研究提示,五灵脂可减少心肌耗氧量,降低血管阻力,强化纤溶蛋白溶解作用;红花可通过抑制血小板聚集、降低全血黏度、促进纤溶蛋白溶解等途径发挥抗凝作用。因此联合应用可进一步促进病情改善。

PCI 术属于有创操作,对机体损伤较大,可通过刺激氧化应激产物促使炎性因子表达,导致病情进一步恶化^[23-24]。IL-6 是参与免疫反应、炎性反应的多效性细胞因子,其水平变化与血栓形成、动脉硬化有关^[25-26]。sVCAM-1 由活化内皮细胞合成分泌,当血管内皮出现炎性反应时,其可诱导单核细胞、中性粒细胞生成,加剧血管损伤,促使病情发展^[27]。黄勇等^[28]报道,sVCAM-1 水平随 AMI 患者 Killip 心功能分级升高而升高。HMGB1 为脱氧核糖核酸结合蛋白,郑海军等^[29]研究发现,HMGB1 在 AMI 患者 PCI 术后呈高表达。推测原因为,PCI 术需植入支架,可破坏血管内皮,导致 HMGB1 释放入血。而 HMGB1 通过多种途径介导炎性介质分泌,刺激细胞外基质蛋白沉积,参与血管重构,加剧血管内皮损伤,增加 MACE 发生风险。本研究发现,治疗后联合组血清 sVCAM-1、HMGB1、IL-6 水平低于对照 A 组、对照 B 组($P < 0.05$)。替罗非班可抑制血小板糖蛋白 IIb/IIIa 受体介导的信号通路活化,减轻血管炎性反应;现代药理研究提示膈下逐瘀汤中红花、川芎、五灵脂均具有抗炎作用,当归有效成分为正丁烯内酯及苯内酯,可通过增强机体免疫功能发挥抗炎作用。联合应用可产生协同抗炎作用,降低血清 sVCAM-1、HMGB1、IL-6 水平,加快疾病转归。

另有研究指出,PCI 术后 MACE 发生风险与血管内皮功能损伤、炎性因子水平升高密切相关^[30]。本研究显示,联合组近期 MACE 发生率低于对照 A 组、对照 B 组,推测原因与替罗非班联合膈下逐瘀汤能减轻血管内皮损伤,降低炎性反应有关,但 3 组近期 MACE 发生率比较,差异无统计学意义,可能与本研究样本量小有关,尚需临床多中心、多渠道选取样本,扩大样本量进行研究证实。

综上所述,膈下逐瘀汤联合替罗非班应用于 AMI 患者 PCI 术后,可减轻炎性反应,纠正高凝状态,改善超声心动图参数,提高治疗效果,且安全性较高。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

史亮:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;原斌:设计研究思路,分析试验数据,审核论文;蔡晓庆:实施研究过程,整理收集资料;张鹏:进行统计学分析

参考文献

- [1] Reddy K, Khaliq A, Henning RJ, et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction[J]. World J Cardiol, 2015, 7(5): 243-276. DOI:10.4330/wjc.v7.i5.243.
- [2] 郭华,王佟,孙笑眉,等.替罗非班冠状动脉给药对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者介入治疗的临床疗效及外周血内 PMPs 水平的影响[J].中国药物警戒,2017,14(3):145-149. DOI:10.3969/

- j. issn. 1672-8629. 2017. 03. 005.
- [3] 张辉,卜令同,吴桥,等.替罗非班联合血栓抽吸对 ST 段抬高型心肌梗死患者直接经皮冠状动脉介入治疗术后冠状动脉再灌注及心功能的影响研究[J].实用心脑血管病杂志,2017,25(3):24-27. DOI:10.3969/j.issn.1008-5971.2017.03.006.
- [4] 蒋莎莎,尹楠,陆振宇,等.护理干预联合法舒地尔对急性脑梗死患者血清 HMGB1 与 S100B 表达的影响[J].河北医药,2018,40(22):3512-3514,3518. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2018.22.041.
- [5] 文贵斌.高压氧治疗对急性脑梗死患者血清细胞因子、血管新生以及脑血流灌注的影响[J].海南医学院学报,2017,23(10):1427-1430. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170511.021.
- [6] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:236-242.
- [7] 国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[M].北京:中国医药科技出版社,2015:29-30.
- [8] Abazid RM,Obadah Kattea M,Smettei OA,et al. Impact of coronary artery calcification on percutaneous coronary intervention and post-procedural complications[J]. J Saudi Heart Assoc,2017,29(1):15-22. DOI:10.1016/j.jsha.2016.05.002.
- [9] 李春华,徐萍.行经皮冠状动脉介入术的急性心肌梗死患者的围术期护理[J].中国医科大学学报,2017,46(2):181-183. DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2017.02.021.
- [10] 杜海燕,包秋红,皇甫卫忠,等.急性心肌梗死后心室重构患者 CysC、ANGPTL4 水平与心功能的关系及其影响因素分析[J].疑难病杂志,2019,18(12):1189-1194. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.12.001.
- [11] 韩娟萍,张卫泽,林丽霞,等.前列地尔对急性 ST 段抬高型心肌梗死 PCI 术后心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].疑难病杂志,2019,18(7):657-660. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.07.003.
- [12] 王新国,叶明,祖晓麟,等.经微导管注射硝酸甘油治疗急性 ST 段抬高型心肌梗死患者冠状动脉无复流的效果观察[J].中国医药,2019,14(10):1454-1457. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2019.10.004.
- [13] 袁晓红,李鹏,刘军辉.急性心肌梗死患者血清 EMPs、hs-CRP 变化及临床意义[J].中国医药导报,2019,16(22):170-173.
- [14] 李景瑞,李宇婷.PCI 术前应用替罗非班对急性心肌梗死患者相关指标的影响[J].中国药房,2017,28(20):2823-2826. DOI:10.6039/j.issn.1001-0408.2017.20.25.
- [15] 孙朝阳,李毅,刘莎,等.替罗非班给药方式对急性 ST 段抬高型心肌梗死 PCI 术后心功能和预后的影响[J].海南医学,2018,29(24):3408-3411. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2018.24.002.
- [16] 李伟玲.阿司匹林联合替罗非班预防冠心病 PCI 术后血栓形成 100 例分析[J].陕西医学杂志,2017,46(1):112-114. DOI:10.3969/j.issn.1000-7377.2017.01.050.
- [17] Maino A,Rosendaal FR,Algra A,et al. Hypercoagulability is a stronger risk factor for ischaemic stroke than for myocardial infarction: A systematic review[J]. PLoS One,2015,10(8):e0133523. DOI:10.1371/journal.pone.0133523.
- [18] 熊国均,黄楷森,欧荣华,等.纤维蛋白原与白蛋白比值对多支血管病变急性心肌梗死患者 PCI 术后远期预后的预测价值[J].疑难病杂志,2019,18(12):1212-1217. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.12.006.
- [19] 张津津,夏云峰,刘润梅,等.血清尿酸对冠心病 PCI 术后凝血及血小板功能的影响[J].西北国防医学杂志,2017,38(2):111-113. DOI:10.16021/j.cnki.1007-8622.2017.02.012.
- [20] 刘少云,崔松,于娜,等.瑞舒伐他汀联合环磷腺苷葡胺治疗急性心肌梗死对血清 VEGF-B 和 GDF-15 水平的影响[J].疑难病杂志,2019,18(12):1195-1199. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.12.002.
- [21] 罗世希,陈虹年,张相锋,等.补阳还五汤对气虚血瘀型急性脑梗死患者高凝状态的影响[J].世界中医药,2017,12(9):2050-2053. DOI:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.016.
- [22] 翁建豪,许杰,张应彬,等.关节置换术后高凝状态的动态变化分析[J].中国矫形外科杂志,2018,26(5):395-400. DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2018.05.03.
- [23] Leibundgut G, Lee JH, Strauss BH, et al. Acute and long-term effect of percutaneous coronary intervention on serially-measured oxidative, inflammatory, and coagulation biomarkers in patients with stable angina[J]. J Thromb Thrombolysis, 2016, 41(4):569-580. DOI:10.1007/s11239-016-1351-6.
- [24] 高玉龙,龚晓刚,陶英,等.心肌梗死溶栓试验危险评分与 ST 段抬高型心肌梗死患者直接冠状动脉介入术后心肌组织灌注的关系分析[J].中国医药,2019,14(10):1470-1473. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2019.10.008.
- [25] Shahrivari M, Wise E, Resende M, et al. Peripheral blood cytokine levels after acute myocardial infarction; IL-1 β and IL-6 related impairment of bone marrow function[J]. Circ Res, 2017, 120(12):1947-1957. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.309947.
- [26] 张诗吟,廖海红,李国栋.急性 ST 段抬高型心肌梗死患者急性期冠状动脉病变评分与血清胱抑素 C 水平的相关性[J].中国医药导报,2019,16(8):131-135.
- [27] 蒋承建,潘孙雷,池菊芳,等.不同心脏康复模式在急性心肌梗死经皮冠状动脉介入治疗术后早期的临床价值研究[J].中国全科医学,2017,20(20):2439-2445. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.2017.20.003.
- [28] 黄勇,黄玉龙,王小敏,等.急性心肌梗死患者血清 PA、sVCAM-1 水平变化及意义[J].山东医药,2017,57(28):71-73. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.28.022.
- [29] 郑海军,李爱琴,晋辉,等.负剂量替格瑞洛改善急性心肌梗死患者 PCI 术后心肌灌注的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(12):2333-2338. DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.010.
- [30] 王婷,李结华.hs-CRP、BNP 和 cTnI 联合检测对急性心肌梗死患者 PCI 术后 MACE 的预测价值[J].重庆医学,2017,46(3):380-382. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.029.

(收稿日期:2019-11-05)

缺血性小血管病变 MR 影像学表现与血管性认知功能障碍的相关性

李经国,卓丽华,龙拥军,张婕,张润峰

基金项目:四川省医学会重点研究课题(s15044)

作者单位:621000 绵阳市第三人民医院/四川省精神卫生中心放射科

通信作者:李经国, E-mail: hemeigff@163.com

【摘要】目的 探讨缺血性小血管病变 MR 影像学表现与血管性认知功能障碍(VCI)的相关性。**方法** 收集 2017 年 1 月—2018 年 12 月绵阳市第三人民医院收治的缺血性小血管病患者 100 例为研究对象,采用蒙特利尔认知评估量表(MoCA)和简易精神量表(MMSE)对患者进行评分,根据出院后 6 个月 MMSE 和 MoCA 评分分为 VCI 组(MMSE < 27 分, MoCA ≤ 27 分)44 例和非 VCI 组(MMSE ≥ 27 分, MoCA > 27 分)56 例,对其临床资料和 MR 影像学检查进行分析。**结果** VCI 组额叶、基底节梗死发生率高于非 VCI 组,差异具有统计学意义($\chi^2 = 3.834, 2.770, P < 0.05$);VCI 组海马沟回间距及侧脑室体部宽度指数显著高于非 VCI 组,差异具有统计学意义($t = 2.816, 2.257, P < 0.05$);VCI 组 LI 分级、LA 分级 2 级 + 3 级占比高于非 VCI 组,差异均有统计学意义($\chi^2 = 3.244, 4.268, P < 0.05$);根据 Pearson 相关性分析,CSVD 的 VCI 发生与腔隙性脑梗死病灶部位、LI 分级、LA 分级呈正相关($r = 0.412, 0.560, 0.550, P = 0.025, 0.011, 0.010$);CSVD 的 VCI 发生与脑萎缩线性指标不相关($r = 0.315, P > 0.05$)。**结论** CSVD 患者额叶、基底节梗死,梗死灶 ≥ 4 个,2、3 级 LA 可作为 VCI 的预测指标。

【关键词】 小血管病变,缺血性;磁共振检查;血管性认知功能障碍;相关性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.003

Correlation between MR imaging and vascular cognitive dysfunction in ischemic small vessel disease Li Jingguo, Zhuo Lihua, Long Yongjun, Zhang Jie, Zhang Runfeng. Mianyang Third People's Hospital, Sichuan Mental Health Center, Sichuan Province, Mianyang 621000, China

Corresponding author: Li Jingguo, E-mail: hemeigff@163.com

Fund program: Key Project of Sichuan Medical Association (s15044)

【Abstract】Objective To explore the correlation between MR imaging and vascular cognitive impairment (VCI). **Methods** From January 2017 to December 2018, 100 patients with ischemic small blood vessel disease admitted to the third People's Hospital of Mianyang City were collected as research objects. The patients were assessed with the Montreal Cognitive Assessment Scale (MoCA) and the mini mental Inventory (MMSE). According to the MMSE and MOCA scores of 6 months after discharge, 44 patients in VCI group (MMSE < 27, MoCA ≤ 27) and 56 patients in non VCI group were divided. The clinical data and MR imaging examination were analyzed. **Results** The incidence of frontal lobe and basal ganglia infarction in VCI group was significantly higher than that in non VCI group ($\chi^2 = 3.834, 2.770, P < 0.05$). VCI group was significantly higher than non VCI group ($t = 2.816, t = 2.257, P < 0.05$). The proportion of LI and LA in VCI group was higher than that in non VCI group ($\chi^2 = 3.244, 4.268, P < 0.05$). According to Pearson's correlation analysis, the VCI of CSVD was positively correlated with the location, grade and La grade of lacunar cerebral infarction ($r = 0.412, r = 0.560, r = 0.550, P = 0.025, P = 0.011, P = 0.010$). VCI of CSVD was not correlated with linear index of brain atrophy ($r = 0.315, P > 0.05$). **Conclusion** In CSVD patients, frontal lobe and basal ganglia infarctions, infarctions ≥ 4, and LA of grade 2 and 3 can be used as a predictor of VCI.

【Key words】 Ischemic small vessel disease; MR Imaging; Vascular dementia; Correlation

血管性认知功能障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是一种由出血性、缺血性及缺氧性脑血管

病等一系列脑血管疾病导致颅脑局灶性神经功能损害引发的严重认知功能障碍综合征^[1],若早期治疗具有

一定的可干预性和可逆性,因此早期诊断尤为重要。脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)是指脑微动脉或颅内小动脉病变引起的梗死或缺血性损害,随着神经科学和影像学的发展,越来越多的患者被发现患有 CSVD。CSVD 主要包括腔隙性脑梗死(lacunar infarction, LI)、脑白质病变(white matter lesions, WML)、脑微出血及 LI 合并 WML。CSVD 患者起病隐匿,早期的神经功能缺损和认知功能损害较轻而处于亚临床状态,因此较难察觉。本研究旨在探讨 CSVD 的影像学特征及其与 VCI 的相关性,为 CSVD 所致的 VCI 早期诊断提供一定依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2017 年 1 月—2018 年 12 月绵阳市第三人民医院收治的缺血性小血管病患者 100 例作为研究对象,包括男 62 例,女 38 例,年龄 33~80 (68.48 ± 5.09) 岁,LI 67 例、WML 33 例。其中 LI 患者主要临床症状包括步态异常、排尿异常、共济失调性轻偏瘫、感觉性偏瘫、运动性或感觉运动性卒中等,但有 5 例患者的临床表现不明显;WML 患者临床表现为认知、情感或行为障碍,部分患者伴有动作缓慢、步态异常等。由于脑微出血病例较为罕见,为了避免样本数过少导致的偏差,未纳入本次研究。

根据出院后 6 个月蒙特利尔认知评估量表(Montreal cognitive assessment, MoCA)、简易精神量表(mini-mental state examination, MMSE)评估结果和相应的诊断标准将 100 例患者分为 VCI 组和非 VCI 组。VCI 组(MMSE < 27 分, MoCA $\leq$ 27 分)44 例,男 28 例,女 16 例,年龄 33~78 (68.05 ± 4.72) 岁;文化程度初中及以下 29 例,高中(含中专)10 例,大专及以上 5 例;LI 31 例, WML 13 例。非 VCI 组(MMSE $\geq$ 27 分, MoCA > 27 分)56 例,男 34 例,女 22 例,年龄 33~78 (68.71 ± 5.15) 岁;文化程度初中及以下 36 例,高中(含中专)12 例,大专及以上 8 例;LI 36 例, WML 20 例。2 组性别、年龄、文化程度等资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准,入选患者或家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 纳入标准:(1)经 MR、CT 等影像学检查确诊;(2)CSVD 诊断符合全国第四届脑血管病学术会议制定的诊断标准^[2];(3)Hachinski 缺血量表(Hachinski ischemic scale)分数 $\geq$ 7 分;(3)出院后随访 > 6 个月者。排除标准:(1)合并重要器官功能不全或衰竭者;(2)合并可影响认知功能的其他疾病者;(3)合并颅脑大血管病变者;(4)有既往脑出血病史和神经外科手术史者。

1.3 研究方法

1.3.1 MR 检查:选择 Skyra3.0 超导磁共振(西门子),常规轴位 T₁WI、T₂WI、Fast FLAIR、DWI 扫描,记录患者腔隙性梗死部分,根据 MR 图像对脑室系统指标、皮质下萎缩指标行一维线性测定,测量均由同一人进行,对每位受试者于同一时间、同一图像进行 2 次测量取均值。测量指标:(1)海马沟指数=海马沟回间距/大脑脚层横断面上大脑左右径比值;(2)双额指数=双侧侧脑室两额角间最宽距离/水平脑组织横径;(3)侧脑室体部宽度指数=两侧侧脑室腰部外侧壁最小距离/水平脑组织横径。行脑白质疏松(LA)影像学分级、腔隙性脑梗死(LI)影像学分级。LA 分级标准:0 级为正常;1 级为侧脑室枕脚和额角均存在高信号,可能伴有脑白质内散在点状高信号;2 级为脑白质高信号呈斑片状,并呈融合倾向;3 级为侧脑室周围脑白质高信号融合成片。LI 分级标准:1 级为 1~3 个病灶;2 级为 4~10 个病灶;3 级为 10 个以上病灶。以上评估均由 2 名神经科高年资医师进行单独评估,若评估结果不一致再由第 3 名医师进行评估。

1.3.2 MMSE 和 MoCA 评估:收集整理 2 组的临床资料,包括性别、年龄、生活习惯(吸烟、饮酒)、合并疾病(糖尿病、冠心病、高血压等)、重大疾病史等。并由 2 名神经科医师在培训后对每名受试者进行 MMSE 和 MoCA 评估,采用一对一访谈的形式,2 名医师分别独立评分。MMSE 精神评估量表包括定向力、记忆力、注意力、计算力、语言能力等 5 个领域总计 11 个评估项目,最高得分为 30 分, $\geq$ 27 分为认知功能正常;21~26 分为轻度痴呆;10~20 分为中度痴呆; $\leq$ 9 分为重度痴呆。MoCA 评估量表(2004)包括注意与集中、执行功能、视空间技能、命名、记忆、语言、计算和定向力等 8 个领域总计 11 个评估项目,总分 30 分,评估时间限定为 10~15 min。如果受试者受教育年限 $\leq$ 12 年则在评估基础上加 1 分, > 26 分为认知功能正常;20~25 分为轻度痴呆;10~19 分为中度痴呆; < 10 分为重度痴呆。

1.4 统计学方法 用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行两两 LSD-*t* 检验,非正态分布数据行 Kruskal-Wallis *H* 检验;计数资料以频数或率(%)表示,行 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 法;VCI 的高危因素行 Logistic 多因素回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 MMSE、MoCA 评分比较 VCI 组随访 6 个月 MMSE 评分和 MoCA 评分均低于非 VCI 组,差异均

有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 2 组患者随访 6 个月 MMSE、MoCA 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组 别	例数	MMSE 评分	MoCA 评分
VCI 组	44	17.52 $\pm$ 5.38	16.36 $\pm$ 3.12
非 VCI 组	56	28.77 $\pm$ 4.20	27.11 $\pm$ 3.19
t 值		-5.428	-9.175
P 值		0.000	0.000

2.2 2 组 LI 患者病灶部位和 LI 分级比较 VCI 组额叶、基底节梗死发生率高于非 VCI 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);2 组颞叶、枕叶、顶叶、脑干、半卵圆中心、小脑和其他部位差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。VCI 组 LI 2 级、3 级脑梗死占比大于非 VCI 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 2 组 LI 患者病灶分级比较 [例(%)]

组 别	例数	1 级	2 级	3 级	2+3 级占比(%)
VCI 组	31	7(22.58)	15(48.39)	9(29.03)	77.42
非 VCI 组	36	18(50.00)	13(36.11)	5(13.89)	50.00
χ^2 值		3.361	3.423	4.912	3.244
P 值		0.022	0.037	0.000	0.030

2.3 2 组脑萎缩线性指标比较 VCI 组海马沟回间距及侧脑室体部宽度指数显著高于非 VCI 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);2 组海马沟指数、第三脑室宽度、侧脑室额角宽度、双额指数、侧脑室体部宽度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

2.4 2 组脑白质疏松(LA)分级比较 VCI 组 LA 分级 2 级、3 级占比多于非 VCI 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 5。

2.5 CSVD 的 MR 表现与 VCI 的相关性分析 经 Pearson 相关性分析,CSVD 的 VCI 发生与 MR 检查腔

隙性脑梗死病灶部位和 LI 分级呈正相关($r = 0.412$, $P = 0.025$; $r = 0.560$, $P = 0.011$),而与 MR 检查脑萎缩线性指标关系不显著($r = 0.315$, $P = 0.089$);CSVD 的 VCI 发生与 MR 检查 LA 分级呈正相关($r = 0.550$, $P = 0.010$)。

表 5 2 组患者 LA 分级比较 [例(%)]

组 别	例数	1 级	2 级	3 级	2+3 级占比(%)
VCI 组	13	2(15.38)	5(38.46)	6(46.15)	84.61
非 VCI 组	20	9(45.00)	5(25.00)	6(30.00)	55.00
χ^2 值		7.351	2.904	3.090	4.268
P 值		0.000	0.012	0.028	0.007

3 讨 论

脑小血管病(CSVD)一般是指脑内小动脉(大血管的深穿支动脉、浅表的软脑膜血管分支)病变,其累及的血管直径为 40 ~ 200 μm ^[2-3]。临床研究显示,脑小血管病与血管性认知功能障碍、脑卒中等多种疾病有关,其严重性不亚于脑卒中,谭子虎等^[4]认为 CSVD 继发血管性认知功能障碍的发生率高达 36% ~ 67%。但 CSVD 临床表现存在“静寂现象”^[5],随着神经学科的发展,CSVD 的研究已经逐渐引起了重视。本研究根据缺血性小血管病患者出院后 6 个月 MoCA、MMSE 评分划分为 VCI 组和非 VCI 组,对 2 组患者的临床资料和 MR 影像学资料进行对比分析,以探讨 CSVD 发展为 VCI 的预测指标。

本研究收治的 100 例患者中,67 例为腔隙性脑梗死,主要临床症状包括步态异常、排尿异常、共济失调性轻偏瘫、感觉性偏瘫、运动性或感觉运动性卒中等,但有 5 例患者的临床表现不明显。33 例为脑白质病变,临床表现为认知、情感或行为障碍,部分患者伴有动作缓慢、步态异常等。

表 2 2 组 LI 患者病灶部位比较 [例(%)]

组 别	例数	额叶	颞叶	枕叶	顶叶	基底节	脑干	半卵圆中心	小脑	其他
VCI 组	31	7(22.58)	3(9.67)	3(9.68)	2(6.45)	10(32.26)	1(3.23)	3(9.68)	0	2(6.45)
非 VCI 组	36	4(11.11)	5(13.89)	4(11.11)	3(8.33)	9(25.00)	2(5.56)	5(13.89)	1(2.78)	3(8.33)
χ^2 值		3.834	1.929	0.373	1.041	2.770	1.295	1.822	1.517	1.154
P 值		0.000	0.057	0.825	0.237	0.035	0.154	0.079	0.092	0.205

表 4 2 组患者脑萎缩线性指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	海马沟回间距(mm)	海马沟指数	第三脑室宽度(mm)	侧脑室额角宽度(mm)	双额指数	侧脑室体部宽度(mm)	侧脑室体部宽度指数
VCI 组	44	27.16 $\pm$ 2.84	0.20 $\pm$ 0.03	10.25 $\pm$ 2.54	33.52 $\pm$ 2.38	3.54 $\pm$ 0.26	36.50 $\pm$ 5.28	3.77 $\pm$ 0.55
非 VCI 组	56	26.33 $\pm$ 2.25	0.20 $\pm$ 0.04	10.36 $\pm$ 2.33	33.67 $\pm$ 2.35	3.52 $\pm$ 0.23	36.02 $\pm$ 3.94	3.52 $\pm$ 0.35
t 值		2.816	0.158	0.727	0.739	0.921	0.834	2.257
P 值		0.039	0.862	0.610	0.563	0.421	0.456	0.041

目前研究普遍认为,脑梗死部位与 VCI 的发生显著相关。Otsuka 等^[6]研究认为,额叶、丘脑、顶叶梗死灶容易引发认知障碍。韩宛盈等^[7]研究认为,基底节区、丘脑、颞叶、额叶梗死灶易诱发 VCI。本研究显示,VCI 组额叶、基底节梗死发生率高于非 VCI 组,提示额叶和基底节梗死灶可能与 VCI 的发生密切相关。可能的原因包括:(1)基底节区核与核间纤维联系广泛^[8],而纤维联系已被研究证实与机体的认知、记忆功能相关,因此纤维联系的损害可能诱发 VCI;(2)额叶与机体抽象思维、智力活动、情感活动及语言等功能息息相关^[9],梗死灶可能因破坏额叶皮质及皮质下纤维联系从而诱发 VCI。额叶和基底节梗死灶易导致 VCI 的结论与以往研究相符,但部分研究认为^[10-11],颞叶、丘脑也是易引起认知障碍的梗死灶部位,在本次研究中并未发现,可能和样本数限制有关。

本研究显示,VCI 组 2 级、3 级脑梗死占比多于非 VCI 组,提示梗死灶数目在 3 个以上更容易发生 VCI,与董艳红等^[12]研究相符。Pantoni^[13]认为相同体积的梗死灶呈多发时更易诱发痴呆,这可能和多发梗死灶破坏丘脑与皮质、皮质与皮质、皮质与纹状体通路有关,其造成的影响可能具有乘法效应。

本研究中,VCI 组 LA 分级 2 级、3 级占比多于非 VCI 组。既往研究显示,WML 病理改变突出的特征是脑白质内弥漫性或局限性脱髓鞘及胶质增生。WML 严重到一定程度时,可通过广泛的白质损害影响额叶并干扰纹状体与皮质、丘脑与皮质通路,从而影响患者认知功能,提示 WML 严重程度与 VCI 的发生显著相关。

脑萎缩可分为中央性萎缩和皮质萎缩。本研究显示,VCI 组仅海马沟回间距及侧脑室体部宽度指数显著高于非 VCI 组,提示 VCI 组海马萎缩和侧脑室扩张程度较非 VCI 组更大,其中央性萎缩更为显著,而皮质萎缩 2 组间差异不显著,与以往的研究基本一致^[14-15]。Wardlaw 等^[16]认为,海马杏仁复合体与记忆、学习功能密切相关,在脑缺血后 CA1 区神经元易脱失从而引发 VCI。韩宛盈等^[7]研究发现,VCI 的发生和海马萎缩具有显著相关性,故可作为预测和判断病情严重程度的指标。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李经国:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;卓丽华、龙拥军:提出研究思路,分析试验数据;张婕:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;张润峰:进行统计学分析,论文撰写

参考文献

- [1] 黄超楠,黄世敬.中老年缺血性脑白质病变危险因素的研究进展[J].中国医药导报,2018,15(23):30-33.
- [2] 全国第四届脑血管疾病学术会议组.各类脑血管疾病诊断要点及临床功能缺损程度评分标准(1995)[J].中华神经科杂志,1996,29(6):376-381. DOI:10.1016/j.sna.2010.01.012.
- [3] 陈军,李君良,符家武.脑小血管病患者中血清尿酸水平与临床症状及脑白质高信号的相关性[J].广东医学,2017,38(21):3318-3320. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2017.21.026.
- [4] 谭子虎,陈延,谢文婷,等.血管因素与血管性认知功能损伤及痴呆[J].安徽医药,2018,22(12):2291-2294. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.12.004.
- [5] 阮世旺.血管性痴呆危险因素及影像学特征[J].中国实用神经疾病杂志,2017,20(7):47-50. DOI:10.3969/j.issn.1673-5110.2017.07.019.
- [6] Otsuka Y, Yamauchi H, Sawamoto N, et al. Diffuse tract damage in the hemispheric deep white matter may correlate with global cognitive impairment and callosal atrophy in patients with extensive leukoaraiosis[J]. American Journal of Neuroradiology, 2012, 33(4):726-732. DOI:10.3174/ajnr.A2853.
- [7] 韩宛盈,岳少乾,朱金墙.阿尔茨海默病与血管性痴呆发病过程中血管因素的作用及其药物治疗[J].中国老年学杂志,2017,37(1):216-220. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.01.096.
- [8] 李娜,张华.缺血性小血管病与血管性痴呆的相关性研究[J].宁夏医科大学学报,2012,34(3):252-256. DOI:10.3969/j.issn.1674-6309.2012.03.015.
- [9] 邢娟,李炳.血管性痴呆患者认知功能改变与腔隙性脑梗死、脑白质病变的相关性[J].中国老年学杂志,2014,34(9):2437-2438. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2014.09.060.
- [10] 赵霄潇,李慧生.血管性痴呆相关危险因素研究进展[J].心血管病学进展,2018,39(3):328-331. DOI:10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2018.03.007.
- [11] Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies; Report of the NINDS - AIREN International Workshop [J]. Neurology, 1993, 43(2):250-250. DOI:10.1212/WNL.43.2.250.
- [12] 董艳红,吕佩源,李玲,等.血管性痴呆患者执行功能与脑白质病变的相关性[J].中华行为医学与脑科学杂志,2011,20(3):238-240. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2011.03.014.
- [13] Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges [J]. The Lancet Neurology, 2010, 9(7):689-701. DOI:10.1016/S1474-4422(10)70104-6.
- [14] 兰文婧.应用多模态磁共振成像技术研究脑小血管病神经影像学特征及其与认知障碍的相关性[D].长春:吉林大学,2018.
- [15] 王霆.脑小血管病伴血管性轻度认知损害的临床研究[D].合肥:安徽医科大学,2017.
- [16] Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: Insights from neuroimaging[J]. The Lancet Neurology, 2013, 12(5):483-497. DOI:10.1016/S1474-4422(13)70060-7.

(收稿日期:2019-03-27)

BDNF Val66Met 基因多态性与老年糖尿病患者认知功能损害的相关性

刘佳, 罗鸿宇, 王洁妤, 张丽, 但小娟, 杨伟

基金项目: 北京市保健科研课题(京 17-13); 北京市医院管理局青年人才培养“青苗”计划(QML20180805)

作者单位: 100053 北京, 首都医科大学宣武医院老年科(刘佳、罗鸿宇、王洁妤、张丽、杨伟), 神经内科(但小娟)

通信作者: 杨伟, E-mail: yangw_79@163.com

【摘要】目的 分析脑源性神经营养因子(BDNF) Val66Met 基因多态性对老年糖尿病患者认知功能损害的影响。**方法** 收集 2018 年 1 月—2019 年 5 月首都医科大学宣武医院老年科诊治糖尿病患者(年龄 ≥ 65 岁)592 例, 采用简易智能评估量表(MMSE)对患者进行认知功能评估, 其中认知功能损害(CI)组 189 例, 认知正常组 403 例, 采集患者临床资料和生化资料, 进行 BDNF 基因分型检测, 分析 BDNF Val66Met 基因多态性与老年糖尿病患者认知功能损害的相关性。**结果** CI 组风险等位基因 A 高于认知正常组($\chi^2/P=4.396/0.036$); 等位基因 A 携带者在定向力、延迟回忆及语言能力 3 个认知域的分值显著低于非携带者($t/P=3.063/0.012$ 、 $2.642/0.034$ 、 $2.941/0.020$); 线性回归分析显示, 每拷贝 A 等位基因与 MMSE、定向力和延迟回忆有显著相关性($\beta/P=-0.096/0.011$ 、 $-0.155/<0.001$ 、 $-0.134/0.001$); 多因素 Logistic 分析显示, 糖尿病病程、空腹血糖、HbA_{1c}、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是糖尿病认知功能障碍的危险因素[OR(95% CI)=1.036(1.014~1.059)、1.082(1.004~1.166)、1.253(1.057~1.486)、1.116(1.022~1.554), P 均 <0.05], 而受教育时间和口服二甲双胍是认知功能障碍的保护因素[OR(95% CI)=0.877(0.812~0.947)、0.502(0.297~0.849), P 均 <0.05], 糖尿病人群 BDNF Val66Met A 等位基因携带者患认知功能障碍疾病风险是非携带者的 1.696 倍(95% CI 1.119~2.569, $P=0.013$)。**结论** 老年糖尿病人群认知功能损害可能与 BDNF Val66Met 基因多态性密切相关。

【关键词】 老年人; 糖尿病, 2 型; 认知功能障碍; 脑源性神经营养因子; 基因多态性; Val66Met 基因

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.004

Association of BDNF Val66Met gene polymorphism with cognitive impairment in elderly diabetic patients Liu Jia*, Luo Hongyu, Wang Jieyu, Zhang Li, Dan Xiaojuan, Yang Wei. * Department of Geriatrics, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: Yang Wei, E-mail: yangw_79@163.com

Fund program: Research Project of Health Care in Beijing (17-13); Youth Training Program of Beijing Municipal Hospital Administration (QML20180805)

【Abstract】Objective To analyze the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met gene polymorphism on cognitive impairment in elderly diabetic patients. **Methods** Five hundred and ninety-two diabetic patients (aged ≥ 65 years) were collected from January 2018 to May 2019 in the Department of Geriatrics, Xuanwu Hospital, Capital Medical University. The cognitive function of the patients was assessed by MMSE, including 189 patients in CI group and 403 patients in normal cognitive group. Clinical and biochemical data were collected and BDNF genotyping was performed to analyze the relationship between BDNF Val66Met gene polymorphism and cognitive impairment in elderly diabetic patients. **Results** The risk allele A in the CI group was higher than that in the cognitively normal group ($\chi^2/P=4.396/0.036$); the scores of allele A carriers in the three cognitive domains of orientation, delayed recall and language ability were significantly lower than those of Carriers ($t/P=3.063/0.012$, $t/P=2.642/0.034$, $t/P=2.941/0.020$). Linear regression analysis showed that each copy of the A allele was significantly correlated with MMSE, orientation, and delayed recall ($\beta/P=-0.096/0.011$, $\beta/P=-0.155/<0.001$, $\beta/P=-0.134/0.001$). Multivariate logistic analysis showed that the duration of diabetes, fasting blood glucose, HbA_{1c}, and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were risk factors for cognitive impairment in diabetes [OR (95% CI) = 1.036 (1.014 to 1.059), 1.082 (1.004 to 1.166), 1.253 (1.057 to 1.486), 1.116 (1.022 to 1.554),

$P < 0.05$]. Time of education and oral metformin are protective factors of cognitive dysfunction [$OR(95\% CI) = 0.877(0.812 \text{ to } 0.947), 0.502(0.297 \text{ to } 0.849), P < 0.05$]. The carriers of the BDNF Val66Met A allele in the diabetic population were 1.696 times more likely to suffer from cognitive dysfunction than non-carriers ($95\% CI 1.119 \text{ to } 2.569, P = 0.013$). **Conclusion** The cognitive impairment in the elderly with diabetes may be closely related to the BDNF Val66Met gene polymorphism.

【Key words】 Elderly; Diabetes mellitus, type 2; Cognitive impairment; Brain derived neurotrophic factor; Genetic polymorphism; Val66Met gene

糖尿病是老年人群的常见疾病,常伴随着认知功能损害,其阿尔茨海默病(AD)发病率增高^[1-2]。然而目前糖尿病出现认知功能损害的确切机制仍不明确。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养素家族的一员,与神经元的生长、分化、增殖、可塑性及大脑的认知和记忆密切相关^[3]。有研究证实,血 BDNF 水平在 AD 和糖尿病患者中下降^[4-6],但也有研究结果却不一致^[7-8],可能是由于血清 BDNF 易受降糖降脂药物、生活方式如运动、吸烟和饮酒等多种因素的影响^[9]。Val66Met 基因位于 BDNF 基因的编码外显子,其 G/A 多态性导致编码的第 66 位氨基酸发生缬氨酸—甲硫氨酸(Val-Met)转换,从而影响 BDNF 分泌^[10]。有研究发现,在健康人群中风险等位基因 A 携带者海马体积和海马相关记忆下降,可能与 AD 发病相关^[11-12]。糖尿病人群与健康人群比较,A 等位基因携带者延迟回忆能力减退^[4]。但该位点与老年糖尿病人群认知功能下降是否相关目前少有报道。本研究分析了老年糖尿病患者认知功能障碍与 BDNF 基因多态性的相关性,探讨 2 型糖尿病认知功能损害的可能机制,以期望为糖尿病认知功能损害提供个体化治疗依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2018 年 1 月—2019 年 5 月首都医科大学宣武医院老年科诊治糖尿病患者(年龄 ≥ 65 岁)592 例,其中认知损害(CI)组 189 例,认知正常组 403 例,见表 1。本研究经医院伦理委员会批准,入组对象或家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 入组标准 纳入标准:(1)年龄 ≥ 65 岁;(2)糖尿病诊断标准符合“中国 2 型糖尿病防治指南 2017 年版”^[13];(3)文化程度在初中及初中以上者。排除标准:(1)影像学检查有明确神经系统疾病史(脑血管病、帕金森病等);(2)严重内科疾病不能配合检查者,中重度贫血及甲状腺功能减退者;(3)糖尿病高渗或酮症酸中毒;(4)明确的精神疾病等;(5)严重视力或听力障碍。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 临床资料:(1)临床特征,包括身高、体质量、体质量指数(BMI)、疾病情况及降糖用药信息[二甲双胍、胰岛素、噻唑烷二酮类、二肽基肽酶 4(dipeptidyl peptidase-4, DPPIV)抑制剂]等;(2)生化指标,空腹血糖(FPG),糖化血红蛋白(HbA_{1c}),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);胰岛素抵抗指数(HOMA2-IR)通过计算软件(www.ocdem.ox.ac.uk)获得^[14];(3)认知功能评定,采用简易智能评估量表(MMSE)评估,共 30 项,分为定向力、短时记忆、计算及注意力、延迟回忆和语言能力等 5 部分,总分范围 0~30 分。根据中国痴呆与认知障碍指南写作组制定的认知障碍标准,文盲组 ≤ 19 分,小学组 ≤ 22 分,初中以及上 ≤ 26 分为认知功能损害^[15]。

1.3.2 基因分型检测:采取静脉血 5 ml 抗凝处理,按照 QIAGEN 公司基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA。BDNF Val66Met 上游引物 5'-AAGAAG-CAAA-CATCCGAGGACA-3',下游引物 5'-GGGATTG-CACTTGGTCTCGTAG-3',引物由上海生工合成。然后应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术扩增目的 DNA 片段。酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,根据电泳条带迁移速率不同进行分析,对 BDNF Val66Met 进行基因分型。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验;HOMA2-IR 是非线性资料,统计时采用自然对数转化,以 Ln HOMA2-IR 表示;相关性采用多重线性回归分析,多因素分析采用 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较 2 组的性别、年龄、高血压病史、BMI 水平、Ln HOMA2-IR 及其他口服降糖药物相比,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。与认知正常组比较,CI 组的糖尿病病程、HbA_{1c}、血 LDL-C、空腹血糖水平增高,而受教育时间(年)偏低及口服二甲双胍比例下降(P 均 < 0.05),见表 1。

2.2 2 组 BDNF Val66Met 基因多态性比较 其在总人群中分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),最小等位基因(A)频率为 46.6%。虽然 3 种基因型 GG、AG、AA 在 CI 组和认知正常组之间分布差异无统计学意义($P>0.05$),但是风险等位基因 A 在 CI 组中分布明显高于认知正常组(51.1% vs. 44.5%, $P=0.036$),见表 1。

表 1 2 组一般资料和 BDNF 基因多态性分布比较				
项 目	CI 组 ($n=189$)	认知正常组 ($n=403$)	t/χ^2 值	P 值
MMSE($\bar{x}\pm s$,分)	23.93 $\pm$ 2.47	28.90 $\pm$ 1.03	27.176	<0.001
男[(%)]	89(55.3)	223(47.1)	3.509	0.064
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	74.44 $\pm$ 7.01	73.47 $\pm$ 6.75	-1.064	0.109
受教育时间($\bar{x}\pm s$,年)	10.88 $\pm$ 2.67	11.93 $\pm$ 2.74	4.116	<0.001
糖尿病病程($\bar{x}\pm s$,年)	15.32 $\pm$ 9.97	12.43 $\pm$ 7.35	-3.964	<0.001
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	25.83 $\pm$ 3.30	25.69 $\pm$ 3.20	0.495	0.621
高血压[例(%)]	156(82.5)	332(82.4)	0.002	0.998
生化指标($\bar{x}\pm s$)				
HbA _{1c} (%)	7.99 $\pm$ 1.82	7.64 $\pm$ 1.67	-3.187	0.024
LDL-C(mmol/L)	2.54 $\pm$ 0.98	2.18 $\pm$ 0.92	-0.772	0.001
FPG(mmol/L)	8.01 $\pm$ 3.62	7.31 $\pm$ 2.46	-2.409	0.017
Ln HOMA2-IR	6.94 $\pm$ 4.95	7.04 $\pm$ 4.86	1.063	0.099
降糖药物[例(%)]				
二甲双胍	62(32.8)	204(50.6)	16.505	<0.001
噻唑烷二酮类	44(23.3)	88(21.8)	0.155	0.751
胰岛素	95(50.3)	187(46.6)	0.770	0.475
DPP-IV 抑制剂	5(1.2)	0	-	-
BDNF Val66Met[例(%)]				
GG	41(21.7)	123(30.5)	5.241	0.073
GA	103(54.5)	201(49.9)		
AA	45(23.8)	79(19.6)		
G	185(48.9)	447(55.5)	4.396	0.036
A	193(51.1)	359(44.5)		

2.3 BDNF 基因多态性与 MMSE 分值的相关性分析

表 3 BDNF 风险等位基因与 MMSE 各项分值的相关性分析							
		定向力	短时记忆	计算及注意力	延迟回忆	语言能力	MMSE 总分
BDNF 风险	β	-0.155	-0.014	0.033	-0.134	-0.066	-0.096
等位基因	P 值	<0.001	0.729	0.404	0.001	0.103	0.011

表 4 老年糖尿病患者认知功能障碍多因素 Logistic 回归分析					
变 量	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR (95% CI)
受教育时间	-0.131	0.039	11.173	<0.001	0.877(0.812~0.947)
糖尿病病程	0.036	0.011	10.562	0.001	1.036(1.014~1.059)
高血压	0.051	0.329	0.024	0.876	1.053(0.552~2.007)
FPG	0.079	0.038	4.269	0.039	1.082(1.004~1.166)
HbA _{1c}	0.226	0.087	6.759	0.009	1.253(1.057~1.486)
LDL-C	0.216	0.214	4.373	0.034	1.116(1.022~1.554)
口服二甲双胍	-0.069	0.268	6.615	0.010	0.502(0.297~0.849)
BDNF A 等位基因	0.528	0.212	6.212	0.013	1.696(1.119~2.569)

2.3.1 BDNF 基因多态性 MMSE 分值比较:在总人群中等位基因 A 携带者的语言能力及定向力、延迟回忆分值低于非携带者($P<0.05$),但在 MMSE 总分值、短时记忆和计算能力方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 BDNF Val66Met 基因多态性中 MMSE 各项分值的比较 ($\bar{x}\pm s$,分)				
指 标	等位基因 A 携带者($n=428$)	非等位基因 A 携带者($n=164$)	t 值	P 值
MMSE 总分	27.77 $\pm$ 2.57	27.99 $\pm$ 2.11	1.252	0.312
语言能力	8.57 $\pm$ 0.89	8.71 $\pm$ 0.49	2.941	0.020
定向力	9.49 $\pm$ 1.05	9.71 $\pm$ 0.65	3.063	0.012
短时记忆	2.96 $\pm$ 0.23	2.96 $\pm$ 0.27	0.244	0.807
计算及注意力	4.25 $\pm$ 1.23	4.17 $\pm$ 1.26	-1.203	0.085
延迟回忆	2.35 $\pm$ 0.87	2.53 $\pm$ 0.68	2.642	0.034

2.3.2 BDNF 风险等位基因与 MMSE 分值的线性相关分析:进一步分析 BDNF Val66Met 风险等位基因 A 与 MMSE 总分以及各分值的相关性(见表 3)。采用线性回归分析,调节表 1 有显著差异的相关因素后,每拷贝风险等位基因 A 与 MMSE($\beta=-0.096,P=0.011$),定向力($\beta=-0.155,P<0.001$),延迟回忆($\beta=-0.134,P=0.001$)呈负相关,但在短时记忆、计算及注意力和语言能力方面无显著相关性($P>0.05$)。

2.4 糖尿病患者认知功能障碍的多因素分析 将表 3 中有统计学意义($P<0.05$)的因素采用 Logistic 多因素回归分析,结果显示,糖尿病病程、FPG、HbA_{1c}、LDL-C 是糖尿病认知功能障碍的独立危险因素,受教育时间和口服二甲双胍是糖尿病认知功能障碍的保护因素(P 均<0.05),见表 4。此外,BDNF Val66Met 是糖尿病人群认知功能障碍风险基因,其等位基因 A 携

带者(AA + GA)认知障碍发病风险是非携带者的1.696倍(95% CI 1.119 ~ 2.569, $P = 0.013$)。高血压与老年糖尿病患者认知功能减退无明显相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

研究发现,与非糖尿病人群比较,糖尿病患者认知功能障碍的发生率增加了1.5倍,其危险因素主要包括血糖代谢紊乱、胰岛素抵抗、血脂异常、血压增高、肥胖及遗传因素如APOE基因等^[2]。而近期针对糖尿病人群横断面研究发现,认知损害组在脑卒中、高血压及抑郁方面比例均高于糖尿病认知正常组,而在饮酒、吸烟、血脂水平、空腹血糖、BMI及APOE风险基因方面差异无统计学意义^[16-18]。而本研究发现,糖尿病病程、HbA_{1c}及LDL-C水平增高均是糖尿病认知功能下降的危险因素,但并未发现高血压人群在认知损害组中比例增高,可能与高血压本身就是脑卒中的高危因素有关,既往研究中未除外脑卒中患者,糖尿病所造成的认知功能损害可能混入了高血压导致的脑卒中从而引起认知功能下降,此外既往研究对象还包含了抑郁症患者,因此导致了结果的差异。而本研究在研究对象选择方面除外糖尿病合并脑卒中和抑郁症患者,其相关性结果更能准确体现糖尿病与非血管性认知功能障碍及阿尔茨海默病(AD)之间的联系。目前二甲双胍与糖尿病认知功能的相关性无一致结论,有研究发现,二甲双胍造成的维生素B₁₂和钙的缺乏可以增加认知功能损害的风险^[19-20],但另一些研究却相反^[21-22],本研究显示二甲双胍是糖尿病患者认知功能损害的保护因素,补充维生素B₁₂及钙剂是否与二甲双胍对认知功能的影响有关,还需进一步研究证实。

血BDNF水平在T2DM人群中较正常人群降低^[4,6],而BDNF Val66Met基因多态性可以影响BDNF细胞内运输和活动依赖性分泌从而影响BDNF的功能^[10]。该基因多态性分布频率因人种的不同而出现差异,在亚洲人群A等位基因的分布频率最高达48.1%^[23],较欧洲人群增高2倍以上^[6]。在亚洲人群中研究发现,对比T2DM和正常组人群认知功能,2组间基因分布频率无显著差异,但在延迟回忆分值方面A等位基因携带者较非携带者显著下降^[24-26]。因此推测BDNF Val66Met基因多态性并非直接影响了T2DM易感性,而是对糖尿病患者部分认知域下降造成了影响。糖尿病认知功能损害常伴随多个认知域,如即刻记忆、延迟记忆、学习和执行能力的下降^[21]。本研究以老年人群为研究对象,结果显示在总人群中A等位基因分布频率为46.6%,并发现风险等位基因A增加

可导致延迟回忆分值下降,与以往研究一致^[4]。此外A等位基因携带者在定向力和语言能力方面分值较非携带者下降。在调整学历和糖尿病病程等其他危险因素后,提示BDNF Val66Met可能是老年T2DM认知功能损害的独立危险因素。

目前BDNF Val66Met对认知功能影响的机制尚不明确。一方面,有研究发现,Val66Met基因突变在健康人群中可以影响海马相关的记忆功能和海马体积^[12],与正常人群海马相比,散发型阿尔茨海默病患者海马中BDNF表达明显降低,这些结果提示BDNF基因突变及造成随后蛋白水平的变化可能与AD的早期病理改变有关^[11-12]。此外该位点还能通过影响神经元BDNF的功能,与一些神经系统和精神疾病相关。另一方面,Val66Met位点突变导致BDNF表达下降,而BDNF可以通过刺激生长激素抑制素的表达增加 β -淀粉样蛋白的降解^[27],从而导致AD的发生。在糖尿病人群中,胰岛素抵抗和高胰岛素血症,可能导致脑内胰岛素作用减弱,A β 生成增多和降解减少,从而使神经元产生退行性改变^[2,28],可形成AD的相关病理改变,出现认知功能障碍。此外,糖尿病病变本身出现的颅内微血管慢性缺血病变,也会造成认知功能的损害。而BDNF Val66Met多态性是否会加剧糖尿病人群胰岛素抵抗、高胰岛素血症及微血管病变需要更进一步的研究。

总之,本研究发现BDNF Val66Met基因是老年糖尿病患者认知功能损害的风险基因,但是本研究为病例对照研究,BDNF Val66Met风险等位基因携带者对糖尿病患者认知功能障碍发病风险的影响还需要进一步前瞻性研究来证实。此外本研究的局限性还在于认知功能损害重要的风险基因APOE未纳入分析。故今后进一步扩大样本量,探讨2种风险基因对老年糖尿病患者认知功能的影响。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘佳:实施研究过程,数据统计分析,撰写论文;罗鸿宇、张丽:实施主要研究过程;王洁妤:设计研究流程和方案;但小娟:数据的统计和分析,进行文献调研与整理;杨伟:提出研究方向及思路,参与论文修改

参考文献

- [1] Biessels GJ, Strachan MW, Visseren FL, et al. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(3): 246-255. DOI:10.1016/S2213-8587(13)70088-3.
- [2] 杨伟. 老年糖尿病患者认知功能下降和痴呆的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(6): 644-648. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2017.06.026.

- [3] Leal G, Afonso PM, Salazar IL, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF[J]. *Brain Res*, 2015, 1621: 82-101. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.019.
- [4] Zhen YF, Liu XY, Zhou DH, et al. Cognition, serum BDNF levels, and BDNF Val66Met polymorphism in type 2 diabetes patients and healthy controls[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(3): 3653-3662. DOI:10.18632/oncotarget.23342.
- [5] Janel N, Alexopoulos P, Badel A, et al. Combined assessment of DYRK1A, BDNF and homocysteine levels as diagnostic marker for Alzheimer's disease[J]. *Transl Psychiatry*, 2017, 7(6): e1154. DOI: 10.1038/tp.2017.23.
- [6] Karabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(2): 431-438. DOI: 10.1007/s00125-006-0537-4.
- [7] Fria MC, Goncalves GS, Rocha NP, et al. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease[J]. *J Psychiatr Res*, 2014, 53: 166-172. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2014.01.019.
- [8] Woolley JD, Strobl EV, Shelly WB, et al. BDNF serum concentrations show no relationship with diagnostic group medication status in neurodegenerative disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9(7): 815-821. DOI: 10.2174/156720512802455395.
- [9] Baliotti M, Giuli C, Conti F. Preheral blood brain-derived neurotrophic factors as a biomarker of Alzheimer's disease: are there methodological biases[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6661-6672. DOI:10.1007/s12035-017-0866-y.
- [10] Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, et al. Brain-derived neurotrophic factor: A key molecule for memory in the healthy and the pathological brain[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 7(13): 363. DOI:10.3389/fncel.2019.00363.
- [11] Forde NJ, Ronan L, Suckling J, et al. Structural neuroimaging correlates of allelic variation of the BDNF val66met polymorphism[J]. *Neuroimage*, 2014, 90: 280-289. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.12.050.
- [12] Borba EM, Duarte JA, Bristot G, et al. Brain-Derived neurotrophic factor serum levels and hippocampal volume in mild cognitive impairment and dementia due to Alzheimer's disease[J]. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2016, 6(3): 559-567. DOI:10.1159/000450601.
- [13] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10(1): 4-67. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2018.01.003.
- [14] Geijselaers SLC, Sep SJS, Schram MT, et al. Insulin resistance and cognitive performance in type 2 diabetes-The Maastricht study[J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 51(5): 824-830. DOI:10.1016/j.jdiacomp.2017.01.020.
- [15] 中国痴呆与认知障碍指南写作组, 中国医师协会神经内科医师分会认知障碍疾病专业委员会. 2018 中国痴呆与认知障碍诊治指南(一)[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(13): 965-970. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.13.003.
- [16] Xiu S, Zheng Z, Liao Q, et al. Different risk factors for cognitive impairment among community-dwelling elderly, with impaired fasting glucose or diabetes[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 9(12): 121-130. DOI: 10.2147/DMSO.S180871.
- [17] 王洁好, 刘佳, 张丽, 等. 代谢综合征及载脂蛋白 Eε4 等位基因对老年人认知功能的影响[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(10): 1140-1144, 1152. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.10.014.
- [18] 张翼鸿, 冯琨, 徐明艳, 等. 胰高血糖素样肽 1 对 2 型糖尿病合并阿尔茨海默病大鼠学习记忆功能的影响[J]. *中国医药*, 2019, 14(1): 126-130. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2019.01.031.
- [19] Porter KM, Ward M, Hughes CF, et al. Hyperglycemia and metformin use are associated with B vitamin deficiency and cognitive dysfunction in older adults[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(10): 4837-4847. DOI:10.1210/jc.2018-01791.
- [20] 彭川, 吴修华, 骆涛. 舒血宁联合长春西汀对血管性认知功能障碍患者脑血流灌注量和认知功能障碍的影响[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(11): 1209-1212. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.11.006.
- [21] Nga TP, Feng L, Yap KB, et al. Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes[J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 41(1): 61-68. DOI:10.3233/JAD-131901.
- [22] Herath PM, Cherbuin N, Eramudugolla R, et al. The effect of Diabetes Medication on Cognitive function: evidence from the PATH Through life study[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7208429. DOI:10.1155/2016/7208429.
- [23] Liu W, Han X, Zhou X, et al. Brain derived neurotrophic factor in newly diagnosis diabetes and prediabetes[J]. *Mol Cell Neurobiol*, 2016, 429: 106-113. DOI:10.1016/j.mcc.2016.04.002.
- [24] Saedi E, Gheini MR, Faiz F, et al. Diabetes mellitus and cognitive impairment[J]. *World J Diabetes*, 2016, 7(17): 412-422. DOI: 10.4239/wjd.v7.i17.412.
- [25] 孟旭, 张鹏. 多奈哌齐联合美金刚对老年痴呆精神行为障碍的疗效及认知功能动态影响分析[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(4): 81-84.
- [26] 沈闲茹, 李健飞. 2 型糖尿病合并脑梗死患者的临床特点[J]. *中国当代医药*, 2019, 26(10): 82-85. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2019.10.025
- [27] Franzmeier N, Ren J, Damm A, et al. The BDNF Val66Met SNP modulated the association between beta-amyloid and hippocampal disconnection in Alzheimer's disease[J]. *Mol Psychiatry*, 2019. DOI: 10.1038/s41380-019-0404-6.
- [28] Accardi G, Caruso C, Colonna-Romano G, et al. Can Alzheimer disease be a form of type 3 diabetes[J]. *Rejuvenation Res*, 2012, 15(2): 217-221. DOI:10.1089/rej.2011.1289.

(收稿日期: 2019-10-23)

危重深静脉血栓患者的临床特征和危险因素分析

朱丽, 左秀萍, 张美霞, 徐梦, 张朋勃, 宋娟, 高苗

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2017SF003)

作者单位: 710032 西安, 空军军医大学第一附属医院呼吸内科

通信作者: 高苗, E-mail: chenymeiguyuan@163.com

【摘要】目的 分析危重深静脉血栓患者的临床特征和危险因素。**方法** 选择 2016 年 1 月—2019 年 1 月空军军医大学第一附属医院呼吸内科诊治的危重深静脉血栓(DVT)患者 58 例为病例组(A 组), 以同期住院的深静脉血栓非危重患者 58 例为对照组(B 组)。收集患者临床资料及实验室检查指标, 对患者进行 Caprini 危险因素分析, 并用帕多瓦分数预测 DVT 危险度分级; 采用多因素 Logistic 回归模型分析 DVT 危险度分级与危重深静脉血栓患者危险因素的关系。**结果** A、B 组患者性别、年龄、GCS 评分、体质量指数、血常规和吸烟史比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), A 组患者住院病死率显著高于 B 组($\chi^2/P = 3.978/0.011$); 危险度分级中, A 组患者高危和极高危患者占 84.49%, 高于 B 组患者的 44.83% ($P < 0.01$); 与干预前比较, 2 组干预后血流平均速度和血流峰速度均增加($t/P = 44.931/0.000, 8.249/0.000, 32.273/0.000, 6.537/0.000$), 且 A 组患者增加幅度大于 B 组($t/P = 38.350/0.000, 16.158/0.000$); Logistic 回归分析表明, DVT 风险评分 ≥ 5 分, 血流平均速度和血流峰速度降低, 血液黏度和 D-二聚体增高是 DVT 发病的独立危险因素(P 均 < 0.05)。**结论** Caprini 血栓风险评估量表和血液流变学可以较好反映 DVT 危险度分级与危重深静脉血栓患者危险因素的关系。

【关键词】 深静脉血栓, 危重; 临床特征; 危险因素

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.005

Analysis of clinical characteristics and risk factors of patients with critical deep vein thrombosis Zhu Li, Zuo Xiu ping, Zhang Meixia, Xu Meng, Zhang Pengbo, Song Juan, Gao Miao. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Gao Miao, E-mail: chenymeiguyuan@163.com

Fund program: Key R & D Projects of Shaanxi Province(2017SF003)

【Abstract】Objective To analyze the clinical characteristics and risk factors of patients with DVT. **Methods** From January 2016 to January 2019, 58 patients with DVT diagnosed and treated in respiratory department of the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University were selected as the case group (group A); 58 patients with DVT who were hospitalized at the same time were selected as the control group (group B). The risk factors of Caprini were analyzed and the risk grade of DVT was predicted by Padova score. Multivariate logistic regression model was used to analyze the relationship between the risk classification of DVT and the risk factors of patients with DVT. **Results** There was no significant difference in gender, age, GCS score, body mass index, blood routine test and smoking history between group A and group B ($P > 0.05$). The in-hospital mortality of group A was significantly higher than that of group B ($\chi^2/P = 3.978/0.011$). In the risk classification, 84.49% of the patients in group A were at high risk and extremely high risk, which was higher than 44.83% of the patients in group B ($P < 0.01$). Compared with that before intervention, the mean velocity and peak velocity of blood flow increased in both groups ($t/P = 44.931/0.000, 8.249/0.000, 32.273/0.000, 6.537/0.000$), and the increase of patients in group A was greater than that in group B ($t/P = 38.350/0.000, 16.158/0.000$). Logistic regression analysis showed that DVT risk score ≥ 5 , mean velocity and peak velocity of blood flow decreased, blood viscosity and D-dimer increased were independent risk factors of DVT ($P < 0.05$). **Conclusion** Caprini thrombus risk assessment scale and hemorheology can better reflect the relationship between risk classification of DVT and risk factors of patients with DVT.

【Key words】 Deep venous thrombosis, critical; Clinical features; Risk factors

深静脉血栓形成(DVT)是指在身体深静脉内存在血栓,最常见于下肢^[1-3]。其发作多是无症状的,急性DVT症状包括水肿、疼痛和红斑,均是非特异性的。治疗DVT的目的是预防其并发症肺栓塞(PE)、复发性DVT、血栓后综合征(PTS)和死亡。

急性DVT的标准治疗是全身抗凝^[4-6],以减少血栓的传播和预防PE。然而,单独的抗凝血无显著的血栓溶解活性,并且不能预防PTS。早期血栓清除可迅速解决与静脉阻塞相关的症状,并可恢复瓣膜功能,从而降低PTS的发生率。在美国,胸科医师学会、血管外科学会和美国静脉论坛分别于2006年和2012年提出了急性DVT介入治疗的推荐指南。在欧洲,苏格兰校际指导网络和国家临床指南中心工作组在2010年和2012年发布了静脉血栓栓塞(VTE)管理指南。相关指南指出,危重深静脉血栓患者需要进行风险评估,对于危重患者需要进行相应的预防措施。所以,在临床中需要安全、可靠的DVT风险评估方法评估患者发病情况,及时采取预防措施,减少DVT危重并发症的发生率^[7-10]。由Caprini制订的血栓风险评估量表,经西方国家进行大样本试验验证,于2009年修订,证明Caprini血栓风险评估量表具有安全性和可操作性,可以作为危重DVT患者的评估方法^[11-13]。本研究根据Caprini危险因素分析表对收集的患者进行分析并使用帕多瓦分数预测DVT危险度分级。采用多因素Logistic回归模型分析危重深静脉血栓患者的危险因素,报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2016年1月—2019年1月空军军医大学第一附属医院呼吸内科诊治的危重深静脉血栓(DVT)患者58例为病例组(A组),以同期住院的深静脉血栓非危重患者58例为对照组(B组)。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1)纳入标准:危重深静脉血栓患者在ICU住院时间>2 d;按照危重病医学会(SCCM)诊断确诊;通过上、下肢静脉彩色超声确诊。(2)排除标准:曾入院治疗肺栓塞或深静脉血栓形成;活动性出血或近期失血;抗凝治疗;收缩压>200 mmHg或舒张压>120 mmHg;孕妇。

1.3 治疗方法 A组患者进行抗血栓治疗,通过Caprini危险因素分析表进行评估,并根据结果进行相关干预,0~1分患者不需要特殊处理,仔细观察,鼓励患者尽早下床活动;2分患者皮下注射小剂量肝素(8 000 U/次,2次/d),对患者进行肢体训练;3~4分

患者皮下注射小剂量肝素(8 000 U/次,3次/d),同时对患者DVT机械预防,穿戴抗血栓弹力袜,保证患者可以自主活动;≥5分患者使用空气压力治疗仪或血栓压力带,密切观察患者病情。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 临床资料:收集2组包括性别、年龄、入住ICU第1天的白细胞计数(WBC)、血红蛋白(Hb)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)、GCS评分、体质量指数、吸烟史、D-二聚体水平、血液黏度、住院病死率、原发疾病、合并症、既往史和家族史等资料。

1.4.2 血液流变学指标检测:于入院次日清晨采集患者空腹静脉血5 ml,加入肝素作为抗凝剂,采用重庆南方数控设备有限公司生产的全自动血液黏度动态分析仪检测全血黏度等指标,均在4 h内完成。患者在干预前1 d用超声[Acuson Antares 西门子(中国)有限公司]测量第一次血流动力学指标,干预后,再由同一位超声医师监测患者活动后的血流动力学指标,包括血流峰速、血流平均速度。

1.4.3 DVT风险评分及危险度分级^[3]:得分范围为0~20分,分值越高,危险系数越高,见表1。

表1 帕多瓦预测分数

风险因素	分数
癌症 ^a	3
以前的VTE(排除浅静脉血栓形成) ^b	3
行动不便 ^c	3
血栓形成的病症 ^d	3
最近(≤1个月)创伤和/或手术	2
老年人(≥70岁)	1
心力衰竭和/或呼吸衰竭	1
急性心肌梗死或缺血性卒中	1
急性感染和/或风湿病	1
肥胖(BMI≥30 kg/m ²)	1
正在进行激素治疗	1

注:a.有局部或远处转移或在过去6个月进行化疗或放疗的患者;
b. VTE为静脉血栓;c. 预计卧床休息至少3 d;d. 在Padua预测评分风险评估模型中,累计评分≥4分为VTE高风险性

1.5 统计学方法 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用两独立样本t检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用χ²检验。采用多因素Logistic回归模型分析DVT危险度分级与危重深静脉血栓患者的关系。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组临床资料比较 A、B组患者性别、年龄、

GCS 评分、体质量指数、吸烟史、白细胞、红细胞、血小板、血红蛋白、原发疾病、合并症、既往史、家族史等资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而 A 组患者血液黏度、D-二聚体水平、住院病死率高于 B 组($P < 0.05$),见表 2。

2.2 2 组血流指标比较 与干预前比较,2 组干预后血流平均速度和血流峰速度均增加($P < 0.01$),且 A 组患者增加幅度大于 B 组($P < 0.01$),见表 3。

表 3 2 组患者干预前后血流指标比较 ($\bar{x} \pm s$, cm/s)

组 别	时间	血流平均速度	血流峰速度
A 组 ($n = 58$)	干预前	24.38 $\pm$ 3.46	15.34 $\pm$ 2.03
	干预后	55.36 $\pm$ 3.95	30.48 $\pm$ 2.94
B 组 ($n = 58$)	干预前	25.41 $\pm$ 3.24	16.35 $\pm$ 2.34
	干预后	30.23 $\pm$ 3.05	20.42 $\pm$ 3.72
t/P A 组内值		44.931/0.000	32.273/0.000
t/P B 组内值		8.249/0.000	6.537/0.000
t/P 干预后组间值		38.350/0.000	16.158/0.000

2.3 2 组 DVT 风险评分及危险度分级比较 A 组患者帕多瓦分数显著高于 B 组($P < 0.01$);危险度分级中,A 组高危和极高危患者 49 例(84.49%),高于 B 组患者的 26 例(44.83%)($P < 0.01$);A 组低危、中危患者低于 B 组($P < 0.01$),见表 4。

2.4 DVT 发病风险的 Logistic 回归分析 DVT 风险评分 ≥ 5 分,血流平均速度和血流峰速度降低,血液黏度和 D-二聚体增高是 DVT 发病的独立危险因素(P 均 < 0.05),见表 5。

3 讨 论

深静脉血栓形成(DVT)是一种重要的医学难题,其特征在于深静脉系统中的血栓形成,并且可导致致命的肺栓塞(PE)^[14-18]。尽管 DVT 的住院内病死率仅为 5%,但住院 1 年、3 年和 5 年的病死率分别为 22%、30% 和 39%。早期 DVT 死亡原因最常见于癌症、PE 和心脏病^[19-22]。在 45 岁以上的患者中,癌症是早期死亡的最重要预测因子,而无癌症患者病死率则为

表 2 2 组患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	A 组($n = 58$)	B 组($n = 58$)	χ^2/t 值	P 值
男[例(%)]	30(51.72)	32(55.17)	1.352	0.481
年龄(岁)	60.37 $\pm$ 12.45	62.48 $\pm$ 10.34	1.256	0.398
GCS 评分(分)	12.43 $\pm$ 2.34	13.39 $\pm$ 3.04	1.906	0.059
体质量指数(kg/m ²)	24.89 $\pm$ 3.18	23.57 $\pm$ 3.78	1.267	0.285
吸烟史	33(56.90)	35(60.34)	2.867	0.123
白细胞($\times 10^9/L$)	6.78 $\pm$ 2.89	6.92 $\pm$ 3.02	-0.652	0.376
红细胞($\times 10^{12}/L$)	3.37 $\pm$ 1.67	3.41 $\pm$ 1.95	-0.737	0.414
血小板($\times 10^9/L$)	190.45 $\pm$ 35.75	192.64 $\pm$ 53.69	0.781	0.166
血红蛋白(g/L)	121.48 $\pm$ 26.83	123.49 $\pm$ 28.34	-1.491	0.242
血液黏度(mPa·s)	10.44 $\pm$ 1.03	9.48 $\pm$ 1.42	4.168	0.000
D-二聚体(mg/L)	2.39 $\pm$ 0.35	1.96 $\pm$ 0.57	4.896	0.000
住院病死率[例(%)]	4(6.90)	1(1.72)	3.978	0.011
原发疾病[例(%)]			0.258	0.879
重症急性胰腺炎	21(36.21)	23(39.66)		
重症肺炎	24(41.38)	24(41.38)		
创伤	13(22.41)	11(18.97)		
合并症[例(%)]				
高血压病	7(12.07)	5(8.62)	0.372	0.542
糖尿病	5(8.62)	2(3.45)	0.608	0.435
高脂血症	6(10.34)	4(6.90)	0.109	0.741
既往深静脉血栓病史[例(%)]	4(6.90)	1(1.72)	0.836	0.361
家族深静脉血栓病史[例(%)]	4(6.90)	1(1.72)	0.836	0.361

表 4 2 组患者 DVT 风险评分及危险度分级比较

组 别	例数	帕多瓦分数 ($\bar{x} \pm s$, 分)	危险度分级[例(%)]			
			低(0~1 分)	中(2 分)	高(3~4 分)	极高(≥ 5 分)
A 组	58	10.36 $\pm$ 2.03	3(5.17)	6(10.34)	15(25.86)	34(58.63)
B 组	58	5.21 $\pm$ 1.78	15(25.86)	17(29.31)	18(31.03)	8(13.80)
χ^2/t 值		2.055	4.359	4.467	4.343	4.248
P 值		0.005	0.006	0.008	0.002	0.001

表 5 DVT 发病风险的 Logistic 回归分析

变 量	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
DVT 风险评分 ≥ 5 分	0. 863	0. 453	4. 712	0. 004	1. 524	1. 184 ~ 3. 781
血流平均速度	0. 953	0. 433	4. 437	0. 034	1. 595	1. 065 ~ 5. 886
血流峰速度	0. 728	0. 403	3. 892	0. 023	1. 485	1. 104 ~ 3. 562
血液黏度	0. 712	0. 402	3. 892	0. 020	1. 482	1. 102 ~ 3. 562
D-二聚体	0. 755	0. 389	3. 785	0. 037	1. 248	1. 064 ~ 2. 894

12.6%^[23-25]。临床上,特发性 DVT 与心血管事件可能存在关联。研究表明^[26-27],特发性 DVT 患者中 10 年累积的症状性血管事件风险为 25.4%,而继发性 DVT 患者为 12.9%。与未发生 DVT 的对照组比较,特发性 DVT 患者的动脉粥样硬化危险因素(糖尿病、高血压和高胆固醇血症)和冠状动脉钙化的患病率更高。DVT 最常发生在腿部,也可以在手臂的静脉中形成。在美国,每年 DVT 和 PE 导致多达 60 万人住院,并且由于 PE,每年有近 5 万人死亡。髋关节置换术、膝关节置换术和髌部骨折矫形外科手术与发生 DVT 的风险密切相关^[28-30]。相关数据统计,骨科手术无症状 DVT 的发生率为 30%~80%,有症状 DVT 的发生率为 0.5%~4%。实际上,无症状的 DVT 很少引起症状性 PE,大多数无症状的 DVT 病例包括通过静脉造影检测到小腿的孤立 DVT。DVT 预防的目的是防止致命 PE,阐明对症 DVT 的发生率,作为 PE 的替代标记,是至关重要的。

本研究结果显示,DVT 风险评分 ≥ 5 分,血流平均速度和血流峰速度降低,血液黏度和 D-二聚体水平增高是 DVT 发病的独立危险因素(P 均 <0.05)。DVT 风险评分是目前临床常用的评分方法,其目的是评估患者 DVT 发生风险,得分越高,其 DVT 风险越大,目前已经在许多临床试验中证实了 DVT 风险评分是预测 DVT 发生的指标^[31-32],与本研究一致。此外,血流平均速度和血流峰速度降低,血液黏度和 D-二聚体增高表示静脉血回流缓慢、受阻,更容易形成血栓。因此应该常规检测此类血液流变学的改变,对于 DVT 风险较高的患者,应该加强抗凝,以降低 DVT 的发生率。

综上所述,Caprini 血栓风险评估量表和血液流变学可以较好反映 DVT 危险度分级与危重深静脉血栓患者危险因素的关系。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

朱丽:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;左秀萍:课题设计,实施研究过程,论文修改;张美霞:课题设计,实施研究过程,论文修改;徐梦:进行统计学分析;张朋勃:实施研究过程,数据收集,分析整理;宋娟:资料搜集整理;高苗:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

参考文献

[1] Guo X, Zhang F, Wu Y, et al. Coagulation alternation and deep venous thrombosis in brain tumor patients during the perioperative period[J]. World Neurosurgery, 2018, 114: e982-e991. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.03.128.

[2] Needleman L, Cronan JJ, Lilly MP, et al. Ultrasound for lower extremity deep venous thrombosis: Multidisciplinary recommendations from the society of radiologists in ultrasound consensus conference [J]. Circulation, 2018, 137(14):1505-1515. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030687.

[3] Schomburg JL, Krishna S, Cotter KJ, et al. Preoperative incidence of deep venous thrombosis in bladder cancer patients undergoing radical cystectomy[J]. Urology, 2018, 116: 120-124. DOI: 10.1016/j.urolgy.2018.01.052.

[4] Rodriguez LE, Aponte-Rivera F, Figueroa Vicente R, et al. Hybrid operative thrombectomy for the treatment of symptomatic iliofemoral deep venous thrombosis: Initial experience and midterm results[J]. Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders, 2015, 3(1):131. DOI: 10.1016/j.jvsv.2014.10.041.

[5] Pomeranz CB, Cullen DL, Bellah RD. Deep venous thrombosis in a child with inferior vena cava and renal anomalies: KILT syndrome [J]. Pediatric Radiology, 2018, 48(10):1521-1525. DOI: 10.1007/s00247-018-4155-3.

[6] Du YQ, Tang J, Zhang ZX, et al. Correlation of interleukin-18 and high-sensitivity C-reactive protein with perioperative deep vein thrombosis in patients with ankle fracture[J]. Annals of Vascular Surgery, 2019, 54:282-289. DOI: 10.1016/j.avsg.2018.06.013.

[7] Davies GA, Lazo-Langner A, Gandara E, et al. A prospective study of Rivaroxaban for central venous catheter associated upper extremity deep vein thrombosis in cancer patients (Catheter 2)[J]. Thrombosis Research, 2017, 162: 566-578. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.04.003.

[8] 卫尹, 曹艳佩, 杨晓莉, 等. 基于循证的长期卧床老年患者深静脉血栓(DVT)的预防管理实践[J]. 复旦学报:医学版, 2019, 46(5):700-703. DOI:10.3969/j.issn.1672-8467.2019.05.022.

[9] Ponomaryov T, Payne H, Fabritz L, et al. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice[J]. Circulation Research, 2017, 121(8): 941-950. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311185.

[10] Bakkali T, Hormatallah M, Bounssir A, et al. False aneurysm of the popliteal artery complicated by a deep venous thrombosis revealing an exostosis in a 20-year-old young woman[J]. Annals of Vascular Surgery, 2018, 10(8): 303-308. DOI: 10.1016/j.avsg.2018.03.039.

- [11] Alkindi SY, Chai-Adisaksopha C, Cheah M, et al. Management of cancer-associated upper extremity deep vein thrombosis with and without venous catheters at a tertiary care center [J]. *Thrombosis Research*, 2018, 166:92-95. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.03.020.
- [12] Archie M, Archie M, O'Connell J, et al. Underutilization of thrombolytic therapy for patients diagnosed with acute deep venous thrombosis in the outpatient setting [J]. *Annals of Vascular Surgery*, 2018, 49(2):255-260. DOI: 10.1016/j.avsg.2018.02.005.
- [13] Nakano F, Matsubara T, Ishigaki T, et al. Incidence and risk factor of deep venous thrombosis in patients undergoing craniotomy for brain tumors: A Japanese single-center, retrospective study [J]. *Thrombosis Research*, 2018, 165:95-100. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.03.016.
- [14] Chaudhary R, Damluji A, Batukbhai B, et al. Venous thromboembolism prophylaxis: Inadequate and overprophylaxis when comparing perceived versus calculated risk [J]. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 2017, 1(3):242-247. DOI: 10.1016/j.mayocpiqo.2017.10.003.
- [15] Nathan AS, Giri J. Reexamining the open-vein hypothesis for acute deep venous thrombosis [J]. *Circulation*, 2019, 139(9):1174-1176. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037903.
- [16] Komiya S, Nagashima M, Taniguchi T, et al. Bevacizumab plus direct oral anticoagulant therapy in ovarian cancer patients with distal deep vein thrombosis [J]. *Clinical Drug Investigation*, 2019, 39(4):395-400. DOI: 10.1007/s40261-019-00757-w.
- [17] Pettinari I, Vukotic R, Stefanescu H, et al. Clinical impact and safety of anticoagulants for portal vein thrombosis in cirrhosis [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2018, 114(2):658-671. DOI: 10.1038/s41395-018-0421-0.
- [18] Diaz JA, Saha P, Cooley B, et al. Choosing a mouse model of venous thrombosis: A consensus assessment of utility and application [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17(4):699-707. DOI: 10.1111/jth.14413.
- [19] Kyrle PA, Eischer L, Sinkovec H, et al. Factor XI and recurrent venous thrombosis: An observational cohort study [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17(5):561-574. DOI: 10.1111/jth.14415.
- [20] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南 [J]. *中华普通外科杂志*, 2008, 23(3):235-238. DOI: 10.3760/j.issn:1007-631X.2008.03.032.
- [21] Arenas de Larrivo AP, Alonso A, Norby FL, et al. Circulating ceruloplasmin, ceruloplasmin-associated genes, and the incidence of venous thromboembolism in the Atherosclerosis Risk in Communities study [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17(5):818-826. DOI: 10.1111/jth.14420.
- [22] Hoiland II, Liang RA, Braekkan SK, et al. Complement activation assessed by the plasma terminal complement complex and future risk of venous thromboembolism [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17(6):156-167. DOI: 10.1111/jth.14438.
- [23] 张辉, 庄万强, 唐毅, 等. 纤维蛋白单体和 D-二聚体联合检测在老年髋部骨折患者术后深静脉血栓形成中的预测价值 [J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(8):827-830. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.08.017.
- [24] 何梅, 曾艾, 潘建春, 等. 不同健康状况人工关节置换术患者的血液指标及术后下肢深静脉血栓形成情况比较 [J]. *中国医药*, 2019, 14(10):1558-1561. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2019.10.029.
- [25] 许婉婷, 王宝彦, 方芸. 368 例下肢深静脉血栓患者临床危险因素分析 [J]. *中国现代医生*, 2019, 57(5):9-12, 15.
- [26] Becattini C, Giustozzi M, Cerdà P, et al. Risk of recurrent venous thromboembolism after acute pulmonary embolism: Role of residual pulmonary obstruction and persistent right ventricular dysfunction. A meta-analysis [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17(2):10-15. DOI: 10.1111/jth.14477.
- [27] Stelfox HT, Brundin-Mather R, Soo A, et al. A multicentre controlled pre-post trial of an implementation science intervention to improve venous thromboembolism prophylaxis in critically ill patients [J]. *Intensive Care Medicine*, 2019, 45(2):211-222. DOI: 10.1007/s00134-019-05532-1.
- [28] 何志婷, 刘琼, 梁维, 等. 尿激酶联合阿加曲班对维持性血液透析患者长期血管通路急性血栓形成后溶栓治疗及预防的效果 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(9):909-913. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.09.011.
- [29] 魏星星. 补气活血方加减对骨科术后下肢深静脉血栓患者白介素-6、C-反应蛋白和纤维蛋白原的影响 [J]. *中国当代医药*, 2019, 26(2):205-208. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2019.02.065.
- [30] 庄强, 卢水生, 严胜军. 益气活血法预防全髋关节置换术后下肢深静脉血栓形成的临床研究 [J]. *中国现代医生*, 2018, 56(13):123-125.
- [31] 王鑫丹, 黄静, 赵冰冰, 等. 不同风险评估模型对妇科恶性肿瘤相关深静脉血栓形成的预测价值比较 [J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(6):409-413. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfekjz.2018.06.003.
- [32] 张巍, 王鹏, 许士超, 等. 髋关节置换术后不同给药周期利伐沙班预防下肢深静脉血栓的效果及安全性分析 [J]. *中国当代医药*, 2019, 26(28):123-126. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2019.28.037.

(收稿日期:2019-09-12)

非酒精性脂肪性肝病与幽门螺杆菌感染的相关性

唐君瑞,李明珂,曹光琼,吕俊衍,褚倚佑,李春媚,张丹,罗粟凤,王金香,马岚青

基金项目: 国家自然科学基金(81560099); 云南省教育厅科学研究基金(2016ZDX054)

作者单位: 650032 昆明医科大学第一附属医院消化内科/云南省消化病研究所(唐君瑞、李明珂、吕俊衍、褚倚佑、李春媚、张丹、罗粟凤、王金香、马岚青); 健康管理中心(曹光琼)

通信作者: 马岚青, E-mail: malanqing@aliyun.com

【摘要】目的 分析非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)与幽门螺杆菌(Hp)感染的相关性。**方法** 随机选取 2016 年 5 月—2018 年 1 月昆明医科大学第一附属医院健康管理中心体检者 3 053 例,收集其体检数据,并根据肝脏超声结果,将符合纳入标准者 2 409 例分为 NAFLD 病组($n=741$)和对照组($n=1\ 668$),比较 2 组 Hp 感染情况。应用 Spearman 相关分析 NAFLD 与 Hp 感染的关系。**结果** Hp 感染总体检出率为 34.21% (824/2 409),NAFLD 组 Hp 感染率较对照组明显升高(41.43% vs. 31.00%, $\chi^2/P=24.364/ < 0.01$)。NAFLD 组 BMI、ALT、AST、UA、FPG、TC、TG、LDL-C 和 NAFLD 纤维化评分(NFS)均明显高于对照组,HDL-C 低于对照组($P<0.01$)。随着脂肪肝严重程度增加,Hp 感染程度差异无统计学意义($P>0.05$)。NAFLD 组内,脂肪肝严重程度与 BMI、ALT、AST、UA、TG 水平呈正相关,与 HDL-C 水平呈负相关,差异均有统计学意义($P<0.05$);脂肪肝严重程度与 Hp 感染程度不相关($P>0.05$)。**结论** Hp 感染与 NAFLD 相关,Hp 感染可能是 NAFLD 发病的危险因素,但是 NAFLD 严重程度与 Hp 感染程度无关。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病;幽门螺杆菌;相关性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.006

The relationship between non-alcoholic fatty liver disease and helicobacter pylori infection Tang Junrui*, Li Mingke, Cao Guangqiong, Lyu Junyan, Chu Yiyong, Li Chunmei, Zhang Dan, Luo Sufeng, Wang Jinxiang, Ma Lanqing. * First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Province, Kunming 650032, China

Corresponding author: Ma Lanqing, E-mail: malanqing@aliyun.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560099); Scientific Research Foundation of the Education Department of Yunnan Province(2016ZDX054).

【Abstract】Objective To analyze the correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and Helicobacter pylori (Hp) infection. **Methods** From May 2016 to January 2018, a total of 3 053 physical examinees were randomly selected from the health management center of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. According to the results of liver ultrasound, 2 409 patients were divided into NAFLD group ($n=741$) and control group ($n=1\ 668$). Hp infection was compared between the two groups. The relationship between NAFLD and Hp infection was analyzed by Spearman correlation. **Results**

The total physical examination rate of Hp infection was 34.21% (824/2 409). The Hp infection rate of NAFLD group was significantly higher than that of the control group (41.43% vs. 31.00%, $\chi^2/P=24.364/ < 0.01$). BMI, ALT, AST, UA, FPG, TC, TG, LDL-C and NAFLD fibrosis score (NFS) in NAFLD group were significantly higher than those in the control group, while HDL-C was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). With the increase of fatty liver severity, there was no significant difference in Hp infection ($P>0.05$). In NAFLD group, the severity of fatty liver was positively correlated with BMI, alt, AST, UA, TG, and negatively correlated with HDL-C ($P<0.05$). There was no correlation between the severity of fatty liver and Hp infection ($P>0.05$). **Conclusion** Hp infection is related to NAFLD, Hp infection may be a risk factor of NAFLD, but the severity of NAFLD is not related to the degree of Hp infection.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease; Helicobacter pylori; Correlation

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒的情况下肝脏发生以

肝实质细胞和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。在欧美等发达国家,NAFLD 流行率高达 20% ~ 30%,并

且是导致肝细胞癌及肝移植等待队列的第二位病因^[1-2]。随着我国肥胖及其相关代谢综合征逐渐增多, NAFLD 成为一种危害公共健康的常见疾病, 并且有低龄化趋势^[3]。现在普遍认为, NAFLD 不仅是一个独立的疾病, 还是全身性疾病在肝脏的病理过程, 与胰岛素抵抗(IR) 和遗传易感密切相关^[4]。幽门螺杆菌是慢性胃炎及消化性溃疡的重要致病因子, 与胃黏膜相关淋巴组织(mucosal-associated lymphoid tissue, MALT) 淋巴瘤、胃癌的发生有密切关系。然而, 近年来一些研究表明, Hp 感染与动脉粥样硬化心血管疾病、糖尿病等代谢性疾病有关^[5]。潜在机制可能是 Hp 感染参与了氧化应激反应、免疫交叉反应、血压升高、血脂异常、糖耐量异常和胰岛素抵抗等病理生理过程^[6]。近期有研究报道, Hp 感染是 NAFLD 发病的独立危险因素^[7]。但是, 目前国内外 Hp 感染与 NAFLD 相关性的研究数量不多, Hp 感染与 NAFLD 之间的关联尚难以确定。因此, 现分析 NAFLD 患者的 Hp 感染状况及其是否为 NAFLD 发病的危险因素, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 随机选取 2016 年 5 月—2018 年 1 月昆明医科大学第一附属医院健康管理中心体检者 3 053 例, 收集其体检数据, 其中行¹⁴C-UBT、肝脏超声检查者 2 409 例。并根据肝脏超声结果分为非酒精性脂肪性肝病组(NAFLD) 组($n = 741$) 和对照组($n = 1 668$) , 见表 1。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准: 体检数据完整。(2) 排除标准: ①不愿意参加本次调查者; ②有饮酒史或折合乙醇摄入量男性 ≥ 140 g/周, 女性 ≥ 70 g/周; ③有病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性、自身免疫性肝病等可导致脂肪肝的特定疾病; ④近 1 个月曾服用抗生素、铋剂、质子泵抑制剂(PPI) 、H₂ 受体拮抗剂者; ⑤近 1 周有上消化道出血病史; ⑥有认知功能障碍或精神疾病者; ⑦有严重心血管疾病、肝肾功能不全者; ⑧有胃全切或胃部分切除手术史者。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 一般资料和体格检查: 设计问卷调查表, 了解检查者的一般情况(性别、年龄) 、生活史(吸烟、饮酒史) 及慢性病史(高血压或糖尿病史) 。由训练有素的专职人员统一测量身高、体质量、血压及体质指数(BMI) 。

1.3.2 ¹⁴C-尿素呼气试验(¹⁴C-UBT) : 采用深圳市中核海得威生物科技有限公司产品 HUBT-20A2 型幽门螺杆菌测试仪, 由专职人员进行检测, 当样品碳¹⁴C 放射性(CPM) ≥ 50 , 判定为阳性, 考虑有 Hp 感染。

1.3.3 肝脏超声检查: 应用飞利浦数字彩色多普勒超

声诊断仪, 由 2 名超声专业医师进行诊断, 并统一出具报告。根据 2010 年中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南”^[8], 肝脏超声具备以下 3 项中的 2 项, 可诊断为非酒精性脂肪性肝病: (1) 肝脏近场回声弥漫性增强, 回声强于肾脏; (2) 肝内管道结构显示不清; (3) 肝脏远场回声逐渐衰减。

1.3.4 血清学指标检测: 受试者空腹 12 h 后清晨采集肘静脉血 10 ml, 使用美国贝克曼库尔特公司 AU5800 全自动生化分析系统检测丙氨酸氨基转移酶(ALT) 、天冬氨酸氨基转移酶(AST) 、三酰甘油(TG) 、总胆固醇(TC) 、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 、尿酸(UA) 、空腹血糖(FPG) 、血清白蛋白(ALB) 、血小板(PLT) 水平。

1.3.5 建立无创诊断模型: 在上述指标基础上进行非酒精性脂肪性肝病纤维化评分(NAFLD fibrosis score, NFS)^[9]。NAFLD NFS = $-1.675 + 0.037 \times \text{年龄(年)} + 0.094 \times \text{BMI(kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/糖尿病(是} = 1, \text{否} = 0) + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{血小板(} \times 10^9/\text{L)} - 0.66 \times \text{血清白蛋白(g/dl)}$ 。结果判断: NFS < -1.455 分, 提示检查者可能不存在肝纤维化; NFS > 0.676 分, 提示检查者可能存在肝纤维化。

1.4 统计学方法 采用 R 语言进行统计学分析。正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 计数资料以频数或率(%) 表示, 比较采用 χ^2 检验; 相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较 NAFLD 组年龄、患高血压人数、BMI、ALT、AST、UA、FPG、TC、TG、LDL-C 和 NFS 均明显高于对照组, 而 HDL-C 明显低于对照组($P < 0.001$) , 男性人群 NAFLD 阳性检出率明显高于女性(男性 46.31%, 女性 18.89%, $P < 0.001$) , 见表 1。NAFLD 的检出率为 30.76% (741/2 409) , Hp 检出率为 34.21% (824/2409) , 见表 2。

2.2 2 组 Hp 感染情况比较 NAFLD 组 Hp 阳性检出率(41.43%) 高于对照组(31.00%) , 差异有统计学意义($\chi^2 = 24.364, P < 0.001$) , 见表 2。

表 2 2 组 Hp 感染情况比较 [例(%)]

组 别	例数	Hp	非 Hp	阳性检出率(%)
对照组	1 668	517(31.00)	1 151(69.00)	31.00
NAFLD 组	741	307(41.43)	434(58.57)	41.43
总计	2 409	824(34.21)	1 585(65.79)	34.21

2.3 NAFLD 组内 Hp 感染阳性/阴性临床资料比较

NAFLD 组内,根据¹⁴C-UBT 数值分为 Hp 感染阳性及 Hp 感染阴性 2 个亚组,男性 Hp 阳性检出率(45.76%)高于女性(33.33%)($P < 0.01$),Hp 感染阳性亚组年龄、UA 水平高于 Hp 感染阳性亚组($P < 0.05$),而 2 组其余指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.4 脂肪肝严重程度与 Hp 感染程度相关性 将 NAFLD 组以脂肪肝严重程度分为 3 个亚组:轻度脂肪肝亚组、中度脂肪肝亚组、重度脂肪肝亚组。由于重度脂肪肝仅有 1 例,样本量较小,将其排除,仅剩余轻度脂肪肝亚组、中度脂肪肝亚组。比较轻度脂肪肝亚组、中度脂肪肝亚组、对照组中¹⁴C-UBT 的数值,经过 Spearman 相关分析后,各脂肪肝亚组¹⁴C-UBT 数值与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。中度脂肪肝亚组 BMI、ALT、AST、UA 和 TG 水平高于轻度脂肪肝亚组,HDL-C 水平低于轻度脂肪肝亚组($P < 0.05$)。然而,2 个亚组¹⁴C-UBT 数值比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

2.5 脂肪肝严重程度与 Hp 感染、各项临床指标的相关性分析 NAFLD 组内,脂肪肝严重程度与 BMI、ALT、AST、UA、TG 水平呈正相关,与 HDL-C 水平呈负相关,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。脂肪肝严重程度与 Hp 感染程度不相关($r = 0.031, P > 0.05$),见表 5。

表 5 NAFLD 组内脂肪肝严重程度与 Hp 感染、各项临床指标的相关性分析

	BMI	ALT	AST	UA	TG	HDL-C
<i>r</i> 值	0.333	0.229	0.174	0.081	0.168	-0.082
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	0.027	<0.001	0.027

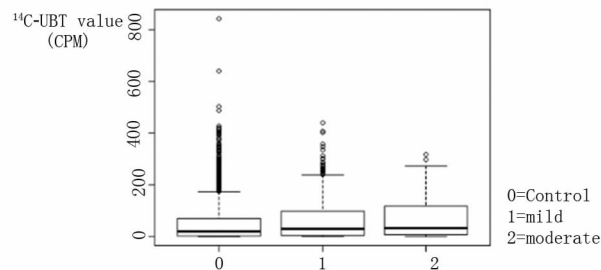


图 1 轻度脂肪肝亚组、中度脂肪肝亚组、对照组中¹⁴C-UBT 的数值比较

3 讨论

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是最常见的慢性肝脏疾病。世界范围内 NAFLD 的患病率为 25.24%,其中,中东患病率最高为 31.79%,而非洲最低为 13.48%^[10]。包括中国在内的亚洲多数国家 NAFLD 患病率 > 25%,中国 NAFLD 患病率变化与肥胖症、T2DM 和代谢综合征流行趋势相平行,NAFLD 目前已成为健康体检血清 ALT 和 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 增高的主要原因^[11]。本研究显示,NAFLD 的阳性检出率为 30.76%,NAFLD 组代谢相关指标如 BMI、患高血压人数、血糖、血脂、血尿酸与对照组均有明显差异,表明 NAFLD 与代谢紊乱有关。NAFLD 与肥胖、2 型糖尿病、心血管疾病和血脂异常等一系列代谢综合征的代谢紊乱表现密切相关,是代谢综合征在肝脏的一种表现^[12]。Kawaguchi 等^[13]认为,即使 NAFLD 患者并没有肥胖,代谢综合征也与 NAFLD 的进展密切相关。其中,胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 在 NAFLD 的发病机制中具有关键作用,胰岛素抵抗参与了 NAFLD 的“多重打击”学说^[14-15]。多重因素包括胰岛素抵抗、脂毒性、内质网应激、细胞因子、肠道菌群改变、药物、遗

表 1 2 组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	NAFLD 组 ($n = 741$)	对照组 ($n = 1\ 668$)	t/χ^2 值	<i>P</i> 值
男/女 (例)	483/258	560/1 108	207.518	<0.001
年龄 (岁)	46.71 $\pm$ 13.47	39.22 $\pm$ 14.07	12.421	<0.001
高血压 [例 (%)]	179 (24.16)	113 (6.77)	143.900	<0.001
BMI (kg/m ²)	25.22 $\pm$ 2.89	21.44 $\pm$ 2.51	30.847	<0.001
ALB (g/L)	46.68 $\pm$ 2.55	46.95 $\pm$ 14.46	0.759	0.448
ALT (U/L)	30.62 $\pm$ 24.22	16.77 $\pm$ 11.40	14.852	<0.001
AST (U/L)	23.30 $\pm$ 12.84	18.28 $\pm$ 6.31	10.113	<0.001
UA (μ mol/L)	410.60 $\pm$ 144.55	325.00 $\pm$ 82.88	15.057	<0.001
FPG (mmol/L)	5.04 $\pm$ 1.37	4.58 $\pm$ 0.84	8.419	<0.001
TC (mmol/L)	4.87 $\pm$ 0.96	4.50 $\pm$ 1.26	7.854	<0.001
TG (mmol/L)	2.38 $\pm$ 2.32	1.33 $\pm$ 3.20	9.112	<0.001
HDL-C (mmol/L)	1.21 $\pm$ 0.67	1.50 $\pm$ 0.47	10.643	<0.001
LDL-C (mmol/L)	3.22 $\pm$ 0.84	2.81 $\pm$ 1.11	10.016	<0.001
PLT ($\times 10^9$ /L)	218.85 $\pm$ 53.80	220.53 $\pm$ 53.53	0.706	0.480
NFS (分)	-2.46 $\pm$ 1.24	-2.86 $\pm$ 1.55	6.683	<0.001

表 3 NAFLD 组内 Hp 感染阳性/阴性临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	Hp($n=307$)	非 Hp($n=434$)	t/χ^2 值	P 值
男/女(例)	221/86	262/172	10.189	0.001
年龄(岁)	48.33 ± 12.39	45.56 ± 14.08	2.825	0.005
高血压[例(%)]	85(27.69)	94(21.66)	3.245	0.072
BMI(kg/m ²)	25.39 ± 2.74	25.10 ± 2.98	1.364	0.173
ALB(g/L)	46.46 ± 2.66	46.83 ± 2.46	1.932	0.054
ALT(U/L)	29.56 ± 18.04	31.37 ± 27.77	1.078	0.282
AST(U/L)	22.55 ± 9.05	23.83 ± 14.93	1.451	0.147
UA(μmol/L)	425.55 ± 193.77	400.02 ± 94.37	2.137	0.033
FPG(mmol/L)	5.05 ± 1.38	5.03 ± 1.37	0.221	0.825
TC(mmol/L)	4.88 ± 1.04	4.86 ± 0.90	0.258	0.797
TG(mmol/L)	2.58 ± 3.04	2.24 ± 1.62	1.788	0.074
HDL-C(mmol/L)	1.20 ± 0.72	1.22 ± 0.63	0.261	0.795
LDL-C(mmol/L)	3.22 ± 0.93	3.21 ± 0.77	0.246	0.805
PLT($\times 10^9/L$)	217.61 ± 53.34	219.73 ± 54.17	0.531	0.595
NFS(分)	-2.36 ± 1.20	-2.53 ± 1.26	1.807	0.071

表 4 NAFLD 组内不同脂肪肝严重程度临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	轻度脂肪肝亚组($n=664$)	中度脂肪肝亚组($n=77$)	t/χ^2 值	P 值
男/女(例)	427/237	56/21	1.800	0.180
年龄(岁)	46.94 ± 13.56	44.73 ± 12.56	1.449	0.151
高血压[例(%)]	150(22.59)	29(37.66)	7.752	0.005
BMI(kg/m ²)	24.89 ± 2.69	28.04 ± 3.02	8.760	<0.001
¹⁴ C-UBT 值(CPM)	63.10 ± 77.75	71.10 ± 82.50	0.811	0.420
ALT(U/L)	28.73 ± 19.80	46.86 ± 44.63	3.525	<0.001
AST(U/L)	22.54 ± 10.89	29.84 ± 22.83	2.769	0.007
UA(μmol/L)	406.59 ± 148.34	445.12 ± 100.66	3.002	0.003
FPG(mmol/L)	5.01 ± 1.38	5.29 ± 1.32	1.761	0.08
TC(mmol/L)	4.86 ± 0.94	5.00 ± 1.10	1.111	0.269
TG(mmol/L)	2.25 ± 1.76	3.53 ± 4.90	2.270	0.026
HDL-C(mmol/L)	1.23 ± 0.70	1.05 ± 0.24	4.618	<0.001
LDL-C(mmol/L)	3.21 ± 0.82	3.30 ± 1.01	0.735	0.464
NFS(分)	-2.47 ± 1.24	-2.33 ± 1.20	0.986	0.327

传和表观遗传因素等。

幽门螺杆菌(Hp)是一种人与人之间经口传播的感染性疾病,我国目前 Hp 感染率为 40% ~ 60%,是 Hp 高感染率国家^[16]。男性较女性更易感染,原因可能是女性因其他因素服用抗生素频率更高,偶然间清除了 Hp^[17]。本研究中 Hp 阳性检出率为 34.21%,NAFLD 组内男性 Hp 阳性检出率较女性明显升高,与大多数研究相符。一旦感染 Hp,10% ~ 15% 感染者发展为消化性溃疡,约 5% 发生胃黏膜萎缩,<1% 的感染者发展为胃癌或 MALT 淋巴瘤^[16]。近年来,许多研究发现,Hp 与心血管疾病、神经系统疾病、代谢性疾病如糖尿病有关^[18]。前述 Hp 感染与代谢性疾病有关的潜在机制是 Hp 感染参与了胰岛素抵抗的病理生理过程^[6]。基于 Hp 感染和 NAFLD 与胰岛素抵抗均有联系,设想 Hp 感染和 NAFLD 具有相关性。但是,目前许多相关研究具有争议。Sumida 等^[19]一项试验表

明,Hp 阳性患者肝细胞气球样变更加严重,提示 Hp 感染可能在非酒精性脂肪肝(NAFLD)发展为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的过程中起到了促进作用,而根除 Hp 可能对 NASH 的治疗有帮助。Abdel-Razik 等^[20]认为 Hp 通过胰岛素抵抗、炎性介质、脂质代谢等途径促进 NAFLD 的发生发展,根除 Hp 可以降低患 NAFLD 的风险。但 Fan 等^[21]通过研究后认为,Hp 感染与 NAFLD 的发生发展无明显相关性。

本研究通过大样本的流行病学调查,发现 NAFLD 组 Hp 阳性检出率较对照组明显升高,表明 Hp 感染是 NAFLD 的危险因素。但本研究比较了 NAFLD 组内 Hp 感染阳性和 Hp 感染阴性 2 组相关指标的差异,指标包括性别、年龄、是否患高血压、BMI 及血清学指标,均与 NAFLD、代谢紊乱有关。结果发现除性别、年龄、UA 水平外,Hp 感染与上述指标无明显相关性,所以 Hp 感染是如何影响 NAFLD 尚不清楚。目前 NAFLD

与 Hp 感染相关的病理生理机制有许多假说。一种说法认为 Hp 能直接损伤肝脏,使肝脏发生炎性反应,最终形成脂肪肝^[22-23]。Hp 侵入肝脏共有 2 种途径:一种途径为 Hp 经奥狄括约肌逆行进入肝脏,对肝细胞产生直接毒性作用,损伤肝细胞;另一种途径为 Hp 成分及内毒素通过血液循环进入肝脏,从而损伤肝细胞^[24]。另一种说法认为 Hp 可能通过某些中间机制参与脂肪肝的发生。多项研究证明, Hp 可诱导胰岛素抵抗,通过炎性因子如 TNF- α 、脂联素、胎球蛋白 A 等途径参与了 NAFLD 的病理过程^[25-26]。另外, Hp 侵入肠道黏膜增加肠道通透性、导致肠道菌群失调,为细菌内毒素通过门静脉进入肝内提供便利,也被认为参与了 NAFLD 的发病过程^[27-28]。

尿素呼气试验的检测值可反映胃内总尿素酶活性,可以将其作为胃内 Hp 定植密度的一个指标,尿素呼气试验定量结果与 Hp 感染的严重程度及胃黏膜炎性反应程度具有相关性^[29]。张超贤等^[30]采用¹⁴C-尿素呼气试验法检测受检者 Hp 与¹⁴C 结合的每分钟衰变数(DPM)以判断 Hp 感染情况,发现 DPM 越高, Hp 感染者患 NAFLD 的风险性越高。Chen 等^[31]首先发现 Hp 感染率与 NAFLD 的严重程度密切相关; NAFLD 程度越重, Hp 的感染率越高,同时,更易出现肥胖、空腹血糖增高、脂质代谢紊乱及高血压。据此,推测¹⁴C-尿素呼气试验定量结果与 NAFLD 的严重程度也有关系。经过 Spearman 相关分析后,不同程度脂肪肝组¹⁴C-UBT 数值与对照组比较差异无统计学意义,轻度脂肪肝亚组与中度脂肪肝亚组¹⁴C-UBT 数值比较差异也无统计学意义。从各指标的相关性分析可见,脂肪肝严重程度与 BMI、ALT、AST、UA、TG、HDL-C 水平相关,进一步证实 NAFLD 与代谢紊乱有关,但 NAFLD 严重程度与 Hp 感染程度无关。由于目前国内外尚无类似研究,尚需较多文献数据,才能支持本研究结果。

本研究为横断面研究,具有一定的局限性。首先,本研究仅针对院内健康人群进行研究,研究人群较为局限,同时,本研究选取肝脏超声作为脂肪肝判定标准,并且根据肝脏超声结果划分脂肪肝严重程度,由于超声结果与医生经验密切相关,故具有主观性。如条件允许,应进行多中心大样本研究,选取不同地域、种族、职业、性别、年龄、生活习惯的人群进行研究,可采用 FibroTouch 或肝脏活检作为脂肪肝严重程度的判定,结果较为客观。

NAFLD 作为一种复杂的慢性肝脏疾病,在世界各地均具有较高的发病率,需寻找有效预防与治疗 NAFLD 的方法。本研究发现 Hp 感染是 NAFLD 的危

险因素,但是 Hp 感染导致 NAFLD 的机制尚不明确,如果能够进一步证实 Hp 感染在 NAFLD 发病机制中的作用,可以为 NAFLD 的防治提供新的思路。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

唐君瑞、李明珂:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;曹光琼、褚倚佑、王金香:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;吕俊衍、张丹:进行统计学分析;李春媚、罗秉凤:课题设计,论文撰写;马岚青:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

参考文献

- [1] Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(10):2436-2443. DOI: 10.1002/ijc.25797.
- [2] Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(3):547-555. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.11.039.
- [3] 李瑜元. 肠道微生态失调与非酒精性脂肪性肝病关系研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(15):2355-2362. DOI: 10.11569/wcjcd.v23.i15.2355.
- [4] National workshop on fatty liver and alcoholic liver disease, Chinese society of hepatology, Chinese medical association; Fatty liver expert committee, Chinese medical doctor association. Guideline of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a 2018 update [J]. *J Mod Med Health*, 2018, 34(5):641-649. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.03.008.
- [5] Chen TP, Hung HF, Chen MK, et al. Helicobacter pylori infection is positively associated with metabolic syndrome in taiwanese adults: a cross-sectional study [J]. *Helicobacter*, 2015, 20(3):184-191. DOI: 10.1111/hel.12190.
- [6] Franceschi F, Gasbarrini A, Polyzos SA, et al. Extragastric diseases and helicobacter pylori [J]. *Helicobacter*, 2015, 20(S1):40-46. DOI: 10.1111/hel.12256.
- [7] Kang SJ, Kim HJ, Kim D, et al. Association between cagA negative Helicobacter pylori status and nonalcoholic fatty liver disease among adults in the United States [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8):e0202325. DOI: 10.1371/journal.pone.0202325.
- [8] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2010, 19(6):483-487. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2010.06.001.
- [9] Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4):846-854. DOI: 10.1002/hep.21496.
- [10] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the american association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1):328-357. DOI: 10.1002/hep.29367.
- [11] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组、中国医师协

- 会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3):195-203. DOI:10.3760/cma.j. issn. 1007-3418. 2018. 03. 008.
- [12] Yki-J rvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(11):901-910. DOI: 10. 1016/S2213-8587(14)70032-4.
- [13] Kawaguchi T, Torimura T. Is metabolic syndrome responsible for the progression from NAFLD to NASH in non-obese patients [J]. J Gastroenterol, 2019, 55(3):363-364. DOI: 10. 1007/s00535-019-01650-1.
- [14] Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, Insulin resistance, and ceramides [J]. N Engl J Med, 2019, 381(19):1866-1869. DOI: 10. 1056/NEJMcibr1910023.
- [15] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA, et al. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Metabolism, 2016, 65(8):1038-1048. DOI: 10. 1016/j. metabol. 2015. 12. 012.
- [16] 国家消化系疾病临床医学研究中心(上海), 国家消化道早癌防治中心联盟(GECA), 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组, 等. 中国幽门螺杆菌根除与胃癌防控的专家共识意见[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(5):310-316. DOI:10.3760/cma.j. issn. 0254-1432. 2019. 05. 008.
- [17] Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, et al. ACG clinical guideline: Treatment of helicobacter [J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112(2):212-239. DOI: 10. 1038/ajg. 2016. 563.
- [18] Franceschi F, Covino M, Roubaud Baudron C. Review: Helicobacter pylori and extragastric diseases [J]. Helicobacter, 2019, 24(Suppl 1):e12636. DOI: 10. 1111/hel. 12636.
- [19] Sumida Y, Kanemasa K, Imai S, et al. Helicobacter pylori infection might have a potential role in hepatocyte ballooning in nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol, 2015, 50(1):1-9. DOI: 10. 1007/s00535-015-1039-2.
- [20] Abdel-Razik A, Mousa N, Shabana W, et al. Helicobacter pylori and non-alcoholic fatty liver disease: A new enigma [J]. Helicobacter, 2018, 23(6):e12537. DOI: 10. 1111/hel. 12537.
- [21] Fan N, Peng L, Xia Z, et al. Helicobacter pylori infection is not associated with non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study in China [J]. Front Microbiol, 2018, 9:73. DOI: 10.3389/fmicb. 2018. 00073.
- [22] 严妍, 吴新华, 黄玉杰, 等. 利拉鲁肽对 2 型糖尿病合并 NAFLD 患者肝功能、脂代谢及微炎性反应的影响[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(10):1009-1012. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 10. 009.
- [23] 陈鹏, 焦方舟. 炎性小体与肝脏疾病关系的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(11):1286-1290. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2018. 11. 025.
- [24] 袁晨, 芦琳琳, 辛永宁, 等. 幽门螺杆菌感染引发非酒精性脂肪性肝病机制的研究进展[J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2016, 8(3):26-29. DOI:10.3969/j. issn. 1674-7380. 2016. 03. 006.
- [25] Okushin K, Tsutsumi T, Ikeuchi K, et al. Helicobacter pylori infection and liver diseases: Epidemiology and insights into pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(32):3617-3625. DOI: 10. 3748/wjg. v24. i32. 3617.
- [26] 孟晓嵘, 代礼润, 余庆华, 等. 冠状动脉粥样硬化病变与非酒精性脂肪性肝病相关性分析[J]. 中国医药, 2018, 13(12):1766-1770. DOI: 10. 3760/j. issn. 1673-4777. 2018. 12. 002.
- [27] Casta o-Rodríguez N, Mitchell HM, Kaakoush NO. NAFLD, Helicobacter species and the intestinal microbiome [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2017, 31(6):657-668. DOI: 10. 1016/j. bpg. 2017. 09. 008.
- [28] 黄超, 胡海华, 赵红星. 定量 CT 技术在非酒精性脂肪肝定量诊断中的价值分析[J]. 中国现代医生, 2019, 57(7):130-132, 136.
- [29] Boltin D, Levi Z, Perets TT, et al. Correlation between quantitative ¹³C-Urea breath test and helicobacter pylori treatment success in a population-based cohort [J]. Gastroenterol Res Pract, 2018, 2018:5439539. DOI: 10. 1155/2018/5439539.
- [30] 张超贤, 郭李柯, 张利利, 等. 幽门螺杆菌感染与 PPAR γ 2 基因 Pro12Ala/GPx-1 基因 Pro198Leu 多态性的交互作用和非酒精性脂肪性肝病的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(7):1551-1559. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-5256. 2019. 07. 026.
- [31] Chen C, Zhang C, Wang X, et al. Helicobacter pylori infection may increase the severity of nonalcoholic fatty liver disease via promoting liver function damage, glycometabolism, lipid metabolism, inflammatory reaction and metabolic syndrome [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2019. DOI: 10. 1097/MEG. 0000000000001601.

(收稿日期:2019-11-01)

作者 · 编者 · 读者

《疑难病杂志》参考文献引用技巧

本刊参考文献是按照 GB/T 15835-2015《信息与文献 参考文献著录规则》规定的格式进行著录,除传统的项目外,文献末还要求加注数字对象唯一标识码(DOI)信息,近来有作者反映查找文章的 DOI 信息困难,造成著录格式不完整、不规范,为帮助作者更好地引用文献,撰写论文,本刊编辑部总结了文献检索的小技巧:登录万方数据网站 <http://www.wanfangdata.com.cn>,检索出想要参考引用的文献,出现该文献相关信息界面,点击文题下方的“□”导出按钮,出现“导出文献列表”,点击其下方的“参考文献格式”,即出现该文献的规范著录格式,包括作者、文题、刊名、年份、卷(期)、起止页码、DOI 等完整信息,即可加以引用。

口服与内镜下喷洒西甲硅油在结肠镜检查中的应用价值比较

丁瞿晨, 王静静, 朱悦, 杨丽华, 季国忠

基金项目: 江苏省科学技术厅重点研发计划(社会发展项目)(BE2016799)

作者单位: 210011 南京医科大学第二附属医院消化医学中心

通信作者: 季国忠, E-mail: jgzl@163.com

【摘要】目的 分析口服与内镜下喷洒西甲硅油在结肠镜检查中的应用价值。**方法** 选择 2018 年 9 月—2019 年 9 月南京医科大学第二附属医院消化医学中心接受诊断性结肠镜检查患者 100 例作为研究对象,按照随机数字表法分为对照组和观察组,各 50 例。对照组患者在检查前口服磷酸钠盐+西甲硅油,观察组患者在检查前给予口服磷酸钠盐+内镜下喷洒西甲硅油。比较 2 组患者肠道内清洁度、祛泡效果、肠镜检查时间、视野清晰度及生理盐水冲洗量差异,观察息肉、早癌检出率及不良反应的发生情况。**结果** 观察组患者横结肠、右侧结肠、左侧结肠的祛泡效果、视野清晰度、 ≤ 0.5 cm 息肉检出率均明显高于对照组,肠镜检查时间、生理盐水冲洗量均明显低于对照组($t/P=27.596/0.000, 41.905/0.000, 38.461/0.000, 9.677/0.000, 9.000/0.003, 12.684/0.000, 44.662/0.000$)。2 组患者在肠道内清洁度、 >0.5 cm 息肉、早癌检出率及不良反应发生情况比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 内镜下喷洒西甲硅油应用于结肠镜检查,可以增强肠道清洁及祛泡效果,提高视野清晰度和微小息肉的检出率,缩短检查时间,增强患者的耐受性,具有一定的临床应用价值。

【关键词】 磷酸钠盐;西甲硅油;镜下喷洒;结肠镜;肠道准备

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.007

Comparison of the application value of oral and endoscopic spraying of silicone oil in colonoscopy Ding Quchen, Wang Jingjing, Zhu Yue, Yang Lihua, Ji Guozhong. Digestive Medical Center, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

Corresponding author: Ji Guozhong, E-mail: jgzl@163.com

Fund program: Key R & D Plan of Jiangsu Science and Technology Department (Social Development Project) (BE2016799)

【Abstract】Objective To analyze the application value of oral and endoscopic spraying of silicone oil in colonoscopy. **Methods** From September 2018 to September 2019, 100 patients in the digestive medical center of the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University who received diagnostic colonoscopy were selected as the study objects. According to the random number table method, they were divided into the control group and the observation group, 50 cases each. The patients in the control group were given sodium phosphate + silicone oil before examination, while those in the observation group were given sodium phosphate + silicone oil spray under endoscope before examination. The difference of intestinal cleanliness, defoaming effect, colonoscopy time, visual field definition and normal saline washing volume between the two groups were compared. **Results** In the observation group, the defoaming effect, visual field clarity and detection rate of polyps ≤ 0.5 cm in transverse colon, right colon and left colon were significantly higher than those in the control group. The time of colonoscopy and the amount of normal saline washing were significantly lower than those in the control group ($t/P=27.596/0.000, t/P=41.905/0.000, t/P=38.461/0.000, t/P=9.677/0.000, t/P=9.000/0.003, t/P=12.684/0.000, t/P=44.662/0.000$). There was no significant difference in intestinal cleanliness, polyp >0.5 cm, early cancer detection rate and adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** The application of silicone oil spray under endoscopy in colonoscopy can enhance the intestinal cleaning and defoaming effect, improve the visual field clarity and the detection rate of micro polyps, shorten the examination time and enhance the tolerance of patients, which has a certain clinical application value.

【Key words】 Sodium phosphate; Simethicone; Colonoscopy; Bowel preparation

结肠镜检查是目前临床对结肠相关疾病进行诊断的有效方法之一,其诊断结果可给临床治疗提供理论依据^[1]。结肠镜检查结果准确需具备良好的肠道准备,而肠道内过多气泡黏附于黏膜、肠腔内的粪水或粪渣残留及肠道清洁度较差等因素均会对内镜的操作及检查产生直接影响,并可能因“伪象”,造成误诊或漏判^[2]。目前,临床上肠道准备大都采用聚乙二醇电解质散和甘露醇口服。聚乙二醇电解质散服用时,患者需大量饮水,口感和耐受性较差。根据文献报道,聚乙二醇电解质散可被肠内的细菌分解形成某些可燃性气体,故口服聚乙二醇电解质散做肠道准备不宜应用于内镜电凝及高频电切术,同时可能引发患者低血容量性休克^[3-4]。磷酸钠盐是第三代肠道清洁口服制剂,服用简单,清洁度好,安全性高,耐受性较佳^[5]。但临床应用时发现其容易在肠道中产生气泡,对电镜操作及诊断结果产生影响^[6]。西甲硅油是一种物理性祛泡的表面活性剂,临床统计资料表明,肠镜中应用西甲硅油祛泡效果较好,可更好地暴露视野,提高病灶检出率,缩短检查时间,同时可有效降低术后腹胀发生率,故临床应用较为广泛^[7]。现观察口服与内镜下喷洒西甲硅油在结肠镜检查中的应用价值,为结肠镜肠道准备提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 9 月—2019 年 9 月南京医科大学第二附属医院消化医学中心接受诊断性结肠镜检查患者 100 例作为研究对象,按照随机数字表法分为 2 组,各 50 例。对照组男 23 例,女 27 例,年龄 23~75(42.58±5.61)岁,BMI(23.14±0.26)kg/m²;观察组男 24 例,女 26 例,年龄 24~74(42.64±5.55)岁,BMI(23.21±0.24)kg/m²。2 组患者的性别、年龄及 BMI 等比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审核批准,患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 纳入和排除标准 (1)纳入标准:①年龄 18~75 岁;②符合肠镜常规检查适应证者,或无严重禁忌证者。(2)排除标准:①合并心肝肾功能不全者;②妊娠、哺乳期患者;③血电解质紊乱及腹水者;④对本研究药物过敏者;⑤合并巨结肠、胃肠道梗阻及相关不宜行肠道准备者;⑥既往消化道手术史者;⑦凝血功能异常者;⑧依从性差,中途退出者。

1.3 给药方法 对照组患者在检查前 1 天晚上开始服用磷酸钠盐 45 ml,第 2 天清晨再次服用磷酸钠盐 45 ml,每次服用磷酸钠盐后再服用西甲硅油 10 ml。观察组在对照组患者服用磷酸钠盐的基础上,于肠镜

检查过程中视情况于各结肠段喷洒西甲硅油 20 ml(统一浓度及容量)。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 肠道清洁度评分:参考波士顿量表(BBPS 量表)对患者肠道准备质量进行评价^[8],分为 A(0 分)、B(1 分)、C(2 分)、D(3 分)4 个等级,分值范围为 0~3 分,并由 2 位高年资医师共同评判。A 级,局部肠道准备不良,肠道中有大量固体粪便存在,肠黏膜模糊不可见;B 级,部分黏膜因着色、粪渣及浑浊液体的存在造成部分黏膜显示不清晰;C 级,浑浊液体,肠黏膜表面有少量着色、粪便,但显示清晰;D 级,全段肠黏膜具有较好的可见度,无对结肠镜视野影响的残渣存在。分别对横结肠、右侧结肠(盲肠及升结肠)、左侧结肠(降结肠、乙状结肠及直肠)评价,肠道准备效果越好分值越高。

1.4.2 肠道内祛泡效果评价^[9]:根据视野清晰度将其分为 A(0 分)、B(1 分)、C(2 分)、D(3 分)4 个等级,分值范围为 0~3 分,并由 2 位高年资医师共同评判。A 级,肠腔内存在大量的泡沫,需使用生理盐水进行冲洗;B 级,肠腔内存在泡沫,对检查视野产生一定程度的影响;C 级,肠腔内存在少量的泡沫,但是对视野检查影响较小,相对清晰;D 级,肠腔内没有泡沫出现,结肠镜视野较为清晰。肠道内气泡量越少分值越高,分别对横结肠、右侧结肠(盲肠及升结肠)、左侧结肠(降结肠、乙状结肠及直肠)评判。

1.4.3 肠镜检查:记录检查时间及生理盐水冲洗量,同时由内镜医师对患者肠镜清晰度进行评价^[10],并将其分为 0~25%(1 分)、26%~50%(2 分)、51%~75%(3 分)、76%~100%(4 分),分值范围为 0~4 分,分值越高清晰度越好。

1.4.4 息肉及早癌检出率比较:观察记录 2 组患者≤0.5 cm 息肉、>0.5 cm 息肉、病理显示为腺瘤及癌变的检出率。

1.4.5 记录不良反应:记录 2 组患者检查前(呕吐、恶心、腹痛)、检查时(腹胀、恶心、腹痛)及检查后(出血、腹胀、腹痛、呕吐及恶心)等不良事件。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.00 软件对资料进行统计分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组肠道清洁度评分比较 2 组患者在横结肠、右侧结肠及左侧结肠的清洁度评分比较,差异无统计

学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 2 组肠道内祛泡效果比较 观察组患者的横结肠、右侧结肠、左侧结肠的祛泡效果均明显高于对照组($P<0.01$),见表 2。

2.3 2 组肠镜检查情况比较 观察组患者的肠镜检查时间、生理盐水冲洗量均明显短于/少于对照组,视野清晰度明显高于对照组($P<0.01$),见表 3。

表 3 2 组患者肠镜检查时间、视野清晰度及生理盐水冲洗量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	例数	肠镜检查时间 (min)	视野清晰度 (分)	生理盐水冲洗量 (ml)
对照组	50	15.69±2.31	6.25±0.68	54.26±4.52
观察组	50	10.15±2.05	7.86±0.96	21.45±2.56
<i>t</i> 值		12.684	9.677	44.662
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 2 组息肉及早癌检出率比较 2 组患者>0.5 cm 息肉、腺癌检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$),观察组患者≤0.5 cm 息肉检出率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 4。

表 4 2 组患者息肉及早癌检出率比较 [例(%)]

组 别	例数	≤0.5 cm 息肉	>0.5 cm 息肉	腺癌
对照组	50	9(18.00)	6(12.00)	5(10.00)
观察组	50	16(32.00)	5(10.00)	6(12.00)
χ^2 值		9.000	0.102	0.102
<i>P</i> 值		0.003	0.749	0.749

2.5 2 组不良反应发生率比较 对照组患者在检查前腹胀 3 例,恶心 2 例;检查中呕吐 10 例,恶心 8 例,腹痛 5 例;检查后出血 3 例,腹痛 2 例,恶心 2 例。观察组患者在检查前腹胀 2 例,腹痛 1 例;检查中呕吐 8

例,恶心 7 例,腹痛 6 例;检查后出血 3 例,腹痛 2 例。2 组患者不良反应发生率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

表 5 2 组患者不良反应发生率比较 [例(%)]

组 别	例数	检查前	检查中	检查后
对照组	50	5(10.00)	23(46.00)	7(14.00)
观察组	50	3(6.00)	21(42.00)	5(10.00)
χ^2 值		0.136	0.162	0.379
<i>P</i> 值		0.712	0.687	0.538

3 讨 论

肠道准备是结肠镜检查前的常规操作,息肉切除、活检、观察等过程顺利进行需肠道的清洁,结肠微小病变更为甚之,肠道清洁可有效降低误诊率及漏诊率^[11]。多项临床研究显示,理想的肠道清洁应符合如下标准^[12-13]:(1)患者痛苦较少,操作时间短,患者耐受性高;(2)水电解质平衡维持效果较好,对患者生理功能影响较小;(3)避免肠壁水肿;(4)对病变部位的刺激应尽可能小;(5)肠道应无粪便,清洁度好。目前临床上肠道准备的方案较多,但是在肠道准备过程中,部分方式会使患者出现不适感、清洁不彻底、适用度不高,进而造成不良反应频发、微小病变漏诊、插镜盲目及操作困难等问题^[14]。选择合适的肠道准备方案显得尤为重要。本研究所用磷酸盐是一种由磷酸氢二钠及磷酸二氢钠组成的高渗性缓泻剂,其在进入肠道以后水解,使肠道处于一种高渗状态,进而形成渗透性腹泻^[15]。同时其还会对肠黏膜的局部神经反射产生刺激效果,从而增加肠壁蠕动及排便^[16]。另外,磷酸钠盐口感较为舒适,腹痛、腹胀、呕吐及恶心等不良反应也较少^[17]。近年,口服磷酸盐成为应用最广泛的肠道准备方式之一,但有部分患者服用后肠道易出现大量

表 1 2 组患者肠道内清洁度评分比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组 别	例数	横结肠	右侧结肠	左侧结肠	总分
对照组	50	2.54±0.26	2.41±0.43	2.68±0.40	7.86±0.98
观察组	50	2.67±0.53	2.51±0.34	2.75±0.42	8.12±1.13
<i>t</i> 值		1.557	1.290	0.583	1.229
<i>P</i> 值		0.061	0.100	0.198	0.111

表 2 2 组患者肠道内祛泡效果比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组 别	例数	横结肠	右侧结肠	左侧结肠	总分
对照组	50	1.25±0.24	0.84±0.14	1.01±0.15	2.97±0.41
观察组	50	2.78±0.31	2.59±0.26	2.69±0.27	7.76±0.87
<i>t</i> 值		27.596	41.905	38.461	35.217
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

气泡,导致黏膜观察较为困难,检查中需要采用大量生理盐水进行冲洗,操作时间延长同时还可能引发腹痛、腹胀等不良反应^[18],故本研究中对照组患者生理盐水冲洗用量相对较高。

目前,国内外学者为提高疾病诊断率及结肠镜检查黏膜视野的清晰度,开始在检查中使用消泡剂^[19]。西甲硅油即二甲基硅氧烷,是一种相对较为稳定的表面活性剂,可对黏液及食糜内的气泡表面张力进行改变,促使其发生分解破裂,释放出的气体通过肠蠕动或肠壁吸收而排出,从而达到净化黏膜、消除泡沫的效果^[20]。另外,西甲硅油主要的成分为二甲化硅和硅油,无毒安全,无生理活性,其作用为物理性效果,不被胃肠道吸收,口服后可经胃肠道以原药排出体外,可用于老年、孕妇、成人、儿童及婴幼儿等患者,有利于医师对患者病灶的观察,提高患者耐受性,缩短操作时间,提高微小病灶检出率^[21-22]。本研究对照组结果显示,≤0.5 cm 息肉的检出率为 18.00%,与 Bai 等^[23]研究结果相符。本研究中经内镜下喷洒西甲硅油后,肠道内清洁度、祛泡效果、检查时间等均得到明显改善,这可能主要是由于结肠特殊的生理解剖特点,结肠袋彼此相连、结肠走行迂曲,在进行结肠镜检查时需要不同角度、远近结合对病灶进行观察^[24]。口服西甲硅油虽然可一定程度减少肠腔内泡沫,但是由于其需要经胃肠道的阻碍,真正到达病灶的量相对较少,且覆盖率相对较低,剂量过高时又会产生一定程度的不良反应^[25]。而内镜下喷洒西甲硅油可以在使用最低剂量的同时覆盖面更广,祛泡效果较好,增加内镜下的“可视距离”,提高视野清晰度和肠道清洁度,效果更佳。

综上所述,内镜下喷洒西甲硅油应用于结肠镜检查,可以提高肠道清洁及祛泡效果,提高视野清晰度和微小、息肉的检出率,缩短检查时间,增强患者的耐受性,具有一定的临床应用价值。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

丁瞿晨:论文撰写,整理资料;王静静:收集整理资料,分析数据,图表设计;朱悦:收集整理资料,查找参考书籍;杨丽华:分析资料,指导修改;李国忠:修改总指导

参考文献

- [1] Doubeni CA, Corley DA, Quinn VP, et al. Effectiveness of screening colonoscopy in reducing the risk of death from right and left colon cancer: A large community-based study[J]. Gut, 2018, 67(2): 291-298. DOI:10.1136/gutjnl-2016-312712.
- [2] Radaelli F, Paggi S, Hassan C, et al. Split-dose preparation for colonoscopy increases adenoma detection rate: A randomised controlled trial in an organised screening programme [J]. Gut, 2015, 66(2):270-277. DOI:10.1136/gutjnl-2015-310685.

- [3] Kao D, Roach B, Silva M, et al. Effect of oral capsules colonoscopy-delivered fecal microbiota transplantation on recurrent clostridium difficile Infection: A randomized clinical trial [J]. Jama, 2017, 318(20):1985-1993. DOI:10.1001/jama.2017.17077.
- [4] Bernal J, Tajkbaksh N, Sánchez FJ, et al. Comparative validation of polyp detection methods in video colonoscopy: Results from the MICCAI 2015 endoscopic vision challenge[J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2017, 36(6):1231-1249. DOI:10.1109/TMI.2017.2664042.
- [5] Ako S, Takemoto K, Yasutomi E, et al. Comparing reduced-dose sodium phosphate tablets to 2 L of polyethylene glycol: A randomized study[J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(24):4454-4461. DOI:10.3748/wjg.v23.i24.4454.
- [6] Zhou JQ, Tang XW, Wang J, et al. Feasibility of a novel low volume and sodium phosphate free bowel preparation regimen for colon capsule endoscopy[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(2):1739-1743. DOI:10.3892/etm.2017.4664.
- [7] Krijbolder MS, Grooteman KV, Bogers SK. Addition of simethicone improves small bowel capsule endoscopy visualisation quality[J]. 2018, 76(1):27-32. DOI:10.1097/MD.00000000000010148.
- [8] 李娜,郭珊珊,赵蕊,等. 复方聚乙二醇联合西甲硅油在结肠镜检查术前肠道准备中的效果观察[J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42(8):1137-1139. DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.08.039.
- [9] 杨祯玲,赵妙,黄七任,等. 结肠镜术前应用西甲硅油的效果分析[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23(4):26-29. DOI:10.3969/j.issn.1007-1989.2017.04.005.
- [10] 谢艳华,孙勇,史晓丹. 西甲硅油乳剂在结肠镜检查肠道准备中的应用[J]. 临床医学,2016,36(5):12-14. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-5232.2016.09.007.
- [11] Hsieh YH, Tseng CW, Hu CT, et al. Prospective multicenter randomized controlled trial comparing adenoma detection rate in colonoscopy using water exchange, water immersion, and air insufflation [J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2017, 86(1):192-201. DOI:10.1016/j.gie.2016.12.005.
- [12] Azevedo R, Leitao C, Pinto J, et al. Can water exchange improve patient tolerance in unsedated colonoscopy a prospective comparative study [J]. 2017, 25(4):166-174. DOI:10.1159/000484093.
- [13] Kobaeklarsen M, Kroijer R, Dyrvig AK, et al. Back-to-back colon capsule endoscopy and optical colonoscopy in colorectal cancer screening individuals [J]. Colorectal Disease, 2018, 20(6):479-485. DOI:10.1111/codi.13965.
- [14] Cadoni S, Falt P, Rondonotti E, et al. Water exchange for screening colonoscopy increases adenoma detection rate: A multicenter, double-blinded, randomized controlled trial[J]. Endoscopy, 2017, 49(5):456-467. DOI:10.1055/s-0043-101229.
- [15] 唐英,葛龙,张志刚,等. 口服聚乙二醇与磷酸钠盐溶液用于胶囊内镜肠道准备有效性和安全性比较的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2017, 17(1):52-57. DOI:10.7507/1672-2531.201611042.

(下转 256 页)

美托洛尔联合治疗慢性肾脏疾病预后不良与 IL-6、RDW 及高尿酸血症的相关性分析

王丽媛, 徐洁, 唐小铁, 于洋, 孙唯言, 戚婷

基金项目: 湖北省卫计委联合基金 (WJ2018H0107); 武汉市卫计委一般项目 (WX17D27)

作者单位: 430081 武汉科技大学医学院 (王丽媛、徐洁); 武汉科技大学附属普仁医院肾内科 (唐小铁、于洋、孙唯言、戚婷)

通信作者: 唐小铁, E-mail: Txt196903@163.com

【摘要】目的 分析美托洛尔联合治疗的慢性肾脏疾病预后不良与白介素-6(IL-6)、红细胞分布宽度(RDW)及高尿酸血症的相关性。**方法** 选择 2016 年 8 月—2018 年 1 月武汉科技大学附属普仁医院肾内科收治的 200 例慢性肾脏疾病患者作为研究对象,以随机数字表法分为对照组和观察组,各 100 例。对照组患者给予常规治疗,观察组患者在常规治疗的基础上外加美托洛尔治疗,4 周 1 个疗程,连续治疗 6 个疗程。比较 2 组患者治疗前后血清炎症因子、尿酸、24 h 尿蛋白、肾小球滤过率(GFR)及 RDW 水平。随访 1 年,根据观察组主要心脏不良事件(MACE)发生情况,将其分为预后不良亚组($n=28$)和预后良好亚组($n=72$),比较 2 组患者治疗后相关指标水平差异,采用 Pearson 法对经美托洛尔治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 IL-6、RDW 及高尿酸血症的相关性进行分析。**结果** 与治疗前比较,2 组患者治疗后的血清 IL-6、IL-8、TNF- α 水平、尿酸、24 h 尿蛋白、RDW 及平均动脉压水平明显降低,GFR 明显升高,且观察组患者上述指标改善更为显著($t/P=8.599/<0.001, 6.289/<0.001, 6.067/<0.001, 5.741/<0.001, 4.881/<0.001, 13.262/<0.001, 29.964/<0.001, 7.197/<0.001$)。与预后良好亚组比较,预后不良亚组尿酸、IL-6、RDW 水平均明显降低,而 GFR 水平明显升高($t/P=4.007/<0.001, 6.500/<0.001, 7.944/<0.001, 9.538/<0.001$)。经 Pearson 法相关性分析,美托洛尔联合治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 GFR 水平呈正相关($r/P=0.537/0.014$),与 IL-6、RDW 及尿酸水平呈负相关($r/P=-0.781/0.005, -0.587/<0.001, -0.569/<0.001$)。**结论** 美托洛尔联合治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 GFR 水平呈正相关,与 IL-6、RDW 及尿酸水平呈负相关,对慢性肾病患者的预后评估具有一定的参考价值。

【关键词】 美托洛尔;慢性肾脏疾病;预后;白介素-6;红细胞分布宽度;高尿酸血症;相关性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.008

The correlation analysis of IL-6, RDW and hyperuricemia in the treatment of chronic kidney disease with metoprolol

Wang Liyuan, Xu Jie, Tang Xiaotie, Yu Yang, Sun Weiyan, Qi Ting. Medicine College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China

Corresponding author: Tang Xiaotie, E-mail: txt196903@163.com

Fund program: Joint Fund of Hubei Health and Family Planning Commission (WJ2018H0107); General Project of Wuhan Health and Family Planning Commission (WX17D27)

【Abstract】Objective To analyze the relationship between the poor prognosis of chronic kidney disease treated with metoprolol and IL-6, RDW and hyperuricemia. **Methods** From August 2016 to January 2018, 200 patients with chronic kidney disease admitted to the Department of Nephrology of Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of science and technology were selected as the study objects, and randomly divided into control group and observation group, each with 100 cases. The patients in the observation group were treated with metoprolol based on the conventional treatment, one course in four weeks, six courses in a row. The levels of serum inflammatory factors, uric acid, 24h urinary protein, GFR and RDW were compared before and after treatment. After 1-year follow-up, according to the major adverse cardiac events (MACE) in the observation group, mace was divided into two subgroups: poor prognosis ($n=28$) and good prognosis ($n=72$). The correlation between IL-6, RDW and hyperuricemia was analyzed by Pearson method. **Results** Compared with before treatment, the levels of serum IL-6, IL-8, TNF- α , uric acid, 24 h urinary protein, RDW, and mean arterial pressure in the two groups of patients were significantly reduced, and GFR was significantly increased, with significant differences ($t/P=8.599/<0.001$,

$t/P = 6.289 / < 0.001$, $t/P = 6.067 / < 0.001$, $t/P = 5.741 / < 0.001$, $t/P = 4.881 / < 0.001$, $t/P = 13.262 / < 0.001$, $t/P = 29.964 / < 0.001$, $t/P = 7.197 / < 0.001$). Compared with the subgroup with good prognosis, the levels of uric acid, IL-6, and RDW in patients with poor prognosis were significantly reduced, and GFR levels were significantly increased ($t/P = 4.007 / < 0.001$, $t/P = 6.500 / < 0.001$, $t/P = 7.944 / < 0.001$, $t/P = 9.538 / < 0.001$). Correlation analysis by Pearson method showed that the poor prognosis of chronic kidney disease treated with metoprolol was positively correlated with GFR levels, and negatively correlated with IL 6, RDW and uric acid levels ($r/P = 0.537 / 0.014$, $r/P = -0.781 / 0.005$, $r/P = -0.587 / < 0.001$, $r/P = -0.569 / < 0.001$). **Conclusion** The poor prognosis of chronic kidney disease treated with metoprolol was positively correlated with GFR level, and negatively correlated with IL-6, RDW and uric acid level, which had a certain reference value for the prognosis evaluation of patients with chronic kidney disease.

【Key words】 Metoprolol; Chronic kidney disease; Prognosis; IL-6; RDW; Hyperuricemia; Correlation

慢性肾脏疾病 (CKD) 是临床继发性和原发性等多种肾脏疾病继续发展的转归, 是难以维持机体平衡的一种临床综合征^[1]。调查研究显示, CKD 在我国的发病率在 10% 左右, 其危害程度仅次于心脏病、肿瘤等疾病, 逐渐成为威胁人们生命健康的第三大疾病^[2]。从发病进程方面来讲, 其疾病发展可缓慢, 也可急速进行性恶化, 病情发展既有“可逆性”, 又有“不可逆性”发展。另外, 我国 CKD 患者 > 70% 存在高血压, 且 CKD 患者的血压与其疾病进展、恶化为终末期肾病关系密切^[3,4]。目前对于 CKD 患者血压控制也是重要的治疗手段, 在联合用药过程中, β 受体阻滞剂具有较好的降压效果。近年研究显示, CKD 患者肾小球和肾小管间质细胞病理损伤与 IL-6 等细胞因子关系密切, 另外高尿酸血症在 CKD 疾病的发展及预后中起着重要的作用^[5,6]。据报道, 红细胞分布宽度 (RDW) 水平对心力衰竭、心房颤动、外周动脉疾病、缺血性脑血管疾病及急性冠状动脉综合征的不良结局具有较好的预测效果, 另外与慢性肾脏疾病患者的预后不良及死亡风险也存在显著的相关性^[7]。故本研究分析美托洛尔联合治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 IL-6、RDW 及高尿酸血症的相关性, 为其临床诊治提供参考, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2016 年 8 月—2018 年 1 月武汉科技大学附属普仁医院肾内科收治慢性肾脏疾病患者 200 例作为研究对象, 按照随机数字表法分为对照组和观察组, 各 100 例。2 组患者的性别、年龄、病程、BMI、原发病、吸烟、饮酒史及 CKD 分期等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。观察组再根据患者预后情况, 将其分为预后不良亚组 ($n = 28$) 和预后良好亚组 ($n = 72$)。本研究经医院医学伦理委员会审核批准, 患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准: ①所有患者均符合

表 1 2 组患者基线资料比较

项 目	对照组 ($n = 100$)	观察组 ($n = 100$)	t/χ^2 值	P 值
男/女 (例)	79/21	76/24	0.258	0.611
平均年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	46.57 $\pm$ 3.25	46.81 $\pm$ 3.19	0.527	0.299
病程 ($\bar{x} \pm s$, 年)	2.98 $\pm$ 0.28	2.91 $\pm$ 0.31	0.219	0.414
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	23.84 $\pm$ 1.25	23.75 $\pm$ 1.31	0.497	0.310
原发病 [例 (%)]				
慢性肾小球肾炎	61 (61.00)	59 (59.00)	0.083	0.773
高血压肾损害	21 (21.00)	19 (19.00)	0.125	0.724
糖尿病肾病	11 (11.00)	12 (12.00)	0.049	0.250
梗阻性肾病	7 (7.00)	10 (10.00)	0.579	0.447
吸烟史 [例 (%)]	26 (26.00)	29 (29.00)	0.695	0.404
饮酒史 [例 (%)]	21 (21.00)	20 (20.00)		
CKD 分期 [例 (%)]			0.384	0.825
G2	39 (39.00)	35 (35.00)		
G3	33 (33.00)	34 (34.00)		
G4	28 (28.00)	31 (21.00)		

“中国肾脏疾病高尿酸血症诊治的实践指南”中关于 CKD 的诊断标准^[8]; ②所有 CKD 患者处于 G2 ~ G4 分期; ③所有患者神志清晰且具有一定程度的语言表达能力。(2) 排除标准: ①入组前进行免疫抑制剂及激素治疗者; ②妊娠、哺乳期患者; ③合并严重的恶性肿瘤、系统性疾病者; ④合并严重糖尿病并发症及急性心力衰竭者; ⑤合并严重的免疫性疾病、呼吸系统疾病者; ⑥合并严重的酸碱及水电解质紊乱; ⑦接受肾脏或透析移植者; ⑧短时间内隐性或显性感染者; ⑨依从性差, 中途退出者。

1.3 治疗方法 2 组患者均给予常规治疗, 包括碳酸氢钠维持电解质酸碱平衡、促红细胞生成素纠正贫血、低盐低蛋白饮食及维持尿酸平衡等。观察组在上述治疗的基础上外加美托洛尔 (阿斯利康制药有限公司) 降压治疗。4 周 1 个疗程, 连续治疗 6 个疗程。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 血清炎症因子水平测定: 于治疗前后抽取患者清晨空腹肘静脉血 5 ml, 离心分离得血清, 冰箱

-75℃条件下保存,待测。采用酶联免疫吸附法测定白细胞介素(IL-6、IL-8)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α),试剂盒购于上海乔羽生物科技有限公司,操作方法严格按照说明书执行。

1.4.2 外周血 RDW 水平测定:采用全自动血细胞检测仪(HF-3800,济南正荣医疗器械有限公司)对外周血 RDW 水平进行测定。

1.4.3 血清尿酸、尿蛋白及 GFR 水平测定:上述血清采用尿酸酶法测定血清尿酸水平,双血浆法测定肾小球滤过率(GFR),散色比浊法测定 24 h 尿蛋白含量。

1.4.4 记录预后情况:随访 1 年,记录所有患者 MACE 事件发生情况,包括心源性猝死、需要处理的心律失常、急性心肌梗死、心绞痛及急性心力衰竭等^[9]。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.00 软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行 t 检验;计数资料采用频数或率(%)表示,组间比较行 χ^2 检验;并采用 Pearson 法对慢性肾脏疾病预后不良与 IL-6、RDW 及高尿酸血症的相关性进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清 IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平比较 与治疗前比较,2 组患者治疗后血清 IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平均降低,且观察组较对照组降低更显著($P < 0.01$),见表 2。

表 2 2 组患者治疗前后血清 IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组 别	时间	IL-6	IL-8	TNF-α
对照组 ($n = 100$)	治疗前	105.12 ± 25.36	82.98 ± 28.31	68.06 ± 25.69
	治疗后	75.36 ± 21.18	53.24 ± 15.74	51.26 ± 14.62
观察组 ($n = 100$)	治疗前	104.98 ± 26.02	83.06 ± 27.69	67.85 ± 24.98
	治疗后	54.39 ± 12.09	41.05 ± 11.31	40.25 ± 10.04
t/P 对照组内值		9.007/ <0.001	9.181/ <0.001	5.684/ <0.001
t/P 观察组内值		17.632/ <0.001	17.388/ <0.001	10.159/ <0.001
t/P 治疗后组间值		8.599/ <0.001	6.289/ <0.001	6.067/ <0.001

2.2 2 组血清尿酸、24 h 尿蛋白及 GFR 水平比较 与治疗前比较,治疗后 2 组血清尿酸、24 h 尿蛋白水平均降低,GFR 均升高,且观察组患者改善较对照组更为显著($P < 0.01$),见表 3。

表 3 2 组患者治疗前后血清尿酸、24 h 尿蛋白及 GFR 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	尿酸 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h 尿蛋白 (g/24 h)	GFR ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^2$)
对照组 ($n = 100$)	治疗前	591.45 ± 81.63	1.28 ± 0.13	4.41 ± 0.67
	治疗后	406.87 ± 75.39	1.19 ± 0.12	7.67 ± 1.32
观察组 ($n = 100$)	治疗前	593.06 ± 78.65	1.35 ± 0.20	4.48 ± 0.61
	治疗后	348.74 ± 67.59	1.10 ± 0.14	9.06 ± 1.41
t/P 对照组内值		16.611/ <0.001	9.422/ <0.001	22.023/ <0.001
t/P 观察组内值		23.560/ <0.001	6.860/ <0.001	29.812/ <0.001
t/P 治疗后组间值		5.741/ <0.001	4.881/ <0.001	7.197/ <0.001

2.3 2 组 RDW 及 MAP 水平比较 与治疗前比较,治疗后 2 组患者 RDW 及 MAP 水平均降低,且观察组降低较对照组更显著($P < 0.01$),见表 4。

表 4 2 组患者治疗前后 RDW 及 MAP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	RDW (%)	MAP (mmHg)
对照组 ($n = 100$)	治疗前	10.26 ± 1.20	114.52 ± 3.18
	治疗后	8.32 ± 1.19	105.36 ± 3.54
观察组 ($n = 100$)	治疗前	10.33 ± 1.17	115.08 ± 3.21
	治疗后	6.25 ± 1.01	91.30 ± 3.08
t/P 对照组内值		11.479/ <0.001	19.249/ <0.001
t/P 观察组内值		26.397/ <0.001	53.454/ <0.001
t/P 治疗后组间值		13.262/ <0.001	29.964/ <0.001

2.4 预后情况比较 随访 1 年中,观察组中预后不良有 28 例,心源性猝死 2 例,需要处理的心律失常 3 例,急性心肌梗死 15 例,心绞痛 5 例,急性心力衰竭 3 例。与预后良好亚组比较,预后不良亚组患者的尿酸、IL-6、RDW 水平明显降低,GFR 水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 5。

2.5 慢性肾脏疾病预后不良与血清 IL-6、RDW 及高尿酸血症相关性分析 经 Pearson 法相关性分析显示,美托洛尔联合治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 GFR 水平呈正相关,与 IL-6、RDW 及尿酸水平呈负相关($P < 0.05$),见表 6。

3 讨 论

研究显示,大部分 CKD 患者均合并有不同程度的高血压,同时在疾病发展及治疗过程中,其血压很难控制到预期最佳水平^[10]。经过有效的肾素—血管紧张素—醛固酮系统抑制及容量负荷纠正后,患者血压水

表 5 预后良好和预后不良患者治疗后相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	尿酸($\mu\text{mol/L}$)	GFR($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^2$)	IL-6(pg/ml)	RDW (%)
预后良好亚组	72	369.25 ± 69.57	7.58 ± 0.89	69.74 ± 15.68	7.69 ± 1.25
预后不良亚组	28	314.05 ± 34.08	9.57 ± 1.05	47.58 ± 14.28	5.57 ± 1.05
t 值		4.007	9.538	6.500	7.944
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 6 慢性肾脏疾病预后不良与血清 IL-6、RDW 及高尿酸血症相关性分析

变量	尿酸	GFR	IL-6	RDW
r 值	-0.781	0.537	-0.587	-0.569
P 值	0.005	0.014	<0.001	<0.001

平仍然未得到较好的控制,此时应考虑对机体交感神经系统进行干预^[11]。激活 CKD 患者交感神经系统的机制包括在肾组织损伤刺激下的肾素—血管紧张素—醛固酮系统激活及下丘脑调节中枢儿茶酚胺的增加等^[12]。当机体交感神经过度兴奋后,会一定程度促进心肌重塑、肾组织损伤加重、心脑血管病风险增加及血压升高等^[13]。因此患者交感神经过度兴奋是并发高血压的重要病因。对 CKD 患者交感神经系统活性进行有效控制可以较好地控制患者血压,减轻对靶器官的过度损伤,降低 CKD 患者心脑血管疾病发生的几率,改善预后^[14]。本研究结果提示,经美托洛尔治疗的 CKD 患者相关指标改善较好,血压得到较好控制。这可能是由于美托洛尔是一种选择性 β_1 受体阻滞剂,可对交感神经系统的过度激活进行有效控制,同时还可通过选择性阻滞 β_1 受体密度来有效缓解心脏的自主窦性心律和异位起搏点,控制患者血压,减少对靶器官的损伤,改善预后^[15]。

近年研究显示,慢性炎症反应状态是除肥胖、高血压、高血糖外,影响 CKD 患者预后状态的重要影响因素,这种炎症反应状态可以通过各种途径调控 CKD 疾病的发展,同时可引起患者出现一定程度的营养不良^[16]。另外,这种慢性炎症反应状态可以一定程度促使患者血管内皮结构功能及血清脂蛋白变化,影响预后^[17]。这种炎症反应并不是由外源性病毒、细菌及真菌引起的,而是由于机体在受到相关抗原刺激以后,单核/巨噬细胞系统和淋巴细胞被激活,IL-6、TNF- α 等细胞因子被释放,其会加重损伤患者肾脏,形成一种持续性的微炎症反应状态,进一步释放 IL-6,促进肾功能损伤^[18-19]。本研究结果显示,IL-6 水平与其预后呈现一定程度负相关,这可能是因为血清 IL-6 可对细胞外基质沉淀、足细胞增殖、肾小管间质细胞及肾小球系膜细胞进行刺激,最终引发 CKD 不断发展恶化,加重预后不良^[20]。人体血尿酸的升高可以逐渐引发慢性肾病,经典环孢素实验显示,与单纯环孢素喂养大鼠比较,模型组大鼠的肾功能损伤更为严重,其体内尿酸水平降低,肾小球滤过率升高,故而血尿酸水平是引发 CKD 患者疾病发展恶化的独立危险因素,与其预后不良呈现显著相关性^[21-22]。本研究结果显示,RDW 与其

预后不良呈现一定正相关。这可能是由于 RDW 可对外周血循环中血细胞异质性指标进行有效反映,主要用于临床多种类型贫血的鉴别,可对红细胞的存活和生存产生间接或者直接性的影响,升高 RDW 水平,进而加重 CKD 的病理生理过程,与患者预后具有一定的相关性^[23-24]。

综上所述,经美托洛尔治疗的慢性肾脏疾病预后不良与 GFR 水平呈正相关,与 IL-6、RDW 及尿酸水平呈负相关,对慢性肾病患者的预后诊断具有一定的参考价值。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

王丽媛、徐洁:设计研究方案,实施研究过程,撰写论文;唐小铁:提出研究思路,论文审核;于洋、戚婷:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;孙唯言:实施研究过程,进行统计学分析

参考文献

- [1] Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease [J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2017, 7(5):286-294. DOI: 10.1038/nrneph.2011.26.
- [2] Townsend RR, Anderson AH, Chirinos JA, et al. Association of pulse wave velocity with chronic kidney disease progression and mortality: Findings from the CRIC Study (Chronic Renal Insufficiency Cohort) [J]. *Hypertension*, 2018, 71(6):1101-1107. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10648.
- [3] Hoher B, Adamski J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2017, 13(5):269-284. DOI:10.1038/nrneph.2017.30.
- [4] Caprioli TV, Visentainer JEL, Sell AM. Lack of association between Kidd blood group system and chronic kidney disease [J]. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 2017, 39(4):301-305. DOI:10.1016/j.bjhh.2017.05.007.
- [5] Turakhia MP, Blankestijn PJ, Carrero JJ. Chronic kidney disease and arrhythmias: conclusions from a Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference [J]. *European Heart Journal*, 2018, 39(24):2314-2325. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy060.
- [6] Webster P, Lightstone L, McKay DB, et al. Pregnancy in chronic kidney disease and kidney transplantation [J]. *Kidney International*, 2017, 91(5):1047-1056. DOI:10.1016/j.kint.2016.10.045.
- [7] Orlandi PF, Fujii N, Roy J, et al. Hematuria as a risk factor for progression of chronic kidney disease and death: findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study [J]. *Bmc Nephrology*, 2018, 19(1):150-161. DOI:10.1186/s12882-018-0951-0.
- [8] 中国医师协会肾脏内科医师分会. 中国肾脏疾病高尿酸血症诊治的实践指南(2017 版) [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(25):1927-1936. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.25.003.
- [9] Liu H, Liu H. Correlation of fibroblast growth factor 23 with adverse prognosis of chronic kidney disease and therapy strategy [J]. *Journal*

- of Central South University Medical Sciences, 2018, 43 (5):560-565. DOI:10.11817/j.issn.560-565.2018.03.015.
- [10] Windpessl M, Kronbichler A. Pro: Contrast-induced nephropathy-should we try to avoid contrast media in patients with chronic kidney disease[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2018, 33 (8):1317-1319. DOI:10.1093/ndt/gfy149.
- [11] Olivier V, Donyach-Remy C, Lavigne JP, et al. Micro-inflammation and digestive bacterial translocation in chronic kidney disease[J]. *Nephrologie & Therapeutique*, 2017, 14 (3):135-141. DOI:10.1016/j.nephro.2017.10.005.
- [12] Lin MY, Lee CT, Kuo MC, et al. Effects of physician's specialty on regular chronic kidney disease care in predialysis[J]. *Medicine*, 2018, 97 (26): e11317-e11325. DOI: 10.1097/MD.00000000000011317.
- [13] Liyanage T, Ninomiya T, Perkovic V, et al. Chronic kidney disease in Asia: Protocol for a collaborative overview [J]. *Nephrology*, 2017, 22(6):456-462. DOI:10.1111/nep.12821.
- [14] Schulman G, Berl T, Beck GJ, et al. Risk factors for progression of chronic kidney disease in the EPPIC trials and the effect of AST-120 [J]. *Clinical & Experimental Nephrology*, 2017, 22(2):299-306. DOI:10.1007/s10157-017-1447-0.
- [15] 王刚, 王娟, 魏红随, 等. 血清金属蛋白酶组织抑制因子4、E 选择素及游离脂肪酸水平与慢性心力衰竭患者心功能及预后的相关性研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25 (4):28-32. DOI:10.3969/j.issn.1008-5971.2017.04.006.
- [16] Dipten CV, Berkel SV, Grauw WJCD, et al. General practitioners' perspectives on management of early-stage chronic kidney disease: A focus group study[J]. *Bmc Family Practice*, 2018, 19(1):81-89. DOI:10.1186/s12875-018-0736-3.
- [17] Andrade LSD, Ramos CI, Cuppari L. The cross-talk between the kidney and the gut: Implications for chronic kidney disease[J]. *Nutrition*, 2017, 42(1):27-38. DOI:10.1186/s41110-017-0054-x.
- [18] 申致远, 陈玉辉, 龚涛. 慢性肾脏病与缺血性卒中预后相关性的研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2017, 14(12):660-663. DOI:10.3969/j.issn.1672-5921.2017.12.010.
- [19] Knutson KL, Lash J, Ricardo AC, et al. Habitual sleep and kidney function in chronic kidney disease: the Chronic Renal Insufficiency Cohort study [J]. *Journal of Sleep Research*, 2017, 27(2):281-289. DOI:10.1111/jsr.12573.
- [20] Ahmad FS, Cai X, Kunkel K, et al. Racial/ethnic differences in left ventricular structure and function in chronic kidney disease: The chronic renal insufficiency cohort [J]. *American Journal of Hypertension*, 2017, 30(8):822-829. DOI: 10.1093/ajh/hpx058.
- [21] Peyster E, Chen J, Feldman HI, et al. Inflammation and arterial stiffness in chronic kidney disease: Findings from the CRIC study [J]. *American Journal of Hypertension*, 2017, 30(4):400-408. DOI:10.1093/ajh/hpw164.
- [22] Tanaka K, Watanabe T, Takeuchi A, et al. Cardiovascular events and death in Japanese patients with chronic kidney disease[J]. *Kidney International*, 2017, 91(1):227-234. DOI:10.1016/j.kint.2016.09.015.
- [23] 苏黛, 田娜, 陈孟华. 红细胞分布宽度在慢性肾脏病发生发展中的意义[J]. *中国血液净化*, 2018, 17(1):46-50. DOI:10.3969/j.issn.1671-4091.2018.01.011.
- [24] Huh JH, Yadav D, Kim JS, et al. An association of metabolic syndrome and chronic kidney disease from a 10-year prospective cohort study[J]. *Metabolism-clinical & Experimental*, 2017, 67:54-61. DOI:10.1016/j.metabol.2016.11.003.

(收稿日期:2019-10-22)

(上接 251 页)

- [16] 于美花, 田月强. 磷酸钠盐口服溶液用于结肠镜肠道准备时饮水量的研究[J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28(S4):6-7. DOI: CNKI:SUN:SANE.0.2017-S4-007.
- [17] Bhattacharyya R, Chedgy F, Kandiah K, et al. Endocuff-assisted vs. standard colonoscopy in the fecal occult blood test-based UK Bowel Cancer Screening Programme (E-cap study): A randomized trial [J]. *Endoscopy*, 2017, 49(11):1043-1050. DOI:10.1055/s-0043-111718.
- [18] 高倩, 侯曦露, 余森源, 等. 老年患者结肠镜检查前不同肠道准备效果观察[J]. *临床军医杂志*, 2017, 45(10):1042-1045. DOI:10.16680/j.1671-3826.2017.10.15.
- [19] 文敏, 张学峰, 唐辉, 等. 西甲硅油乳剂在肠镜检查肠道准备中的作用[J]. *现代医学*, 2017, 45(3):398-400. DOI:10.3969/j.issn.1671-7562.2017.03.018.
- [20] 林五连, 张晓兰, 何小建, 等. 聚乙二醇电解质散剂联合低剂量硫酸镁与西甲硅油在结肠镜检查前肠道准备中的应用[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(4):587-590. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2017.04.023.
- [21] Min M, Deng P, Zhang W, et al. Comparison of linked color imaging and white-light colonoscopy for detection of colorectal polyps: A multicenter, randomized, crossover trial[J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2017, 86(4):724-730. DOI:10.1016/j.gie.2017.02.035.
- [22] Iacucci M, Kiesslich R, Gui X, et al. Beyond white light: optical enhancement in conjunction with magnification colonoscopy for the assessment of mucosal healing in ulcerative colitis [J]. *Endoscopy*, 2017, 49(6):553-559. DOI:10.1055/s-0042-124363.
- [23] Bai Y, Fang J, Zhao SB, et al. Impact of preprocedure simethicone on adenoma detection rate during colonoscopy: A multicenter, endoscopist-blinded randomized controlled trial [J]. *Endoscopy*, 2017, 50(2):128-136. DOI:10.1055/s-0043-119213.
- [24] Cho J, Lee S, Shin JA, et al. The impact of patient education with a smartphone application on the quality of bowel preparation for screening colonoscopy[J]. *Clinical Endoscopy*, 2017, 50(5):479-485. DOI:10.5946/ce.2017.025.
- [25] Ianiro G, Masucci L, Quaranta G, et al. Randomised clinical trial: Faecal microbiota transplantation by colonoscopy plus vancomycin for the treatment of severe refractory *Clostridium difficile* infection-single versus multiple infusions [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 48(2):152-159. DOI:10.1111/apt.14816.

(收稿日期:2019-10-17)

特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常的改善效果

高倩, 陈云霞, 代嘉, 王臣, 刘春燕, 白婧

基金项目: 河北省沧州市科学技术支撑项目 (172302107)

作者单位: 061000 河北省沧州市人民医院内分泌科

通信作者: 白婧, E-mail: dsmum48@163.com

【摘要】目的 观察特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常的改善效果。**方法** 选取 2017 年 7 月—2019 年 7 月河北省沧州市人民医院内分泌科诊治绝经后骨质疏松症女性 80 例作为研究对象, 按照完全随机法分为联合组和特立帕肽组 2 组, 各 40 例。特立帕肽组给予特立帕肽皮下注射, 联合组在特立帕肽组的基础上服用盐酸雷洛昔芬片。治疗 6 个月后, 比较 2 组治疗总有效率、骨折发生率; 检测患者腰椎、股骨粗隆、股骨颈骨密度, 骨保护素 (OPG), 骨钙素 (OCN), 抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRAP-5b)、I 型胶原羧基末端肽 (CTX-I) 水平, 进行骨痛、生活质量评分, 统计不良反应发生率。**结果** 联合组治疗总有效率为 90.00%, 高于特立帕肽组的 72.50% ($\chi^2/P=4.021/0.045$); 治疗后 6 个月, 联合组腰椎、股骨粗隆、股骨颈骨密度及 OPG、OCN 水平, 生活质量评分高于特立帕肽组, TRAP-5b、CTX-I、骨痛评分低于特立帕肽组 ($t/P=2.469/0.016, 2.339/0.022, 2.380/0.020, 4.873/0.001, 8.640/0.001, 2.847/0.006, 8.826/0.001, 5.660/0.001, 3.969/0.001$)。联合组骨折发生率低于特立帕肽组, 不良反应发生率高于特立帕肽组, 但差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常改善效果显著, 能缓解患者骨痛, 提高生活质量, 预防骨折发生。

【关键词】 特立帕肽; 雷洛昔芬; 骨质疏松症; 绝经后; 骨代谢异常

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.009

Effect of tripeptide combined with raloxifene on bone metabolism in postmenopausal osteoporosis Improvement effect

Gao Qian, Chen Yunxia, Dai Jia, Wang Chen, Liu Chunyan, Bai Jing. Department of Endocrinology, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China

Corresponding author: Bai Jing, E-mail: dsmum48@163.com

Funding program: Cangzhou Science and Technology Support Project (172302107)

【Abstract】Objective To observe the effect of teriparatide combined with raloxifene on bone metabolism in postmenopausal osteoporosis. **Methods** From July 2017 to July 2019, 80 cases of postmenopausal osteoporosis women were selected from the Endocrinology Department of Cangzhou people's Hospital of Hebei Province. According to the completely random method, they were divided into two groups: the combined group and the teriparatide group, 40 cases each. The patients in the combined group were given raloxifene hydrochloride tablets based on the tripartite group. The bone mineral density (BMD), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OCN), tartaric acid-resistant ephedrine-5b (TRAP-5b) and carboxy-terminal peptide (CTX-I) of type I collagen were measured. The total effective rate, fracture rate and adverse reaction rate of the treatment were evaluated. **Results** The total effective rate of the combined group was 90.00%, higher than 72.50% ($\chi^2/P=4.021/0.045$); the BMD, OPG, OCN, QOL, TRAP-5b, CTX-I and osteopenia scores of the combined group were higher than those of the tripartite group at 6 months after treatment, and lower than those of the teriparatide group ($t/P=2.469/0.016, t/P=2.339/0.022, t/P=2.380/0.020, t/P=4.873/0.001, t/P=8.640/0.001, t/P=2.847/0.006, t/P=8.826/0.001, t/P=5.660/0.001, t/P=3.969/0.001$). The incidence of fracture was lower than that of tripeptide group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$), the incidence of adverse reactions was 22.50% higher than that of tripeptide group 15.00%, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Tripeptide combined with raloxifene can significantly improve the bone metabolism of patients with osteoporosis, alleviate bone pain, improve the quality of life, and prevent fracture.

【Key words】 Tripeptide; Raloxifene; Postmenopausal; Osteoporosis; Bone metabolism

绝经后骨质疏松症属于一种原发性骨质疏松症,妇女在绝经后 5~10 年容易发生,主要临床表现为患者骨密度显著降低,骨微结构被损坏,导致骨脆性、骨折风险增加^[1]。大量研究显示,骨质疏松症患者存在骨代谢异常现象,绝经后患者骨代谢相关指标与绝经前相比,具有较大差异^[2]。特立帕肽注射液主要有效成分是重组人甲状旁腺激素,它能够刺激骨形成,提高骨密度增加的速度,并且能保持患者骨结构的完整性^[3]。雷洛昔芬是一种具有一定选择性的雌激素调节剂。临床治疗骨质疏松症主要是为了促进骨形成,对骨吸收进行抑制,从而改善骨组织。但是治疗方案相对单一,目前主要是服用抑制骨吸收药物,对提高骨密度具有一定作用,避免患者发生骨折,但治疗的时间较长,效果不显著^[4]。现观察特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常的改善效果,为其临床应用提供新的方向,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 7 月—2019 年 7 月河北省沧州市人民医院内分泌科诊治绝经后骨质疏松症患者 80 例作为研究对象,年龄 50~75 (62.5 ± 10.1) 岁。按照完全随机法分为联合组和特立帕肽组 2 组,各 40 例。联合组年龄 50~74 (62.8 ± 10.5) 岁;绝经时间 3.5~10.0 (6.5 ± 1.2) 年;病程 0.7~8.0 (2.3 ± 0.5) 年。特立帕肽组年龄 50~74 (62.8 ± 10.5) 岁;绝经时间 3.5~10.0 (6.9 ± 1.5) 年;病程 0.7~8.0 (2.5 ± 0.8) 年。2 组患者的年龄、绝经时间、病程等一般资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,患者及其家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准:均符合 WHO 中关于骨质疏松的诊断标准;T 值 ≤ -2.5 ;所有患者均经过双能 X 线吸收测定为骨质疏松。(2) 排除标准:对本研究药物过敏患者;精神异常患者;治疗前 3 个月进行特立帕肽、雷洛昔芬治疗患者;合并肿瘤患者;肝、肾、心、肺等重要器官损伤患者。

1.3 治疗方法 特立帕肽组给予特立帕肽 (Eli Lilly Nederland B. V 公司) 20 $\mu\text{g}/\text{d}$ 皮下注射,1 次/d,每月需要注射 28 d,每天选择相同的时间进行注射,其部位选择在患者的下腹部、大腿外侧,连续治疗 6 个月。联合组在特立帕肽组的基础上服用盐酸雷洛昔芬片 (法国 PATHEON FRANCE 公司) 60 mg,每天 1 次。2 组患者在治疗过程中均服用活性维生素 D 0.5 μg ,元素钙剂 600 mg/d。患者在用药期间可以正常饮食、运动,禁止服用其他影响患者骨代谢的药物。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 治疗效果评定及骨折发生率:显效,患者骨代谢相关指标恢复到正常水平,骨痛显著缓解,临床症状明显改善;有效,患者骨代谢相关指标逐渐恢复正常,骨痛缓解,临床症状改善;无效,患者骨代谢相关指标水平、骨痛、临床症状未见改善。治疗总有效率 = (显效 + 有效) / 总例数 $\times 100\%$ 。并记录统计患者骨折发生率。

1.4.2 骨密度检测:采用双能 X 线骨密度仪 (韩国 MEDIKORS 生产,型号 InAlyzer) 检测患者治疗前、治疗后 6 个月腰椎、股骨粗隆、股骨颈骨密度。

1.4.3 骨代谢相关指标检测:治疗前及治疗后 6 个月采集患者清晨空腹肘静脉血液 5 ml,离心留取血清,在 -20°C 环境中保存待用。采用电化学发光免疫分析技术检测患者骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 水平;采用酶联免疫吸附试验检测抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (tartrate-resistant acid phosphatase-5b, TRAP-5b)、I 型胶原羧基末端肽 (type I collagen protein C-terminal crosslinking peptide, CTX-I) 水平。

1.4.4 骨痛评分、生活质量评分^[5]:采用疼痛数字视觉评分法 (numerical rating scale, NRS) 评估患者骨痛状况,分值范围 0~10 分。无痛记为 0 分,轻度疼痛 1~4 分,中度疼痛 5~6 分,重度疼痛 7~10 分。根据简明健康状况调查表 SF-36 量表 (SF-36) 评估患者生活质量,主要包括 8 项内容:生理职能、生理功能、一般健康状况、社会功能、躯体疼痛、情感职能、心理健康、活力等,总分 100 分, >70 分为生活质量较好;70~60 分为生活质量良; <60 分为生活质量较差。

1.4.5 记录不良反应:主要包括头晕、背痛、恶心、下肢痉挛、水肿等。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验;计数资料以频数或率 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组治疗效果及骨折发生率比较 治疗总有效率联合组为 90.00%, 高于特立帕肽组的 72.50% ($P < 0.05$), 见表 1。联合组骨折发生率为 2.50%, 低于特立帕肽组的 7.50%, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 2 组骨密度比较 治疗前 2 组患者腰椎、股骨粗隆、股骨颈骨密度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

治疗后 6 个月 2 组均较治疗前增高 ($P < 0.05$), 且联合组高于特立帕肽组 (P 均 < 0.05), 见表 2。

表 2 2 组患者治疗前后不同部位骨密度水平比较 ($\bar{x} \pm s, g/cm^3$)

组 别	时间	腰椎	股骨粗隆	股骨颈
特立帕肽组 ($n=40$)	治疗前	0.65 ± 0.11	0.65 ± 0.06	0.70 ± 0.08
	疗后 6 个月	0.70 ± 0.10	0.68 ± 0.08	0.74 ± 0.08
联合组 ($n=40$)	治疗前	0.66 ± 0.10	0.65 ± 0.10	0.69 ± 0.09
	疗后 6 个月	0.75 ± 0.08	0.72 ± 0.11	0.78 ± 0.14
t/P 特立帕肽组内值		2.127/0.037	3.315/0.002	2.236/0.028
t/P 联合组内值		4.445/0.001	2.978/0.004	3.420/0.001
t/P 治疗后组间值		2.469/0.016	2.339/0.022	2.380/0.020

2.3 2 组骨代谢指标比较 治疗前 2 组患者 OPG、OCN、TRAP-5b、CTX- I 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后 6 个月 2 组 TRAP-5b、CTX- I 均较治疗前降低, OPG、OCN 均升高 ($P < 0.01$), 且联合组降低/升高幅度大于特立帕肽组 (P 均 < 0.01), 见表 3。

2.4 2 组骨痛缓解、生活质量评分比较 治疗前 2 组患者骨痛、生活质量评分比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后 6 个月 2 组骨痛评分低于治疗前, 生活质量评分高于治疗前, 且联合组降低/升高幅度大于特立帕肽组 (P 均 < 0.01), 见表 4。

表 4 2 组患者治疗前后骨痛、生活质量评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组 别	时间	骨痛评分	生活质量评分
特立帕肽组 ($n=40$)	治疗前	4.95 ± 1.28	72.66 ± 12.78
	治疗后 6 个月	2.28 ± 0.78	85.17 ± 10.28
联合组 ($n=40$)	治疗前	4.88 ± 1.36	72.82 ± 12.89
	治疗后 6 个月	1.67 ± 0.58	93.45 ± 15.25
t/P 特立帕肽组内值		11.270/0.001	4.824/0.001
t/P 联合组内值		13.730/0.001	6.534/0.001
t/P 治疗后组间值		3.969/0.001	2.847/0.006

2.5 2 组不良反应情况比较 联合组不良反应总发生率为 22.50%, 高于特立帕肽组的 15.00%, 但差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.728, P = 0.390$)。见表 5。

3 讨 论

绝经后骨质疏松症主要原因是妇女绝经后, 卵巢功能发生进行性衰退, 雌激素逐渐下降, 造成其严重缺乏, 引起骨代谢平衡失调, 患者机体中骨吸收大于骨形成。绝经后骨质疏松症患者骨重建率增加, 骨丢失产生, 并且这一状态在患者绝经后可以持续 10 年以上^[6]。患者骨丢失会引起骨密度降低, 破坏骨骼微结构, 从而改变骨强度, 患者发生骨折的风险显著增加^[7]。

甲状旁腺素类药物治绝经后骨质疏松症, 能提高患者腰椎、股骨颈的骨密度, 从而改善患者骨质量,

表 1 2 组患者治疗效果及骨折发生率比较 [例(%)]

组 别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)	骨折发生率
特立帕肽组	40	10(25.00)	19(47.50)	11(27.50)	72.50	3(7.50)
联合组	40	16(40.00)	20(50.00)	4(10.00)	90.00	1(2.50)
U/χ^2 值			$U=0.050$		$\chi^2=4.021$	$\chi^2=0.083$
P 值			0.823		0.045	0.773

表 3 2 组患者治疗前后骨代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	OPG(mg/L)	OCN(μ g/L)	TRAP-5b(U/L)	CTX- I (ng/ml)
特立帕肽组 ($n=40$)	治疗前	4.75 ± 1.12	2.86 ± 0.77	6.25 ± 1.46	8.53 ± 2.12
	治疗后 6 个月	9.22 ± 1.85	5.17 ± 0.92	5.16 ± 0.85	4.62 ± 1.30
联合组 ($n=40$)	治疗前	4.84 ± 1.06	2.72 ± 0.82	6.32 ± 1.28	8.64 ± 2.08
	治疗后 6 个月	11.66 ± 2.57	7.15 ± 1.12	3.55 ± 0.78	3.21 ± 0.89
t/P 特立帕肽组内值		13.070/0.001	12.180/0.001	4.081/0.001	9.944/0.001
t/P 联合组内值		15.520/0.001	20.180/0.001	11.690/0.001	15.180/0.001
t/P 治疗后组间值		4.873/0.001	8.640/0.001	8.826/0.001	5.660/0.001

表 5 2 组患者不良反应发生率比较 [例(%)]

组 别	例数	头晕	背痛	恶心	下肢痉挛	水肿	总发生率(%)
特立帕肽组	40	2(5.00)	2(5.00)	1(2.50)	1(2.50)	0	15.00
联合组	40	1(2.50)	2(5.00)	2(5.00)	2(5.00)	2(5.00)	22.50

安全性较高^[8]。特立帕肽是典型的甲状旁腺素类药物,能促进患者骨形成,是目前治疗骨质疏松的代表性药物^[9]。雷洛昔芬属于一种非类固醇苯并噻吩药物,通过与雌激素受体结合,起到抑制骨吸收作用^[10]。本结果显示,特立帕肽联合雷洛昔芬能提高患者腰椎、股骨粗隆、股骨颈骨密度,从而改善患者骨质量。陈丽敏等^[11]也指出,雷洛昔芬治疗绝经期骨质疏松症可以替代雌激素,增加患者骨密度,腰椎、股骨颈骨密度年变化率显著升高,本文研究结果中特立帕肽联合雷洛昔芬也能达到相同的治疗效果。

相关研究显示,骨代谢标志物能反映患者短期的治疗效果,可以作为绝经后骨质疏松症患者治疗效果的监测标志物^[12]。骨代谢主要包括成骨细胞介导新骨形成,破骨细胞介导旧骨吸收,在代谢过程中会产生一些代谢物质。相关研究指出,骨代谢标志物可反映整体骨重建的速率,具有快速和敏感的特点^[13]。OPG 属于同源核因子 κ B 受体活化因子的配体,主要与 RANKL 结合,对破骨细胞成熟具有抑制作用,在骨质疏松等骨代谢疾病中起到重要的参与作用^[14-15]。OCN 主要是由成骨细胞合成,具有高度钙离子亲和力的特性,参与骨矿化过程,TRAP-5b 的主要来源是破骨细胞^[16]。CTX- I 作为一种特异性产物主要由破骨细胞在骨吸收过程中降解产生,在反映骨吸收情况过程中发生着重要作用^[17]。本结果指出,特立帕肽联合雷洛昔芬能改善患者 TRAP-5b、CTX- I、OPG、OCN 水平,从而改善患者骨代谢异常状况。提示特立帕肽联合雷洛昔芬能抑制骨吸收,促进骨形成,对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常起到显著的改善作用。

本结果显示,特立帕肽联合雷洛昔芬能缓解患者骨痛,提高患者生活质量,从而改善患者临床症状。姜红峰等^[18]研究认为,特立帕肽能改善患者近期骨痛,并且对远期骨痛缓解效果也较为显著,本结果与其一致。本研究中联合组治疗总有效率达 90.00%,说明两药联合治疗效果显著,具有协同作用,达到治疗绝经后骨质疏松症的目的。特立帕肽通过刺激骨形成、骨吸收,避免绝经后妇女发生骨折,在治疗绝经后骨质疏松症方面发挥着重要作用^[19]。本结果显示,2 组骨折发生率差异无统计学意义,说明特立帕肽、雷洛昔芬在预防绝经后妇女发生骨折方面发挥着积极作用;特立帕肽、雷洛昔芬联合治疗,患者无严重并发症发生,说明在临床中应用安全性相对较高。徐陆晨等^[20]研究也证实这一观点。

综上所述,特立帕肽联合雷洛昔芬对绝经后骨质疏松症患者骨代谢异常改善效果显著,能缓解患者骨

痛,提高生活质量,预防骨折发生,为临床治疗绝经后骨质疏松症提供新的治疗方向。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

高倩、陈云霞:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;代嘉、王臣:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;刘春燕:课题设计,论文撰写,进行统计学分析;白婧:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改

参考文献

- [1] 甘卫冬,睦承志,林振原,等. 绝经后骨质疏松症患者血清 ICTP、PINP 与血脂相关性的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(9):1191-1194. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2018.09.014.
- [2] Zhang LL, Li CW, Liu K, et al. Discovery and identification of serum succinyl-proteome for postmenopausal women with osteoporosis and osteopenia[J]. Orthop Surg, 2019,11(5):784-793. DOI: 10.1111/os.12519.
- [3] 杨乃龙,刘婉娜,马学晓,等. 青岛地区特立帕肽治疗绝经后重度骨质疏松症 6 个月(阶段性)有效性和安全性[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2018,11(5):469-474. DOI:10.3969/j.issn.1674-2591.2018.05.006.
- [4] Jepsen DB, Ryg J, Hansen S, et al. The combined effect of Parathyroid hormone (1-34) and whole-body Vibration exercise in the treatment of postmenopausal Osteoporosis (PaVOS study): a randomized controlled trial[J]. Osteoporos Int, 2019,30(9):1827-1836. DOI: 10.1007/s00198-019-05029-z.
- [5] 李琳瑛,王晓玲,张建英. 1 年不间断阿仑膦酸钠治疗对绝经后骨质疏松症患者生活质量的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(1):37-41. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.01.008.
- [6] Taheri S, Mirzayeh Fashami F, Peiravian F, et al. Teriparatide in the treatment of severe postmenopausal osteoporosis: A cost-utility analysis[J]. Iran J Pharm Res, 2019,18(2):1073-1085. DOI: 10.22037/ijpr.2019.1100679.
- [7] Kumbhojkar SV, Kale AD, Kumbhojkar VR, et al. Salivary calcium as a diagnostic tool for screening of osteoporosis in postmenopausal women[J]. J Oral Maxillofac Pathol,2019,23(2):192-197. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_133_19.
- [8] Leder BZ. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs in osteoporosis therapy[J]. Curr Osteoporos Rep, 2017,15(2):110-119. DOI: 10.1007/s11914-017-0353-4.
- [9] 陆彬彬,高爱国. 重组人甲状旁腺素 1-34 治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1506-1509,1520. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2018.11.024.
- [10] 李刚,陈磊. 维生素 E 联合雷洛昔芬对绝经后女性骨质疏松症影响的临床观察[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(6):833-836. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.06.022.
- [11] 陈丽敏,刘歆,闫红敏. 利塞膦酸钠联合雷洛昔芬治疗绝经后骨质疏松症疗效分析[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(8):1159-1162. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.08.022.
- [12] 智信,陈晓,苏佳灿. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(11):1510-1513,1534. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2018.11.025.

miR-141-3p 和 miR-22-3p 在胰腺癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系

秦瑞峰, 薛佳栋, 霍浩然, 张佳, 袁增江

基金项目: 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1223108140)

作者单位: 056001 河北省邯郸市中心医院普外三科

通信作者: 袁增江, E-mail: hhr84525@163.com

【摘要】目的 探讨 miR-141-3p 和 miR-22-3p 在胰腺癌组织中的表达及其与临床病理特征及预后的关系。**方法** 选择 2014 年 1 月—2017 年 1 月在河北省邯郸市中心医院普外三科进行手术治疗的胰腺癌患者 92 例, 取其病灶标本及癌旁组织标本, 检测其 miR-141-3p、miR-22-3p 表达量的差异, 进一步根据胰腺癌组织中的表达量中位数分为高表达、低表达组各 46 例。比较不同 miR-141-3p、miR-22-3p 表达的胰腺癌患者临床病理特征差异, 分析不同 miR-141-3p、miR-22-3p 表达对患者预后的影响, 采用 COX 多因素风险回归模型分析影响胰腺癌患者预后的危险因素。**结果** 胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量均低于癌旁组织 ($t = 25.883, 42.527, P$ 均 < 0.01)。不同 miR-141-3p 表达的胰腺癌患者中 TNM 分期、肿瘤分化程度、远处转移的分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.246, 6.500, 4.423, P$ 均 < 0.05)。不同 miR-22-3p 表达的胰腺癌患者中远处转移的分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.331, P < 0.01$)。miR-141-3p、miR-22-3p 低表达组患者的生存率低于高表达组患者 ($\chi^2 = 6.873, 5.999, P$ 均 < 0.05)。TNM 分期较高、肿瘤分化程度较低、远处转移、miR-141-3p 低表达、miR-22-3p 低表达均是导致胰腺癌患者预后不良的危险因素 ($RR = 2.771, 1.781, 3.185, 1.609, 1.717, P$ 均 < 0.05)。**结论** 胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 均呈低表达, 可能参与疾病发生发展, 且在疾病预后的评估方面具有一定意义。

【关键词】 胰腺癌; miR-141-3p; miR-22-3p; 病理特征; 预后

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.010

Expression of miR-141-3p and miR-22-3p in pancreatic cancer and their relationship with clinicopathological features and prognosis Qin Ruifeng, Xue Jiadong, Huo Haoran, Zhang Jia, Yuan Zengjiang. Department of General Surgery, Handan Central Hospital of Hebei Province, Hebei Province, Handan 056001, China

Corresponding author: Yuan Zengjiang, E-mail: hhr84525@163.com

Fund program: Project of Science and Technology Research and Development Plan of Handan City, Hebei Province (1223108140)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-141-3p and miR-22-3p in pancreatic cancer and their relationship with clinicopathological features and prognosis. **Methods** From January 2014 to January 2017, ninety two patients with pancreatic cancer were selected for surgical treatment in general surgery Department of Handan Central Hospital in Hebei Province. The focus samples and the adjacent tissue samples were taken. The expression of miR-141-3p and miR-22-3p were detected. According to the expression of pancreatic cancer tissue, 46 cases were divided into high expression group and low expression group. The clinicopathological characteristics of pancreatic cancer patients with different expression of miR-141-3p and miR-22-3p were compared. To analyze the influence of different expression of miR-141-3p and miR-22-3p on the prognosis of patients. Cox multivariate risk regression model was used to analyze the risk factors that affect the prognosis of patients with pancreatic cancer. **Results** The expression levels of miR-141-3p and miR-22-3p in pancreatic cancer were lower than those in the adjacent tissues ($t = 25.883, t = 42.527, P < 0.01$). There were significant differences in TNM stage, tumor differentiation and distant metastasis among the patients with different miR-141-3p expression ($\chi^2 = 4.246, \chi^2 = 6.500, \chi^2 = 4.423, P < 0.05$). The distribution of distant metastasis in patients with different expression of miR-22-3p was statistically significant ($\chi^2 = 14.331, P < 0.01$). The survival rate of patients with low expression of miR-141-3p and miR-22-3p was lower than that of patients with high expression ($\chi^2 = 6.873, \chi^2 = 5.999, P < 0.05$). High TNM stage, low tumor differentiation,

distant metastasis, low expression of miR-141-3p, and low expression of miR-22-3p were all risk factors for poor prognosis of pancreatic cancer patients ($RR = 2.771, RR = 1.781, RR = 3.185, RR = 1.609, RR = 1.717, P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miR-141-3p and miR-22-3p in pancreatic cancer is low, which may be involved in the occurrence and development of the disease.

【Key words】 Pancreatic cancer; miR-141-3p; miR-22-3p; Pathological characteristics; Prognosis

胰腺癌是临床恶性程度较高的恶性肿瘤,手术后生存时间较短,目前发病率逐年上升且有年轻化趋势,严重危害患者的生命安全^[1-2]。如何改善胰腺癌患者的预后是目前临床研究的重点,但相关突破有限,分子靶向干预成为新思路。miRNA 是一种不能编码蛋白质的单链 RNA,在转录后水平调控基因表达,在细胞分化、增殖及凋亡的调节中发挥重要作用^[3-4]。miR-141 可抑制脑胶质瘤细胞生长并诱导其凋亡,miR-141-3p 作为其重要亚型可能也有相似作用^[5];miR-22-3p 可通过靶向胶质细胞升高基因-1(AEG-1)抑制非小细胞肺癌细胞的表达^[6],但目前关于上述 2 种 miRNA 在胰腺癌中扮演的角色研究极少。本研究检测胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量,探讨其与疾病特征、预后的内在联系,旨在寻找与胰腺癌发生发展关系密切的分子并为后续靶向治疗提供新思路,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月—2017 年 1 月在河北省邯郸市中心医院普外三科进行手术治疗的胰腺癌患者 92 例作为研究对象,纳入标准:(1)经术中组织病理确诊为原发性胰腺癌;(2)首次确诊疾病并接受手术治疗;(3)符合手术治疗指征且具有完整的临床资料;(4)年龄 ≤ 80 岁。排除标准:(1)合并其他原发性恶性肿瘤性疾病;(2)合并严重营养不良,无法耐受手术创伤;(3)术前接受胰腺癌保守治疗;(4)合并严重出血凝血功能异常和/或自身免疫性疾病;(5)合并肺炎等活动性感染。其中男 50 例,女 42 例,年龄 $32 \sim 78(57.29 \pm 8.11)$ 岁;肿瘤最大直径 (3.82 ± 0.86) cm;肿瘤位置,胰头 28 例,胰体尾 64 例;TNM 分期,Ⅰ~Ⅱ期 27 例、Ⅲ~Ⅳ期 65 例;肿瘤分化程度,低分化 40 例,中分化 39 例,高分化 13 例;淋巴结转移 62 例,远处转移 40 例。取患者术中病灶标本及癌旁组织标本各 92 份进行分析,病灶标本经病理检查确诊为胰腺导管腺癌,癌旁组织标本经病理检查确诊无癌细胞。本研究通过医院伦理委员会审核,患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-141-3p、miR-22-3p 在胰腺组织中的表达 取胰腺组织和癌旁组织适量,

采用 miRNA 提取试剂盒(北京天根,CW0627)提取组织中的 miRNA,采用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根,SW2142S)将 miRNA 反转录为 cDNA,miR-141-3p 引物序列为 5'-AGCGATTGAGCTGATGTCG-3',3'-TTAGGCTGACCACTGATGAC-5',miR-22-3p 引物序列为 5'-CTTGATGATAAGCTGAAGC-3',3'-CCTGAAGATGAGCGTAGGA-5'。采用 miRNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京天根,CW2142S)配置 PCR 反应体系后按照以下程序进行反应:95℃ 3 min 预变性,95℃ 5s、60℃ 15s 重复 40 个循环,根据循环曲线,以 U6 为内参,计算 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量。设置癌旁组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量为标准值 100,计算胰腺癌组织中对应 miRNA 的相对表达量。根据胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 表达量的中位数对胰腺癌患者进行亚分组,具体分为高表达、低表达组各 46 例。

1.3 预后随访 采用门诊或住院复查、电话回访等方式进行随访,随访截止时间为 2019 年 6 月 30 日,生存时间为确诊日期至死亡日期或截止日期的时间。

1.4 统计学方法 使用软件 SPSS 19.0 对数据进行统计处理。计量资料符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,2 组间比较采用 χ^2 检验;绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,用 Log-rank 检验对 2 组生存时间的差异进行分析;采用 COX 多因素风险回归模型分析预后的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-141-3p、miR-22-3p 在胰腺组织中的表达比较 胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量分别为 75.39 ± 9.12 、 64.22 ± 8.07 ,均低于癌旁组织的 100.00,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 miR-141-3p、miR-22-3p 在胰腺组织中的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	miR-141-3p	miR-22-3p
胰腺癌组织	92	75.39 ± 9.12	64.22 ± 8.07
癌旁组织	92	100.00	100.00
t 值		25.883	42.527
P 值		0.000	0.000

2.2 miR-141-3p、miR-22-3p 表达与胰腺癌临床病理特征的关系 不同 miR-141-3p 表达的胰腺癌患者中, TNM 分期、肿瘤分化程度、远处转移的分布差异有统计学意义($P < 0.05$), 性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤最大直径、淋巴结转移的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同 miR-22-3p 表达的胰腺癌患者中, 远处转移的分布差异有统计学意义($P < 0.05$), 性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤最大直径、TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移的分布差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 miR-141-3p、miR-22-3p 表达与预后的关系 患者随访 2 ~ 38 个月, 随访中位时间为 16 个月。miR-141-3p、miR-22-3p 高表达组患者的中位生存时间分别为 21.2 个月、20.8 个月, 明显高于 miR-141-3p、miR-22-3p 低表达组患者的 8.8 个月、9.0 个月, miR-141-3p、miR-22-3p 高表达组患者生存率高于低表达组, 经 Log-rank 检验, 差异有统计学意义 (Log-rank $\chi^2/P = 6.873/0.009, 5.999/0.014$), 见图 1。

2.4 胰腺癌患者预后的影响因素分析 建立 COX 比例回归模型, 因变量为胰腺癌患者预后状况 (存活 = 0, 死亡 = 1), 根据表 2 选择 $P < 0.05$ 的 TNM 分期、肿瘤分化程度、远处转移、miR-141-3p、miR-22-3p 为自变量。回归过程采用逐步后退法, 共有 TNM 分期、肿瘤分化程度、远处转移、miR-141-3p、miR-22-3p 纳入回归方程, 提示 TNM 分期较高、肿瘤分化程度较低、远处转移、miR-141-3p 低表达、miR-22-3p 低表达均是导致胰腺癌患者预后不良的危险因素 ($P < 0.05$), 见表 3。

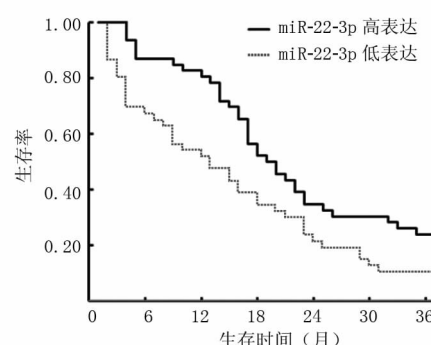
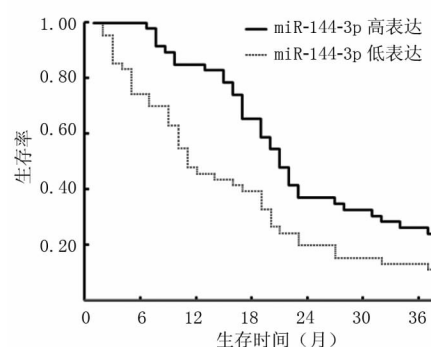


图 1 不同 miR-141-3p、miR-22-3p 表达患者的生存曲线

3 讨论

胰腺癌预后极差, 绝大多数患者在确诊后短期内死亡^[7]。手术切除肿瘤是改善胰腺癌患者预后的最主要方式, 但很大一部分患者仍出现术后短期内复发或者全身扩散, 寻找在胰腺癌发生发展过程中具有重

表 2 miR-141-3p、miR-22-3p 表达与胰腺癌临床病理特征的关系 [例(%)]

项 目		miR-141-3p		χ^2/P 值	miR-22-3p		χ^2/P 值
		高表达($n=46$)	低表达($n=46$)		高表达($n=46$)	低表达($n=46$)	
性别	男	24(52.17)	26(56.52)	0.175/0.675	23(50.00)	27(58.70)	0.701/0.402
	女	22(47.83)	20(43.48)		23(50.00)	19(41.30)	
年龄(岁)	≥ 60	32(69.57)	35(76.09)	0.494/0.482	34(73.91)	33(71.74)	0.055/0.815
	< 60	14(30.43)	11(23.91)		12(26.09)	13(28.26)	
肿瘤位置	胰头	13(28.26)	15(32.61)	0.205/0.650	17(36.96)	11(23.91)	1.848/0.174
	胰体尾	33(71.74)	31(67.39)		29(63.04)	35(76.09)	
肿瘤最大直径(cm)	≥ 4	11(23.91)	9(19.57)	0.256/0.613	9(19.57)	11(23.91)	0.256/0.613
	< 4	35(76.09)	37(80.43)		37(80.43)	35(76.09)	
TNM 分期	I ~ II 期	9(19.57)	18(39.13)	4.246/0.039	16(34.78)	11(23.91)	1.311/0.252
	III ~ IV 期	37(80.43)	28(60.87)		30(65.22)	35(76.09)	
肿瘤分化程度	低分化	15(32.61)	25(54.35)	6.500/0.039	18(39.13)	22(47.83)	1.118/0.572
	中分化	21(45.65)	18(39.13)		22(47.83)	17(39.96)	
	高分化	10(21.74)	3(6.52)		6(13.04)	7(15.22)	
淋巴结转移	是	30(65.22)	32(69.57)	0.198/0.656	27(58.70)	35(76.09)	3.166/0.075
	否	16(34.78)	14(30.43)		19(41.30)	11(23.91)	
远处转移	是	15(32.61)	25(54.35)	4.423/0.035	11(23.91)	29(63.04)	14.331/0.000
	否	31(67.39)	21(45.65)		35(76.09)	17(36.96)	

表 3 胰腺癌患者预后的影响因素分析

因 素	赋值说明	β	SE	Wald 值	P 值	RR	95% CI
TNM 分期	0 = I + II, 1 = III + IV	1.019	0.354	8.272	0.004	2.771	1.384 ~ 5.550
肿瘤分化程度	0 = 高分化, 1 = 中低分化	0.577	0.251	5.289	0.021	1.781	1.089 ~ 2.913
远处转移	否 = 0, 是 = 1	1.158	0.354	10.693	0.001	3.185	1.591 ~ 6.378
miR-141-3p 表达	0 = 高表达, 1 = 低表达	0.476	0.194	5.981	0.014	1.609	1.099 ~ 2.356
miR-22-3p 表达	0 = 高表达, 1 = 低表达	0.541	0.248	4.761	0.029	1.717	1.057 ~ 2.790

要作用的分子并进行靶向干预可能是未来该病治疗的新手段之一。基于目前 miRNA 在恶性肿瘤组织中的异常表达及在病情演进过程中发挥的重要作用,推测其在胰腺癌发生发展中也可能发挥一定作用。miR-141-3p、miR-22-3p 均是重要的 miRNA,国外研究报道,miR-141-3p 在多种恶性肿瘤组织中表达不一,如可抑制肾癌细胞生长但对直肠癌细胞具有促生长作用,上调其表达可抑制结直肠癌细胞的生长转移^[8-10];国内研究指出^[11],miR-141-3p 异常表达可影响卵巢癌细胞的恶性生物学行为。miR-22-3p 由 miR-22 前体 3' 端臂剪切而来,其在多种恶性肿瘤组织中呈异常低表达,可抑制乳头状甲状腺癌进展,可能与其靶向抑制 ATP 环化酶的作用相关^[12-14];抑制 miR-22-3p 表达可促进肺癌进展,上调 miR-22-3p 表达可抑制肝癌细胞增殖^[15-16]。目前国内关于 miR-141-3p、miR-22-3p 对胰腺癌发生发展的影响研究极少,本研究检测胰腺癌组织、癌旁组织中上述 miRNA 的表达量发现,胰腺癌组织中 miR-141-3p、miR-22-3p 的表达量较癌旁组织明显降低,推测异常低表达的 miR-141-3p、miR-22-3p 参与胰腺癌的发生发展。这与上述 2 种 miRNA 对肿瘤的抑制作用吻合,可能与 Yoon 等^[17]的研究中所述靶向 STAT4 的作用相关,但具体机制未明,有待后续基础研究深入明确。

低 miR-141-3p、miR-22-3p 表达的胰腺癌患者 TNM 分期较高、肿瘤分化程度较低、远处转移发生率较高,而其在性别、年龄、肿瘤最大直径、淋巴结转移方面的差异则不明显。TNM 分期较高、肿瘤分化程度较低、远处转移均与癌症恶性程度关系最为密切,以上结果从临床病理特征方面说明,miR-141-3p、miR-22-3p 异常低表达可加剧胰腺癌恶性程度。miR-141-3p 低表达促进胰腺癌恶性分化及远处转移的机制不明,国外研究认为,可能与其影响 PI3K/Akt 信号通路活性、调节 trim13 相关凋亡通路功能等相关^[18-19]。在 miR-22-3p 影响癌细胞恶性进展的机制方面,有研究认为可能与其调控 eIF4EBP3、sirt1 等基因表达的作用相关^[20-21],但目前尚无结论。关于 miR-141-3p、miR-22-3p 对胰腺癌细胞生物学行为影响的直接机制研究目

前极少,有待后续研究进一步明确。

经 COX 回归分析发现,TNM 分期较高、分化程度较低、合并远处转移是导致胰腺癌患者生存时间缩短的危险因素,与此同时 miR-141-3p、miR-22-3p 低表达也是胰腺癌患者预后不佳的直接影响因素,这与上述 miR-141-3p、miR-22-3p 低表达者的病理特点结果一致,说明 miR-141-3p、miR-22-3p 低表达可促进胰腺癌病情进展。最后绘制生存曲线发现,miR-141-3p、miR-22-3p 低表达的胰腺癌患者生存时间较短,进一步佐证了 miR-141-3p、miR-22-3p 表达变化对患者预后的影响。

综上所述,胰腺癌组织中存在 miR-141-3p、miR-22-3p 异常低表达现象,与 TNM 分期、肿瘤分化程度、远处转移共同成为胰腺癌预后不良的独立危险因素。靶向上调 miR-141-3p、miR-22-3p 表达量可能成为日后胰腺癌治疗的新思路。本次研究也存在以下局限性,如纳入病例数较少、未涉及 miRNA 表达影响胰腺癌病情的分子机制,有待后续大样本临床研究、基础研究进一步探讨。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

秦瑞峰:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;薛佳栋:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;霍浩然、张佳:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;袁增江:进行统计学分析

参考文献

- [1] Ben QW, Liu J, Sun YW, et al. Cigarette smoking and mortality in patients with pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Pancreas*, 2019, 48(8): 985-995. DOI:10.1097/MPA.0000000000001383.
- [2] Cho J, Scragg R, Pandol SJ, et al. Antidiabetic medications and mortality risk in individuals with pancreatic cancer-related diabetes and postpancreatitis diabetes: A Nationwide cohort study[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(9): 1675-1683. DOI:10.2337/dc19-0145.
- [3] 李彦宁, 王建华. miRNA 及其在肝细胞癌发生发展中作用的研究进展[J]. *山东医药*, 2019, 59(1): 90-93. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.01.027.
- [4] 黄秋萍, 袁欢, 王宜林, 等. miRNA 对自然杀伤细胞生长发育及功能的调控作用[J]. *分子诊断与治疗*, 2019, 11(1): 63-67. DOI:10.3969/j.issn.1674-6929.2019.01.014.
- [5] 黎国雄, 黄敏, 胡翔, 等. miR-141 抑制脑胶质瘤血管生成拟态

- 形成及机制[J]. 河北医药, 2019, 41(1): 106-109. DOI:10.3969/j. issn. 1002-7386. 2019. 01. 026.
- [6] 常永梅, 颜文森, 江小运, 等. miR-22-3p 靶向 AEG-1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(14): 2267-2270. DOI:10.3969/j. issn. 1006-5725. 2017. 14. 005.
- [7] 许勇, 李波, 林强, 等. MicroRNA-92a 在胰腺癌中的表达及对肿瘤生长的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(3): 52-56. DOI:10.3969/j. issn. 1005-8982. 2019. 03. 010.
- [8] Lei K, Liang X, Gao Y, et al. Lnc-ATB contributes to gastric cancer growth through a MiR-141-3p/TGFβ2 feedback loop[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 514-521. DOI:10.1016/j. bbr. 2017. 01. 094.
- [9] Liep J, Kilic E, Meyer HA, et al. Cooperative effect of miR-141-3p and miR-145-5p in the regulation of targets in clear cell renal cell carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157801. DOI:10.1371/journal. pone.0157801.
- [10] Meltzer S, Bjornetro T, Lyckander LG, et al. Circulating exosomal miR-141-3p and miR-375 in metastatic progression of rectal cancer[J]. Transl Oncol, 2019, 12(8): 1038-1044. DOI:10.1016/j. tranon. 2019. 04. 014.
- [11] 杜趁香, 王焱, 武海英. 过表达 miR-141-3p 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/Akt 信号通路促进卵巢癌 A2780 细胞的恶性生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(5): 563-568. DOI:10.3872/j. issn. 1007-385x. 2019. 05. 013.
- [12] Wang M, Chen B, Ru Z, et al. CircRNA circ-ITCH suppresses papillary thyroid cancer progression through miR-22-3p/CBL/β-catenin pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504(1): 283-288. DOI:10.1016/j. bbr. 2018. 08. 175.
- [13] Chen TH, Chiu CT, Lee C, et al. Circulating microRNA-22-3p predicts the malignant progression of precancerous gastric lesions from intestinal metaplasia to early adenocarcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(9): 2301-2308. DOI:10.1007/s10620-018-5106-4.
- [14] Wang B, Yao Q, Xu D, et al. MicroRNA-22-3p as a novel regulator and therapeutic target for autoimmune diseases[J]. Int Rev Immunol, 2017, 36(3): 176-181. DOI: 10.1080/08830185. 2017. 1281272.
- [15] Dong HX, Wang R, Jin XY, et al. LncRNA DGCR5 promotes lung adenocarcinoma (LUAD) progression via inhibiting hsa-mir-22-3p[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5): 4126-4136. DOI:10.1002/jcp. 26215.
- [16] 贺红杰, 李明亮, 许广松. miR-22-3p 通过 Snail1 调控上皮-间质转化抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的迁移和侵袭[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(18): 2085-2089. DOI:10.13699/j. cnki. 1001-6821. 2019. 18. 034.
- [17] Yoon YH, Hwang HJ, Sung HJ, et al. Upregulation of complement factor H by SOCS-1/3 STAT4 in lung cancer[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(4): E471. DOI:10.3390/cancers11040471.
- [18] Ishibashi O, Akagi I, Ogawa Y, et al. MiR-141-3p is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and targets pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2, a negative regulator of the PI3K/Akt pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(2): 507-513. DOI:10.1016/j. bbr. 2018. 05. 025.
- [19] Moon SU, Park Y, Park MG, et al. Theragnosis by a miR-141-3p molecular beacon: simultaneous detection and sensitization of 5-fluorouracil resistant colorectal cancer cells through the activation of the TRIM13-associated apoptotic pathway[J]. Chem Commun (Camb), 2019, 55(52): 7466-7469. DOI:10.1039/c9cc01944h.
- [20] Lv KT, Liu Z, Feng J, et al. MiR-22-3p regulates cell proliferation and inhibits cell apoptosis through targeting the eIF4EBP3 gene in human cervical squamous carcinoma cells[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(2): 142-152. DOI:10.7150/ijms. 21645.
- [21] Zhao L, Hu K, Cao J, et al. LncRNA miat functions as a ceRNA to upregulate sirt1 by sponging miR-22-3p in HCC cellular senescence[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(17): 7098-7122. DOI:10.18632/aging. 102240.

(收稿日期:2019-11-02)

(上接 260 页)

- [13] 冬梅, 武剑, 韩杏梅, 等. 绝经后骨质疏松症患者胰岛素样生长因子 1 与相关骨代谢指标的关系[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(36): 5862-5867. DOI:10.3969/j. issn. 2095-4344. 2017. 36. 021.
- [14] Wu F, Zhou D, Shen G, et al. Association of VDR and OPG gene polymorphism with osteoporosis risk in Chinese postmenopausal women[J]. Climacteric, 2019, 22(2): 208-212. DOI: 10.1080/13697137. 2018. 1554643.
- [15] Peng Y, Sheng X, Xue F, et al. The genetic association between osteoprotegerin (OPG) gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) in postmenopausal women: A meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(51): e13507. DOI: 10.1097/MD.00000000000013507.
- [16] Lin XS, Wang HY, Zhang Z, et al. Effects of acupoint application therapy with TianGui Powder on osteoporosis in ovariectomized rats through TGF-β1 and Smad2/3 signaling pathway[J]. Orthop Surg, 2019, 11(1): 143-150. DOI: 10.1111/OS. 12427.
- [17] 林静, 张洁, 陈燕. 补肾药膳方对绝经后骨质疏松症模型大鼠 CTX-I 指标及骨组织形态的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(4): 389-392. DOI:10.3969/j. issn. 1674-070X. 2018. 04. 006.
- [18] 姜红峰, 彭绍蓉, 黄蔡华. 特立帕肽治疗老年性骨质疏松症的疗效及生活质量改善[J]. 医药导报, 2017, 36(6): 622-625. DOI: 10.3870/j. issn. 1004-0781. 2017. 06. 008.
- [19] 汪菲菲, 边平达, 王珏, 等. 高龄女性骨质疏松症患者对特立帕肽治疗的依从性及用药前后骨密度等指标的变化[J]. 浙江医学, 2019, 41(9): 951-953, 958. DOI: 10.12056/j. issn. 1006-2785. 2019. 41. 9. 2017-2103.
- [20] 徐陆晨, 李运峰. 骨质疏松性骨折药物治疗的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(7): 947-953. DOI:10.3969/j. issn. 1006-7108. 2017. 07. 023.

(收稿日期:2019-09-24)

雌激素受体 β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性与子宫内膜异位症的关系研究

郝娜, 田芸婕, 贾亚静, 路晓琳

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目(20191838)

作者单位: 056001 邯郸市中心医院妇科(郝娜、路晓琳); 050010 石家庄, 河北医科大学第四医院妇科(田芸婕、贾亚静)

通信作者: 郝娜, E-mail: haonana4823@163.com

【摘要】目的 研究雌激素受体 β (ER β) 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性与子宫内膜异位症(EMs)的关系。**方法** 选取 2017 年 6 月—2019 年 6 月邯郸市中心医院、河北医科大学第四医院妇科收治的 60 例 EMs 患者(EMs 组)作为研究对象,另选取同期邯郸市中心医院体检的健康女性 67 例作为对照组,采用聚合酶链反应—限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测受试者血清中 ER β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性,分析 rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率与 EMs 患者临床病理特征的关系,采用多因素 Logistic 回归分析 EMs 患病的危险因素。**结果** 与对照组相比,EMs 组 rs1256064 等位基因 pp 基因型数显著升高,PP 基因型数显著降低($U/P=10.348/0.006$),p 等位基因频率显著升高和 P 等位基因频率显著降低($\chi^2/P=9.313/0.002$);与对照组相比,EMs 组 rs1256049 等位基因 PP 基因型数显著升高,Pp 基因型数显著降低($U/P=9.227/0.010$),P 等位基因频率显著升高,p 等位基因频率显著降低($\chi^2/P=5.398/0.020$)。临床病理特征分析发现,rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率与 EMs 患者临床分期、有无流产、有无不孕史有关($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析表明,临床分期、不孕史、rs1256064 位点 p 等位基因频率升高、rs1256049 位点 P 等位基因频率升高是 EMs 发病的危险因素($P<0.05$)。**结论** EMs 患者 rs1256064 等位基因 pp 基因型数和 p 等位基因频率、rs1256049 等位基因 PP 基因型数和 P 等位基因频率均显著升高,与患者临床分期、不孕史有关,是 EMs 患病的危险因素。

【关键词】 雌激素受体 β ; rs1256064; rs1256049; 子宫内膜异位症; 基因多态性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.011

Study on the relationship between single nucleotide polymorphisms at rs1256064 and rs1256049 of estrogen receptor β gene and endometriosis Hao Na*, Tian Yunjie, Jia Yajing, Lu Xiaolin. *Department of Gynecology, Handan Central Hospital, Hebei Province, Handan 056001, China

Corresponding author: Hao Na, E-mail: haonana4823@163.com

Fund program: Hebei Medical Science Research Project (20191838)

【Abstract】 Objective To study the relationship between single nucleotide polymorphisms at rs1256064 and rs1256049 of estrogen receptor β (ER β) gene and endometriosis (EMS). **Methods** Sixty EMS patients who were admitted to Handan Central Hospital and the Fourth Hospital of Hebei Medical University from June 2017 to June 2019 were selected as the study objects, and 67 healthy women who were examined in Handan Central Hospital at the same time were selected as the control group, the single nucleotide polymorphisms at rs1256064 and rs1256049 of ER β gene were detected by PCR-RFLP, and the relationships between the frequencies of rs1256064 and rs1256049 alleles and the clinicopathological characteristics of EMS patients were analyzed. Multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors of EMS. **Results** Compared with the control group, the pp genotype number of rs1256064 allele was significantly higher, the PP genotype number was significantly lower ($U/P=10.348/0.006$), the p allele frequency was significantly higher and the P allele frequency was significantly lower ($\chi^2/P=9.313/0.002$); compared with the control group, the PP genotype number of rs1256049 allele was significantly higher and the Pp genotype number was significantly lower in the EMS group ($U/P=9.227/0.010$), P allele frequency increased significantly, p allele frequency decreased significantly ($\chi^2/P=5.398/0.020$). The analysis of clinicopathological features showed that the allele frequencies of rs1256064 and rs1256049 were related to the clinical stage, abortion and infertility history of EMS patients ($P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that clinical stage, history of infertility,

increased p allele frequency at rs1256064 and P allele frequency at rs1256049 were the risk factors of EMs ($P < 0.05$). **Conclusion** PP genotype number and P allele frequency of rs1256064 allele, PP genotype number and P allele frequency of rs1256049 allele were significantly increased in patients with EMS, which were related to clinical stage and infertility history, and were risk factors of EMS.

[Key words] Estrogen receptor β ; rs1256064; rs1256049; Endometriosis; Gene polymorphism

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)多发于育龄期妇女,由多因素、多遗传基因作用导致具有活性的子宫内膜组织异位,生长在子宫腔以外并反复周期性出血,从而引起患者慢性盆腔痛、痛经、不孕等^[1-2]。近年来,随着社会快速发展,生活节奏加快,临床上 EMs 发病率呈逐年升高的趋势,成为临床上常见且危害较大的一类妇科疾病,严重影响妇女的生活质量、生育功能和身心健康^[3]。目前 EMs 的发病机制尚未得到明确阐明,临床上也缺乏治疗 EMs 的特效药,因此探究与 EMs 发生发展相关基因,以期找寻预防、诊断和治疗 EMs 的新靶点对 EMs 患者意义重大。雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)作为可溶性糖蛋白分子在转录水平上调节基因表达,雌激素在机体内发挥生理功能必须通过 ER β 介导^[4-5]。EMs 受雌激素调控,因此 ER β 基因的变化可能影响雌激素的生理作用,从而导致 EMs 发病^[6]。ER β 基因在 EMs 患者血清中表达水平未见相关研究,因此本研究使用聚合酶链反应—限制性内切酶片段长度多态性方法检测 EMs 患者血清中 ER β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性,分析 rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率与 EMs 患者临床病理特征的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取于 2017 年 6 月—2019 年 6 月邯郸市中心医院、河北医科大学第四医院妇科收治的 60 例 EMs 患者作为研究对象(EMs 组),依据 2015 年“子宫内膜异位症的诊治指南”^[7],超声影像为无回声区内有密集光,腹腔镜镜检查病变形态,经病理检查确诊。EMs 组年龄 21 ~ 51 (35.23 $\pm$ 3.48) 岁,体质指数 (22.94 $\pm$ 3.19) kg/m²;根据美国生育协会在 1997 年修订的 EMs 分期(R-AFS)^[8],I 期 8 例,II 期 12 例,III 期 19 例,IV 期 21 例;病理类型,卵巢型 21 例,腹膜型 20 例,混合型 19 例;痛经情况,无或轻度痛经 29 例,中或重度痛经 31 例;产次,0 次 11 例,1 次 34 例,≥2 次 15 例;有流产史 33 例;有不孕史 19 例。另选取同期来邯郸市中心医院体检的健康女性 67 例作为对照组,年龄 22 ~ 52 (36.17 $\pm$ 2.91) 岁,体质指数 (22.74 $\pm$ 4.50) kg/m²;产次,0 次 13 例,1 次 36 例,≥2 次 18 例;有流产史 36 例;有不孕史 20 例。2 组受

试者年龄、体质指数、孕产情况比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准通过,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》,入选者知情同意并签署知情同意书。

1.2 纳入、排除标准 纳入标准:(1)月经周期正常;(2)6 个月内未曾使用激素类药物。排除标准:(1)患有其他妇科肿瘤或妇科病的者;(2)伴有心、肾、肝功能不全者;(3)免疫功能缺陷者;(4)处于妊娠期的受试者。

1.3 主要试剂和仪器 rs1256064 和 rs1256049 引物序列由上海生物工程公司合成;DNA 提取试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;SimpliAmp PCR 仪购自美国赛飞世尔科技有限公司。

1.4 检测方法 清晨取所有受试者空腹静脉血 6 ml,用肝素抗凝,随后置于 -20℃ 冰箱中待用。

1.4.1 用 DNA 提取试剂盒提取基因:rs1256064 位点上游引物序列 5'-TGATTGCTCAGCACATAGCC-3',下游引物序列 5'-GACAGGTCTTCAGCACCACA-3';rs1256049 位点上游引物序列 5'-TCTACACACACAGGGAGCTGA-3',下游引物序列 5'-CAGGACTTTGTTCCCACTCAC-3';PCR 扩增体系共 20.0 μ l,其中上下游引物 (5 μ mol) 各 2.0 μ l,ddH₂O 4.0 μ l,SYBR Mix 10.0 μ l,cDNA (25 ng/ml) 2.0 μ l。PCR 反应条件:95℃ 5min, (95℃ 变性 45s,60℃ 延伸 60s) $\times$ 40,72℃ 10min。

1.4.2 酶切 PCR 扩增引物:rs1256064 和 rs1256049 位点的 PCR 产物经 Rsa I 限制性内切酶进行酶切,酶切体系共 20.0 μ l,其中 PCR 扩增产物 16 μ l,10 $\times$ Buffer 2.1 μ l,RsaI 0.7 μ l,BSA 0.2 μ l。酶切反应条件为 37℃ 4 h。将酶切后的产物经凝胶电泳分析,凝胶成像仪成像,随后根据酶切产物片段的大小确定基因型。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行分析。基因型和等位基因频率采用直接计数法计算,分析基因型分布与 Hardy-Weinberg 平衡程度。计数资料以频数或率 (%) 表示,进行 χ^2 检验;正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,进行 t 检验;采用多因素 Logistic 回归分析发生 EMs 的危险因素。 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组 rs1256064 位点基因型和等位基因频率比较
经 PCR 扩增出 rs1256064 位点基因 318 bp 片段,经 Rsa I 限制性内切酶酶切后产生 153 bp 和 165 bp 2 个片段,在群体中组成 pp、Pp 和 PP 3 种不同类型的基因型。与对照组相比,EMs 组患者 rs1256064 等位基因 pp 基因型数显著升高,PP 基因型数显著降低($P < 0.01$),p 等位基因频率显著升高,P 等位基因频率显著降低($P < 0.01$),见表 1。

2.2 2 组 rs1256049 位点基因型和等位基因频率比较
经 PCR 扩增出 rs1256049 位点基因 299 bp 片段,经 Rsa I 限制性内切酶酶切后产生 105 bp 和 172 bp 2 个片段,在群体中组成 pp、Pp 和 PP 3 种不同类型的基因

型。与对照组相比,EMs 患者组 rs1256049 等位基因 PP 基因型数显著升高,Pp 基因型数显著降低($P < 0.05$),P 等位基因频率显著升高,p 等位基因频率显著降低($P < 0.05$),见表 2。

2.3 rs1256064、rs1256049 位点基因与子宫内膜异位症临床病理特征的关系
rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率与 EMs 患者临床分期、有无流产、有无不孕史有关($P < 0.05$),与 EMs 患者年龄、病理类型、有无痛经、产次无关($P > 0.05$),见表 3。

2.4 影响子宫内膜异位症发病的多因素 Logistic 回归分析
多因素 Logistic 回归分析表明,临床分期、不孕史、rs1256064 位点 p 等位基因频率升高、rs1256049 位点 P 等位基因频率升高是 EMs 发病的危险因素($P < 0.05$),见表 4。

表 1 2 组 rs1256064 位点基因型和等位基因频率比较

组 别	例数	基因型数[例(%)]			等位基因频率[基因数(%)]	
		pp	Pp	PP	p	P
对照组	67	6(8.95)	34(50.75)	27(40.30)	46(34.33)	88(65.67)
EMs 组	60	18(30.00)	28(46.67)	14(23.33)	64(53.33)	56(46.67)
U/χ^2 值		$U = 10.348$			$\chi^2 = 9.313$	
P 值		0.006			0.002	

表 2 2 组 rs1256049 位点基因型和等位基因频率比较

组 别	例数	基因型数[例(%)]			等位基因频率[基因数(%)]	
		pp	Pp	PP	p	P
对照组	67	6(8.96)	36(53.73)	25(37.31)	48(35.82)	86(64.18)
EMs 组	60	5(8.33)	17(28.33)	38(63.34)	27(22.50)	93(77.50)
U/χ^2 值		$U = 9.227$			$\chi^2 = 5.398$	
P 值		0.010			0.020	

表 3 rs1256064 和 rs1256049 位点与子宫内膜异位症临床病理特征的关系 [例(%)]

病理特征		例数	rs1256064 等位基因频率				rs1256049 等位基因频率			
			p	P	χ^2	P 值	p	P	χ^2	P 值
年龄(岁)	<35	24	11(45.83)	13(54.17)	2.433	0.119	10(41.67)	14(58.33)	0.026	0.871
	≥35	36	25(69.44)	11(30.56)			13(36.11)	23(63.89)		
临床分期	I ~ II 期	20	7(35.00)	13(65.00)	6.328	0.012	13(65.00)	7(35.00)	7.412	0.006
	III ~ IV 期	40	29(72.50)	11(27.50)			10(25.00)	30(75.00)		
病理类型	覆膜型	20	13(65.00)	7(35.00)	0.315	0.854	11(55.00)	9(45.00)	0.973	0.615
	卵巢型	21	12(57.14)	9(42.86)			10(47.62)	11(52.38)		
	混合型	19	11(57.89)	8(42.11)			12(63.16)	7(36.84)		
痛经	无或轻度	29	16(55.17)	13(44.83)	0.225	0.635	8(27.59)	21(72.41)	1.993	0.164
	中或重度	31	20(64.52)	11(35.48)			15(48.39)	16(51.61)		
流产	有	33	14(42.42)	19(57.58)	7.882	0.005	19(57.58)	14(42.42)	9.749	0.002
	无	27	22(81.48)	5(18.52)			4(14.81)	23(85.19)		
产次	0 次	11	4(36.36)	7(63.64)	4.427	0.109	3(27.27)	8(72.73)	1.209	0.546
	1 次	34	24(70.59)	10(29.41)			15(44.12)	19(55.88)		
	≥2 次	15	8(53.33)	7(46.67)			5(33.33)	10(66.67)		
不孕史	有	19	6(31.58)	13(68.42)	7.705	0.006	12(63.16)	7(36.84)	4.881	0.027
	无	41	30(73.17)	11(26.83)			12(29.27)	29(70.73)		

表 4 影响 EMs 发病的多因素 Logistic 回归分析

变量	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
流产	0.367	0.385	0.909	0.549	1.444	0.318 ~ 6.557
临床分期	1.203	0.635	3.589	0.013	3.331	1.708 ~ 6.496
不孕史	0.980	0.521	3.538	0.018	2.665	1.627 ~ 4.365
rs1256064 等位基因 p	0.805	0.539	2.142	0.028	2.238	1.718 ~ 4.251
rs1256049 等位基因 P	1.008	0.553	3.323	0.015	2.739	1.538 ~ 4.879

3 讨 论

EMs 因侵袭性强、复发率高成为临床上妇科难治疾病,育龄期妇女发病率高达 10%,成为妇女不孕症的危险因素^[9-10]。有研究发现,不孕症妇女患者中 25% ~ 50% 伴有 EMs,盆腔体检正常的育龄女性超过 50% 患有不同程度的 EMs。到目前为止,很多学者对 EMs 的发病机制开展大量的临床研究和基础实验,但仍无法完全阐述 EMs 的具体发病机制^[11-12]。学术界对免疫学、子宫内膜种植、遗传学发病机制颇有争论,随着生物学的不断发展,ER β 基因与 EMs 发生发展的关系受到重视,成为研究的热点^[13]。但大多从细胞或动物模型上探讨 ER β 与 EMs 的关系,在临床上未曾对 ER β 基因具体核苷酸位点进行研究。因此本研究选 ER β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸,试图从基因水平上找寻 ER β 基因 rs1256064 和 rs1256049 位点单核苷酸多态性与 EMs 发病之间的相关性。

ER β 基因由 40 kb 碱基组成,位于 14q23-24.1,包含 8 个外显子和 7 个内含子,广泛分布在两性组织和生殖器官中,在人乳腺、卵巢、子宫内膜中表达,且分泌期低表达,增生期高表达^[14-15]。研究发现,ER β 可能与子宫内膜癌、子宫内膜异位症相关^[16]。李鹏程等^[17]研究发现,ER β 在 EMs 大鼠模型子宫内膜中高表达,可上调血管内皮生长因子(VEGF)、氨基末端激酶(c-Jun)表达水平,在 EMs 发展中发挥重要作用。在广西壮族绝经妇女血清雌二醇、孕酮水平研究中,ER β 基因经 Rsa-I 内切酶酶切出 RR、Rr、rr、r、R 基因组,r 基因组孕酮和雌二醇水平显著降低,黄体生成素、促卵泡激素显著升高^[18]。本研究发现,经 PCR 扩增出 rs1256064 位点基因 318 bp 片段,经 Rsa I 限制性内切酶酶切后分别产生 153 bp、165 bp 2 个片段,与对照组相比,EMs 组患者 rs1256064 等位基因 pp 基因型数和 p 等位基因频率显著升高,PP 基因型数和 P 等位基因频率显著降低,提示 rs1256064 位点基因与 EMs 相关。对 rs1256049 等位基因研究发现,经 PCR 扩增出 rs1256049 位点基因 299 bp 片段,经 Rsa I 限制性内切酶酶切后产生 105 bp 和 172 bp 2 个片段,与对照组

相比,EMs 组患者 rs1256049 等位基因 PP 基因型数和 P 等位基因频率显著升高,Pp 基因型数和 p 等位基因频率显著降低,提示 rs1256049 位点基因与 EMs 有关,可能此类基因特征患者更易患 EMs。临床病理特征分析发现,rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率与 EMs 患者临床分期、有无流产、有无不孕史有关,与 EMs 患者年龄、病理类型、有无痛经、产次无关,提示 rs1256064 和 rs1256049 位点等位基因频率可能参与 EMs 进程,与 EMs 发生发展相关,多因素 Logistic 回归分析表明,临床分期、不孕史、rs1256064 位点 p 等位基因频率升高、rs1256049 位点 P 等位基因频率升高是 EMs 发病的危险因素,提示该类患者具有患 EMs 风险,应定期体检,注意防治。

综上所述,EMs 患者 rs1256064 位点基因 pp 基因型和 p 等位基因频率、rs1256049 位点基因 PP 基因型和 P 等位基因频率显著升高,与患者临床分期、不孕史有关,是 EMs 患病的危险因素,提示 rs1256064 和 rs1256049 位点可能作为早期预防和判断 EMs 的临床指标。但 rs1256064 和 rs1256049 位点基因具体作用机制还有待从动物和细胞模型进行深入研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

郝娜:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;田芸婕:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;贾亚静:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;路晓琳:进行统计学分析

参考文献

- [1] Ahn SH, Singh V, Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities[J]. Fertil Steril, 2017, 107(3):523-532. DOI:10.1016/j.fertnstert.2017.01.009.
- [2] Moore JS, Gibson PR, Perry RE, et al. Endometriosis in patients with irritable bowel syndrome: Specific symptomatic and demographic profile, and response to the low FODMAP diet[J]. Aust NZJ Obstet Gynaecol, 2017, 57(2):201-205. DOI:10.1111/ajo.12594.
- [3] Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, et al. Epidemiology of endometriosis: A large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members[J]. BJOG, 2017, 125(1):55-62. DOI:10.1111/1471-0528.14711.
- [4] Warner M, Huang B, Gustafsson JA. Estrogen receptor β as a pharmaceutical target[J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(1):92-99. DOI:10.1016/j.tips.2016.10.006.

- [5] Deng F, Li M, Shan WL, et al. Correlation between epidermal growth factor receptor mutations and the expression of estrogen receptor- β in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4):2359-2365. DOI:10.3892/ol.2017.5711.
- [6] 肖赞赞, 杨清. 雌激素合成与子宫内膜异位症的研究进展[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017, 33(8):862-865. DOI:10.19538/j. flk2017080123.
- [7] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(3):161-169. DOI:10.3760/cma. j. issn. 0529-567x. 2015. 03. 001.
- [8] ASRM. Revised American society for reproductive medicine classification of endometriosis: 1996[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(5):817-821. DOI:10.1016/S0015-0282(97)81391-X.
- [9] Tomassetti C, DHooghe T. Endometriosis and infertility: insights into the causal link and management strategies[J]. *Best Pract Res Clin Ob*, 2018, 51:25-33. DOI:10.1016/j. bpubgyn.2018.06.002.
- [10] Fung JN, Montgomery GW. Genetics of endometriosis: State of the art on genetic risk factors for endometriosis[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 50: 61-71. DOI: 10. 1016/j. bpubgyn. 2018. 01. 012.
- [11] Xue H, Liu M, Hao W, et al. Clinical evaluation of laparoscopic surgery combined with triptorelin acetate in patients with endometriosis and infertility[J]. *Pak J Med Sci*, 2018, 34(5): 1064-1069. DOI:10.12669/pjms.345.15574.
- [12] Montenegro ML, Bonochoer CM, Meola J, et al. Effect of physical exercise on endometriosis experimentally induced in rats[J]. *Reprod Sci*, 2019, 26(6): 785-793. DOI:10.1016/j. jmig. 2015. 08. 623.
- [13] Simmen RC, Kelley AS. Reversal of fortune: estrogen receptor- β in endometriosis[J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 57(2): F23-F27. DOI:10.1530/JME-16-0080.
- [14] 曾益为, 刘仁斌. 雌激素受体 β 水平预测乳腺癌预后的研究进展[J]. *中华普通外科学文献: 电子版*, 2019, 13(1):58-62. DOI:10.3877/cma. j. issn. 1674-0793. 2019. 01. 013.
- [15] 朱松岩, 古兆森, 闫明, 等. siRNA 沉默雌激素受体 β 表达和雌二醇干预对 A549 细胞的影响[J]. *江苏医药*, 2018, 44(11): 1225-1230. DOI:10.19460/j. cnki. 0253-3685. 2018. 11. 001.
- [16] 赵红伟, 张宗峰. 雌激素受体 β 在子宫内膜异位症中的作用及意义[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(3):315-318. DOI:10.3969/j. issn. 1671-6450. 2018. 03. 025.
- [17] 李鹏程, 刘玉玲, 党群, 等. 雌激素受体 α 、雌激素受体 β 、激活蛋白 1、血管内皮生长因子在大鼠子宫内膜异位症模型中的表达及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(14):7-11. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-8982. 2016. 14. 002.
- [18] Lin PI, Tai YT, Chan WP, et al. Estrogen/ER α signaling axis participates in osteoblast maturation via upregulating chromosomal and mitochondrial complex gene expressions[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1):1169-1186. DOI:10.18632/oncotarget.23453.

(收稿日期:2019-11-02)

撰写医学论文主体部分的要求

- 1 **前言** 概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。仅需提供与研究主题紧密相关的参考文献,切忌写成文献综述。不要涉及本研究中的数据或结论。一般以 200~300 个汉字为宜,占全文字数的 5% 左右。
- 2 **方法** 描述研究对象(人或实验动物,包括对照组)的选择及其基本情况,以及研究所采用的方法(包括分组方法)。实验研究的论文常写成“材料与方法”,临床研究论文常写成“资料与方法”。临床试验研究还应说明试验程序是否经所在单位或地区伦理学相关机构的批准,研究对象是否知情同意并签署知情同意书。
 - 2.1 **观察对象:** 观察对象为患者,需注明病例和对照者来源、选择标准、一般情况、观察指标和疗效判断标准等。研究对象为实验动物,需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。
 - 2.2 **研究方法:** 详述新创的方法及改良方法的改进之处,以备他人重复。采用他人方法,应以引用文献的方式给出方法的出处,无须详细描述。
 - 2.3 **药品与试剂:** 药品及化学试剂使用通用名称,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位、生产时间及给药途径。
 - 2.4 **仪器、设备:** 应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围。无须描述工作原理。
 - 2.5 **统计学处理:** 描述统计学方法及其选择依据,并说明所使用的统计学软件。
- 3 **结果** “结果”是指实验所得数据、观察记录,经过综合分析和统计学处理的结果,而不是原始数据,更不是原始记录。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述所获得的结果。结果的叙述应实事求是,简洁明了,数据准确,层次清楚,逻辑严谨,不应与讨论内容相混淆。应着重总结重要的研究成果。以数据反映结果时,应注意不能只描述导数(如百分数),还应同时给出据以计算导数的绝对数。一般应对所得数据进行统计学处理,并给出具体的统计值,例如: $t = 2.85$, $P < 0.01$ 。
- 4 **讨论** “讨论”是对研究结果的科学解释与评价,是研究所形成的科学理论。着重讨论研究结果的创新之处及从中得出的结论,包括理论意义、实际应用价值、局限性,及其对进一步研究的启示。如果不能导出结论,也可通过讨论,提出建议、设想、改进意见或待解决的问题等。应将本研究结果与其他有关的研究相比较,并将本研究结论与目的联系起来讨论,并列相关参考文献。不必重述已在前言和结果部分详述过的数据或资料。不应列入图或表。

PCOS 患者孕期血清 PTX-3、Adropin 水平变化及其与临床特点和左心功能的相关性

刘萍,温洁,赵楠楠,何艳芳,袁金灵

基金项目: 河北省科技厅重点研发项目(18277770D)

作者单位: 063000 河北省唐山市,华北理工大学附属医院妇产科

通信作者: 温洁, E-mail: liuping111@126.com

【摘要】目的 分析多囊卵巢综合征(PCOS)患者孕期血清 PTX-3、Adropin 水平变化及其与临床特点和左心功能的相关性。**方法** 2014 年 7 月—2018 年 9 月华北理工大学附属医院妇产科诊治 PCOS 孕妇 120 例为研究对象(病例组),选取同期正常孕妇 123 例为对照组。比较 2 组 PTX-3、Adropin、HDL-C、LDL-C、SCr、TC、TG、FIB、UA、hs-CRP 水平,左心功能(LVEF、LVED、LAD、LVEDD 水平);分析 PTX-3、Adropin 水平与各指标的相关性。**结果** 与对照组比较,病例组 PTX-3、TC、TG、LDL-C、FIB、SCr、UA、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 水平升高($t/P = 21.137/0.000, 10.709/0.000, 9.784/0.000, 10.948/0.000, 8.084/0.000, 16.868/0.000, 82.223/0.000, 14.742/0.000, 12.145/0.000, 8.862/0.000, 15.669/0.000$), Adropin、HDL-C、LVEF 水平降低($t/P = 12.214/0.000, 5.283/0.000, 17.782/0.000$)。PTX-3 与 SCr、UA、TC、TG、LDL-C、FIB、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈正相关($r/P = 0.465/0.000, 0.449/0.000, 0.669/0.000, 0.556/0.000, 0.453/0.000, 0.736/0.000, 0.586/0.000, 0.548/0.000, 0.686/0.000, 0.489/0.000$),与 HDL-C、LVEF 呈负相关($r/P = -0.449/0.000, -0.563/0.000$); Adropin 与 SCr、UA、TC、TG、LDL-C、FIB、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈负相关($r/P = -0.425/0.000, -0.595/0.000, -0.621/0.000, -0.598/0.000, -0.548/0.000, -0.523/0.000, -0.584/0.000, -0.645/0.000, -0.584/0.000, -0.469/0.000$),与 HDL-C、LVEF 呈正相关($r/P = 0.698/0.000, 0.593/0.000$)。高水平 PTX-3、低水平 Adropin 均为 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的危险因素($OR = 2.43, 8.36, P < 0.05$)。**结论** PCOS 患者孕期血清 PTX-3 水平升高、Adropin 水平降低,其与左心功能密切相关;高水平 PTX-3 及低水平 Adropin 均为 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的危险因素。

【关键词】 多囊卵巢综合征;正五聚蛋白 3;Adropin;左心功能;危险因素

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.012

Changes of serum PTX-3 and adropin levels in pregnant women with PCOS and their correlation with clinical characteristics and left ventricular function Liu Ping, Wen Jie, Zhao Nannan, He Yanfang, Yuan Jingling. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Hebei Province, Tangshan 063000, China
Corresponding author: Wen Jie, E-mail: liuping111@126.com

Fund program: Key R & D Projects of Science and Technology Department of Hebei Province (18277770D)

【Abstract】Objective To analyze the changes of serum PTX-3 and adropin levels in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) during pregnancy and their correlation with clinical characteristics and left heart function. **Methods** From July 2014 to September 2018, 120 cases of PCOS pregnant women diagnosed and treated in the Department of Gynecology and Obstetrics of the Affiliated Hospital of North China University of technology were selected as the study object (case group), and 123 cases of normal pregnant women in the same period were selected as the control group. PTX-3, adropin, HDL-C, LDL-C, SCr, TC, TG, FIB, UA, hs-CRP levels and left ventricular function (LVEF, LVED, LAD, LVEDD levels) were compared between the two groups. The correlation between PTX-3, adropin and each index was analyzed. **Results** Compared with the control group, the levels of PTX-3, TC, TG, LDL-C, FIB, SCr, UA, hs-CRP, LVEDD, LVESD, and LAD increased in the case group ($t/P = 21.137/0.000, t/P = 10.709/0.000, t/P = 9.784/0.000, t/P = 10.948/0.000, t/P = 8.084/0.000, t/P = 16.868/0.000, t/P = 82.223/0.000, t/P = 14.742/0.000, t/P = 12.145/0.000, t/P = 8.862/0.000, t/P = 15.669/0.000$), Adropin, HDL-C, and LVEF levels decreased ($t/P = 12.214/0.000, t/P = 5.283/0.000, t/P = 17.782/0.000$). PTX-3 is positively correlated with SCr, UA, TC, TG, LDL-C, FIB, hs-CRP, LVEDD, LVESD,

LAD ($r/P=0.465/0.000$, $r/P=0.449/0.000$, $r/P=0.669/0.000$, $r/P=0.556/0.000$, $r/P=0.453/0.000$, $r/P=0.736/0.000$, $r/P=0.586/0.000$, $r/P=0.548/0.000$, $r/P=0.686/0.000$, $r/P=0.489/0.000$), negatively correlated with HDL-C and LVEF ($r/P=-0.449/0.000$, $r/P=-0.563/0.000$); Adropin and SCr, UA, TC, TG, LDL-C, FIB, hs-CRP, LVEDD, LVESD, LAD are negatively correlated ($r/P=-0.425/0.000$, $r/P=-0.595/0.000$, $r/P=-0.621/0.000$, $r/P=-0.598/0.000$, $r/P=-0.548/0.000$, $r/P=-0.523/0.000$, $r/P=-0.584/0.000$, $r/P=-0.645/0.000$, $r/P=-0.584/0.000$, $r/P=-0.469/0.000$), which is positively correlated with HDL C and LVEF ($r/P=0.698/0.000$, $r/P=0.593/0.000$). High levels of PTX-3 and low levels of Adropin were risk factors for severe adverse cardiac events during pregnancy in PCOS patients ($OR=2.43$, $OR=8.36$, $P<0.05$). **Conclusion** The high level of PTX-3 and the low level of adropin are the risk factors of serious adverse cardiac events in PCOS patients.

【Key words】 Polycystic ovary syndrome; PTX-3; Adropin; Left ventricular function; Risk factors

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见疾病,影响了约 10% 的育龄妇女。它是一种复杂的疾病,包括激素、代谢和生殖异常。其主要特征是排卵功能障碍,生化(雄激素升高)和临床(多毛症和/或痤疮)高雄激素血症和/或多囊卵巢巢^[1-3]。尽管环境和遗传因素在发展中起着一定作用,但其病因仍然不明。PCOS 与低度慢性炎症反应、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、代谢综合征、高脂血症、高血压、肥胖症及罹患 2 型糖尿病和心血管疾病的风险增加相关。PCOS 是心血管疾病(CVD)风险增加的危险因素。具有 PCOS 临床特征的女性比无 PCOS 临床特征的女性具有较短的 5 年无心血管事件生存期^[4]。Adropin 是一种相对较新的肽激素,其缺乏与葡萄糖稳态、胰岛素抵抗、血脂异常、脂肪量增加及肝脂肪变性有关,转基因过表达或外源性给药可改善葡萄糖稳态。研究发现糖尿病、妊娠糖尿病、代谢综合征、非酒精性脂肪肝、PCOS 和冠状动脉疾病患者中循环 Adropin 水平较低^[5]。正五聚蛋白 3 (pentraxin-3, PTX-3) 是一种急性期反应物,在结构和功能上均类似于 CRP,已发现其由多种细胞产生,如巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、脂肪细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞^[6-7]。最近发现其在血管炎、急性心肌梗死、全身性炎症反应、败血症、牛皮癣、不稳定型心绞痛和心力衰竭患者血浆中水平升高^[8]。现分析 PCOS 患者孕期血清 PTX-3、Adropin 水平变化及其与左心功能的相关性,为 PCOS 的治疗提供理论依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2014 年 7 月—2018 年 9 月华北理工大学附属医院妇产科诊治 PCOS 孕妇(孕前诊断,纠正各项内分泌异常因素后,通过克罗米芬促排卵助孕成功)120 例为研究对象(病例组),选取同期正常孕妇 123 例为对照组。对照组与病例组的年龄、BMI、心率和血压相匹配。该研究根据《赫尔辛基宣言》进行,

经医院伦理委员会批准,所有研究对象知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1)纳入标准:符合鹿特丹标准中 PCOS 诊断标准^[9]。(2)排除标准:心血管疾病、高血压、糖尿病、甲状腺和肾脏疾病、皮质醇过多,在过去 3 个月内使用口服避孕药或其他激素治疗者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血液相关指标测定:病例组患者入院后 6 h、对照组清晨空腹抽取肘静脉血 10 ml,分离血清,贝克曼 AU-480 全自动生化分析仪(美国库尔特公司产品)测定相关指标。(1)血脂指标,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C);(2)凝血指标,纤维蛋白原(FIB);(3)肾功能指标,血肌酐(SCr)、血尿酸(UA);(4)激素指标,MK3-3 酶标仪(美国热电产品)测定 PTX-3、Adropin;(5)炎症指标,高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)。

1.3.2 心功能测定:采用德国西门子 Acuson Sequoia C512 型彩色多普勒超声诊断仪(探头频率 2.5~4.0 MHz,测定位置左右第 1 前肋间,二维法测定)检测受试者左心室射血分数(LVEF)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心房内径(LAD)、左心室舒张末期内径(LVEDD)。

1.3.3 记录不良反应:随访至 2019 年 7 月,记录 PCOS 患者孕期严重不良心脏事件。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性采用 Pearson 分析,采用多因素 Logistic 逐步回归模型分析 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件危险因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较 与对照组比较,病例组在年

龄、血压、BMI、基础病等方面比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组受试者基础资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组 ($n = 123$)	病例组 ($n = 120$)	χ^2/t 值	P 值
年龄(岁)	27.47 $\pm$ 5.27	26.37 $\pm$ 5.35	1.161	0.106
病程(年)	—	3.21 $\pm$ 1.24	—	—
收缩压(mmHg)	123.96 $\pm$ 22.94	122.47 $\pm$ 19.83	0.541	0.587
舒张压(mmHg)	66.56 $\pm$ 12.12	69.74 $\pm$ 14.65	1.841	0.065
BMI(kg/m ²)	26.54 $\pm$ 2.24	26.73 $\pm$ 2.51	0.622	0.533
基础病[例(%)]	10(8.1)	9(7.5)	0.033	0.855
合并症[例(%)]	6(4.9)	7(5.8)	0.109	0.741
既往治疗史[例(%)]	15(12.2)	13(10.8)	0.110	0.740
家族遗传史[例(%)]	12(9.8)	11(9.2)	0.025	0.875

2.2 2 组血液及心功能指标比较 与对照组比较, 病例组 PTX-3、TC、TG、LDL-C、FIB、SCr、UA、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 水平升高 ($P < 0.01$), Adropin、HDL-C、LVEF 水平降低 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 2 组受试者激素、血生化及心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	对照组 ($n = 123$)	病例组 ($n = 120$)	t 值	P 值
激素				
PTX-3(mmol/L)	43.63 $\pm$ 24.81	126.69 $\pm$ 35.39	21.137	0.000
Adropin(μ g/L)	28.56 $\pm$ 6.89	16.47 $\pm$ 8.41	12.214	0.000
血生化				
TC(mmol/L)	4.96 $\pm$ 0.29	5.93 $\pm$ 0.95	10.709	0.000
TG(mmol/L)	1.52 $\pm$ 0.48	2.29 $\pm$ 0.72	9.784	0.000
HDL-C(mmol/L)	1.74 $\pm$ 0.39	1.29 $\pm$ 0.85	5.283	0.000
LDL-C(mmol/L)	2.16 $\pm$ 0.59	3.24 $\pm$ 0.91	10.948	0.000
FIB(g/L)	2.92 $\pm$ 2.74	7.49 $\pm$ 5.57	8.084	0.000
SCr(μ mol/L)	65.96 $\pm$ 10.59	123.32 $\pm$ 35.75	16.868	0.000
UA(μ mol/L)	184.41 $\pm$ 13.18	457.26 $\pm$ 33.94	82.223	0.000
hs-CRP(μ mol/L)	328.53 $\pm$ 10.98	367.29 $\pm$ 26.68	14.742	0.000
心功能				
LVEF(%)	65.26 $\pm$ 0.15	56.23 $\pm$ 5.63	17.782	0.000
LVEDD(mm)	41.49 $\pm$ 3.96	47.20 $\pm$ 3.35	12.145	0.000
LVESD(mm)	29.69 $\pm$ 3.48	33.59 $\pm$ 3.38	8.862	0.000
LAD(mm)	16.63 $\pm$ 3.69	24.10 $\pm$ 3.74	15.669	0.000

2.3 PTX-3、Adropin 与各指标的相关性分析 PTX-3 与 SCr、UA、TC、TG、LDL-C、FIB、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈正相关 ($P < 0.01$), 与 HDL-C、LVEF 呈负相关 ($P < 0.01$); Adropin 与 SCr、UA、TC、TG、LDL-C、FIB、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈负相关 ($P < 0.01$), 与 HDL-C、LVEF 呈正相关 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.4 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的多元

表 3 PTX-3、Adropin 与各指标的相关性分析

变量	PTX-3		Adropin	
	r 值	P 值	r 值	P 值
SCr	0.465	0.000	-0.425	0.000
UA	0.449	0.000	-0.595	0.000
TC	0.669	0.000	-0.621	0.000
TG	0.556	0.000	-0.598	0.000
HDL-C	-0.449	0.000	0.698	0.000
LDL-C	0.453	0.000	-0.548	0.000
FIB	0.736	0.000	-0.523	0.000
hs-CRP	0.586	0.000	-0.584	0.000
LVEF	-0.563	0.000	0.593	0.000
LVEDD	0.548	0.000	-0.645	0.000
LVESD	0.686	0.000	-0.584	0.000
LAD	0.489	0.000	-0.469	0.000

Logistic 回归分析 以 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件为因变量(是 = 1, 否 = 0), 血清学指标及心功能指标等为自变量进行多因素 Logistic 逐步回归分析, 结果发现高水平 PTX-3、低水平 Adropin 均为 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的危险因素 ($P < 0.01$), 见表 4。

2.5 PCOS 患者不良心脏事件 PCOS 患者发生严重不良心脏事件 11 例, 其中严重心力衰竭 2 例, 恶性心律失常 3 例, 再发心肌梗死 2 例, 心源性死亡 1 例, 靶病变血管重建 3 例。

3 讨 论

以慢性无排卵和雄激素过多为特征的 PCOS 是人类最常见的内分泌疾病之一。PCOS 被越来越多地认为与心血管危险因素的聚集有关。研究发现高脂血症、肥胖症、胰岛素抵抗是 PCOS 并发心血管疾病的危险因素。

本研究发现, 病例组 Adropin 水平降低, 且 Adropin 与 SCr、UA、TC、TG、LDL-C、FIB、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈负相关, 与 HDL-C、LVEF 呈正相关。这说明 PCOS 患者孕期血清 Adropin 水平降低, 炎症标志物、血脂水平升高, 与左心功能密切相关, Adropin 可能是 PCOS 的保护因子, 同时提示在具有炎症反应基础的 PCOS 中 Adropin 水平降低。Adropin 是调节代谢的重要细胞因子。研究表明, 饮食或遗传性肥胖引起小鼠肝脏中 Adropin 的表达下降。此外全身给药或肽激素的转基因过表达改善胰岛素抵抗和肝脂肪变性。Adropin 可改善饮食性肥胖小鼠的葡萄糖稳态, 而与肥胖或食物摄入无关。Adropin 基因敲除小鼠(AdrKO)的脂肪增加, 体质量增加, 胰岛素抵抗增强。此外, 还证明了 Adropin 在葡萄糖(通过丙酮酸脱氢酶的激活)

表 4 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的多元 Logistic 回归分析

变量	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值(95% CI)
PTX-3	0.885	0.352	18.654	0.000	2.43(1.22~4.83)
Adropin	2.124	0.462	15.087	0.000	8.36(3.38~20.67)
SCr	0.621	0.455	1.324	0.541	1.86(0.76~4.53)
TC	1.012	0.778	0.596	0.854	2.75(0.59~12.64)
TG	0.836	0.545	1.369	0.516	2.31(0.79~6.71)
HDL-C	1.221	0.842	0.857	0.696	3.39(0.65~17.76)
LDL-C	0.954	0.745	0.969	0.614	2.59(0.60~11.18)
FIB	1.126	0.856	1.329	0.587	3.08(0.57~16.51)
UA	1.325	0.758	0.874	0.636	3.76(0.84~13.66)
hs-CRP	1.254	0.965	0.840	0.631	3.50(0.53~23.22)
LVEF	1.326	0.923	1.365	0.514	3.77(0.62~22.99)
LVEDD	0.854	0.632	0.487	0.901	2.35(0.68~8.10)
LVESD	1.214	0.896	1.587	0.569	3.37(0.58~19.49)
LAD	0.968	0.741	1.547	0.571	2.63(0.61~11.24)

和脂质(通过肉碱棕榈酰转移酶的抑制)的氧化中起作用。流行病学发现,与健康体质量的受试者相比,超重和肥胖受试者的 Adropin 水平降低^[10]。在 19 例肥胖女性中进行 Roux-en-Y 胃旁路手术后,Adropin 水平升高,在 3 个月达到峰值;Adropin 与 BMI 之间呈负相关。多项研究报道,患有妊娠糖尿病、2 型糖尿病、代谢综合征、冠状动脉疾病、非酒精性脂肪肝和 PCOS 的受试者循环 Adropin 水平较低^[11-13]。但 Adropin 在这些疾病中的作用仍不清楚。PTX-3 是一种多功能促炎性细胞因子,主要由脂肪组织巨噬细胞分泌,在葡萄糖和脂质代谢及动脉粥样硬化和炎症反应过程中发挥关键作用^[14-15]。此外,其被证明可以调节各种与能量代谢有关的肽,如脂联素、瘦素和抵抗素^[16-17]。大多数研究报道,PCOS 患者的 PTX-3 水平升高,而 Adropin 可减弱 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的凋亡^[18-20]。本次研究结果显示,PCOS 患者孕期血清 PTX-3 升高,PTX-3 与 SCr、TC、TG、LDL-C、FIB、UA、hs-CRP、LVEDD、LVESD、LAD 呈正相关,与 HDL-C、LVEF 呈负相关,与前述讨论一致。

PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的多元 Logistic 回归分析显示,高水平的 PTX-3 及低水平的 Adropin 均为 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的危险因素。这也论证了 PTX-3、Adropin 与 PCOS 患者左心功能密切相关。

综上所述,PCOS 患者孕期血清 PTX-3 水平升高、Adropin 水平降低,其与左心功能密切相关;高水平的 PTX-3 及低水平的 Adropin 均为 PCOS 患者孕期发生严重不良心脏事件的危险因素。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘萍:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写及修改;温洁、赵楠楠:提出研究思路,分析试验数据,进行统计学分析,论文审核;何艳舫、袁金灵:资料搜集整理,参与辅助研究工作

参考文献

- [1] Utiger RD. Insulin and the polycystic ovary syndrome[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 130:163-170. DOI:10.1016/j.diabres.2017.06.011.
- [2] Wu XK, Stener Victorin E, Kuang HY, et al. Effect of acupuncture and clomiphene in Chinese women with polycystic ovary syndrome: A randomized clinical trial[J]. Jama, 2017, 317(24):2502-2514. DOI:10.1001/jama.2017.7217.
- [3] Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(1):1-8. DOI:10.1007/s40618-016-0523-8.
- [4] Panico A, Messina G, Lupoli GA, et al. Quality of life in overweight (obese) and normal-weight women with polycystic ovary syndrome[J]. Patient Prefer Adherence, 2017, 11: 423-429. DOI:10.2147/ppa.s119180.
- [5] Aydin S, Eren MN, Yilmaz M, et al. Adropin as a potential marker of enzyme-positive acute coronary syndrome[J]. Cardiovascular J Afr, 2017, 28(1):40-47. DOI:10.5830/CVJA-2016-055.
- [6] Lussana F, Carobbio A, Salmoiraghi S, et al. Driver mutations (JAK2V617F, MPLW515L/K or CALR), pentraxin-3 and C-reactive protein in essential thrombocythemia and polycythemia vera[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1):54. DOI:10.1186/s13045-017-0425-z.
- [7] 董莹,王增武,王馨.中国中年人群超敏 C 反应蛋白与心血管事件、总死亡事件的关联研究[J].中华流行病学杂志,2018,39(4):428-432. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.04.008.
- [8] Lee YT, Gong M, Chau A, et al. Pentraxin-3 as a marker of sepsis severity and predictor of mortality outcomes: A systematic review and meta-analysis[J]. J Infect, 2018, 76(1):1-10. DOI:10.1016/j.jinf.2017.10.016.

血清 miR-124、miR-143 水平与高血压性视网膜病变关系的研究

韩月圣, 焦瑞雪, 张爱雪, 崔迎欣, 张乘瑞

基金项目: 北京市科学技术委员会科研计划项目 (D171100003226014)

作者单位: 102413 中国核工业北京四〇一医院眼科

通信作者: 韩月圣, E-mail: hanyuesheng952@163.com

【摘要】目的 观察血清微小 RNA-124 (miR-124)、微小 RNA-143 (miR-143) 在高血压性视网膜病变 (HRP) 患者中的变化及其临床意义。**方法** 选取 2017 年 3 月—2019 年 6 月中国核工业北京四〇一医院眼科诊治 HRP 患者 113 例为研究对象 (HRP 组), 并选择同期于医院健康体检者 115 例作为对照 (健康对照组)。检测 2 组血压、血糖、血脂等相关指标, 以及血清 miR-124、miR-143 及血管内皮生长因子 (VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 水平; Pearson 法分析 HRP 患者血清 miR-124、miR-143 与 VEGF、TNF- α 、IL-6 水平的关系, Logistic 回归分析 HRP 的危险因素; ROC 曲线评价血清 miR-124、miR-143 表达水平对 HRP 的预测诊断价值。**结果** HRP 组患者 SBP、DBP、血清 miR-143、VEGF、TNF- α 、IL-6 水平均明显高于健康对照组 ($t = 17.842, 23.082, 13.812, 23.099, 6.808, 13.508, P$ 均 < 0.01), miR-124 表达水平明显低于健康对照组 ($t = 9.116, P < 0.01$)。血清 miR-124 表达水平与 VEGF 水平呈负相关 ($r = -0.404, P < 0.01$), 血清 miR-143 表达水平与 VEGF 水平呈正相关 ($r = 0.525, P < 0.01$)。SBP、DBP、VEGF、miR-143 为 HRP 的危险因素 [$OR(95\% CI) = 1.425(1.136 \sim 1.788), 1.645(1.098 \sim 2.464), 1.501(1.043 \sim 2.159), 1.780(1.149 \sim 2.756), P$ 均 < 0.001], miR-124 是 HRP 的保护因素 [$OR(95\% CI) = 0.646(0.457 \sim 0.913), P < 0.01$]。血清中 miR-124、miR-143 对 HRP 预测诊断的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.838、0.870, 截断值分别为 0.91、1.28, 敏感度分别为 84.1%、84.2%, 特异度分别为 71.3%、78.3%; 两者联合诊断 HRP 的 AUC 为 0.947, 其敏感度、特异度分别为 94.7%、82.7%。**结论** HRP 患者血清中 miR-124 呈低表达, miR-143 呈高表达, 两者可能共同参与 HRP 的发生与发展, 均为 HRP 发病的影响因素, 两者联合可有效提高 HRP 的诊断价值。

【关键词】 微小 RNA-124; 微小 RNA-143; 高血压性视网膜病变; 诊断价值

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.013

Relationships between levels of microRNA 124 and microRNA 143 in peripheral blood and hypertensive retinopathy

Han Yuesheng, Jiao Ruixue, Zhang Aixue, Cui Yingxin, Zhang Chengrui. Department of Ophthalmology, Beijing 401 Hospital of China Nuclear Industry, Beijing 102413, China

Fund program: Beijing Municipal Commission of Science and Technology Scientific Research Plan Project (D171100003226014)

【Abstract】Objective To observe the levels of microRNA 124 (miR-124) and microRNA143 (miR-143) in peripheral blood serum of patients with hypertensive retinopathy (HRP) and their clinical significances. **Methods** One hundred and thirteen patients with HRP who were admitted to our hospital from March 2017 to June 2019 were selected as the study subjects (HRP group), and 115 healthy persons who were examined in our hospital during the same period were selected for the control study (health group). The blood pressure, glycolipid and other related indicators were measured in the two groups, real-time fluorescence quantitative assay (qRT-PCR) was used to detect the levels of miR-124 and miR-143 in serum of the two groups, the levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the relationships between levels of serum miR-124 and miR-143 and levels of VEGF, TNF- α and IL-6 in patients with HRP were analyzed, the influencing factors of HRP were analyzed, and the predictive diagnostic values of levels of serum miR-124 and miR-143 for HRP were evaluated. **Results** The systolic blood pressure, diastolic blood pressure, levels of serum miR-143, VEGF, TNF- α and IL-6 in HRP group were significantly higher than those in healthy group ($t = 17.842, t = 23.082, t = 13.812, t = 23.099, t = 6.808, t = 13.508, P < 0.001$). The expression level of serum miR-124 in the HRP group was significantly lower than that in healthy group ($t =$

9.116, $P < 0.001$). There was a negative correlation between the level of serum miR-124 and the level of VEGF in patients with HRP ($r = 0.404, P < 0.001$). There was a positive correlation between the level of serum miR-143 and the level of VEGF ($r = 0.525, P < 0.001$). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, VEGF and miR-143 were risk factors for HRP [$OR(95\% CI) = 1.425(1.136 \sim 1.788), 1.645(1.098 \sim 2.464), 1.501(1.043 \sim 2.159), 1.780(1.149 \sim 2.756), P < 0.001$], and miR-124 was a protective factor for HRP [$OR(95\% CI) = 0.646(0.457 \sim 0.913), P < 0.001$]. The areas under the curve (AUC) of serum miR-124 and miR-143 for predicting the diagnostic value of HRP were 0.838 and 0.870, and the corresponding truncation values were 0.91 and 1.28, respectively. The corresponding sensitivities were 84.1% and 84.2% respectively, the specificities were 71.3% and 78.3% respectively. The AUC of the combined diagnosis of HRP was 0.947, and the sensitivity and specificity were 94.7% and 82.7% respectively. **Conclusion** The level of serum miR-124 is low and miR-143 is high in HRP patients. Both may be involved in the occurrence and development of HRP. Both are the influencing factors of the pathogenesis of HRP. The combination of them can effectively improve the diagnostic value of HRP.

[Key words] MicroRNA 124; MicroRNA 143; Hypertensive retinopathy; Diagnostic value

高血压性视网膜病变(hypertensive retinopathy, HRP)是由动脉血压升高,引发全身小动脉硬化,进而造成视盘水肿、视网膜水肿、渗出等各种临床症状,且具有较高病变率特点的眼科疾病,对患者日常生活及工作造成不良影响^[1]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类在外周血中广泛存在的高度保守的小分子RNA,其在多种疾病发生发展过程中表达异常,可作为疾病诊断的潜在临床指标^[2]。患者发生高血压后,外周血 miRNA 水平会发生改变,患者长期处于高血压状态,可引起视网膜病变^[3]。Matsuoka 等^[4]研究显示,微小RNA-124(microRNA-124, miR-124)在脑卒中倾向的自发性高血压中呈低表达,可通过影响紧密连接蛋白 CLDN1 水平,进而参与疾病的发生与发展。微小RNA-143(microRNA-143, miR-143)在原发性高血压患者外周血白细胞中表达上调,较高的 miR-143 水平为原发性高血压的危险因素,其可能与原发性高血压的发病进程有关^[5]。但 miR-124、miR-143 在 HRP 患者血清中的表达情况及与 HRP 的关系尚未见相关研究报道。基于此,现观察 miR-124、miR-143 在 HRP 患者血清中的相对表达水平,以期为 HRP 早期诊疗提供可靠临床依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2017年3月—2019年6月中国核工业北京四〇一医院眼科诊治 HRP 患者 113 例为研究对象(HRP 组),男 57 例,女 56 例,年龄 50 ~ 63 (56.47 ± 5.79) 岁;体质量指数 $19.55 \sim 26.78$ (22.92 ± 3.69) kg/m^2 ;病程 3 ~ 15 (8.23 ± 4.12) 年。并以同期医院健康体检者 115 例为健康对照组,男 59 例,女 56 例,年龄 51 ~ 64 (57.06 ± 5.93) 岁;体质量指数 $19.04 \sim 26.90$ (23.06 ± 3.74) kg/m^2 。2 组性别、年龄、体质量指数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审核批准,受

试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1)诊断标准:依据“中国高血压防治指南 2010”^[6]修订的高血压视网膜病变的判定标准。(2)纳入标准:①所有患者均经眼底病专业医生进行眼底检查,均符合 HRP 诊断标准;②生理病理检查资料完整者。(3)排除标准:①合并糖尿病、脂肪代谢异常、肥胖者;②合并严重肝肾功能不全、重度慢性肺阻塞者;③合并心肌梗死、心功能不全、不稳定性心绞痛者;④合并酗酒、吸烟者;⑤合并青光眼、视神经损伤等其他眼科疾病者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 临床资料搜集:收集、统计一般资料;检测所有研究对象收缩压、舒张压;采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖,胰岛素释放试验测定空腹胰岛素,生化仪器自动检测总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇。

1.3.2 血清 miR-124、miR-143 表达检测:2 组受试者清晨空腹抽取肘静脉血 5 ~ 6 ml,室温下静置约 40 min,离心收集上层血清,于 -80°C 保存待测。采用实时荧光定量法(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 2 组血清 miR-124、miR-143 表达水平。取出冻存血清,冰上解冻,加适量 TRIzol(美国 Qiagen 公司),参照其试剂说明书操作流程提取血清总 RNA,检测总 RNA 的完整性、纯度、浓度。依据 qRT-PCR 反转录试剂盒 miScript II RT kit(德国 QIAGEN 公司)操作流程、注意事项配制逆转录反应体系 20 μl ,将血清总 RNA 转录成 cDNA。反应程序 37.2°C 60 min,活化反应体系中的逆转录酶;逆转录 94.8°C 6 min,抑制逆转录酶作用,终止逆转录反应。将反应体系置于冰上 8 min,加无酶水,混匀,于 -20°C 保存备用。qRT-PCR 扩增检测采用 miScript SYBR Green PCR Kit(德国 QIAGEN 公司),反应体系配制依照其说明书进行,扩

表 1 miR-124、miR-143 及内参 U6 的引物序列

指标	正向引物	反向引物
miR-124	5'-TAAGGCACGCTGAATGCCGG-3'	5'-GCTAAAGTGCTTATAGTGCAGGT-3'
miR-143	5'-TAGCAGCACATAATGTTTGTG-3'	5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'
U6	5'-GAGTACATCTTCAAGCCATCCTG-3'	5'-TGCTCTATCTTCTTTGGTCTGC-3'

增程序为:94.8℃ 12 min;94℃ 20 s,62℃ 40 s,40 个循环。待测 miRNA、内参分别设置 3 个复孔进行定量检测。miR-124、miR-143 均以 U6 为内参,对应引物序列见表 1,两者相对表达量均采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算^[7]。

1.3.3 VEGF、TNF-α、IL-6 水平检测:上述血清采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 VEGF、TNF-α、IL-6 水平,具体操作参照相应试剂盒说明书(试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验;Pearson 法分析 HRP 患者血清 miR-124、miR-143 水平与 VEGF、TNF-α、IL-6 水平的相关性;采用 Logistic 回归分析 HRP 发生的危险因素;采用 ROC 法评价血清 miR-124、miR-143 表达水平对 HRP 的诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床资料比较 与健康对照组比较,HRP 组患者收缩压、舒张压明显升高($P < 0.05$),空腹血糖、空腹胰岛素、总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 2 组受试者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)				
临床指标	健康对照组 ($n = 115$)	HRP 组 ($n = 113$)	t 值	P 值
SBP (mmHg)	118.87 ± 10.94	146.02 ± 12.05	17.842	0.000
DBP (mmHg)	78.94 ± 5.66	96.83 ± 6.04	23.082	0.000
FPG (mmol/L)	5.63 ± 1.33	5.80 ± 1.41	0.937	0.350
FINS (mIU/L)	7.24 ± 2.09	7.66 ± 2.15	1.496	0.136
TC (mmol/L)	3.81 ± 1.05	3.96 ± 1.12	1.739	0.083
TG (mmol/L)	0.87 ± 0.26	0.93 ± 0.29	1.646	0.101
LDL-C (mmol/L)	2.31 ± 0.72	2.38 ± 0.74	0.724	0.470
HDL-C (mmol/L)	1.22 ± 0.37	1.30 ± 0.40	1.606	0.110

2.2 2 组血清 miR-124、miR-143 水平比较 与健康对照组比较,HRP 组患者血清 miR-124 表达水平显著降低,miR-143 表达水平显著升高(P 均 < 0.01),见表 3。

2.3 2 组血清 VEGF、TNF-α、IL-6 水平比较 与健康

对照组比较,HRP 组患者血清 VEGF、TNF-α、IL-6 水平显著升高($P < 0.01$),见表 4。

表 3 2 组受试者血清 miR-124、miR-143 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组 别	例数	miR-124	miR-143
健康对照组	115	1.04 ± 0.31	1.02 ± 0.30
HRP 组	113	0.71 ± 0.23	1.74 ± 0.47
t 值		9.116	13.812
P 值		0.000	0.000

表 4 2 组受试者血清 VEGF、TNF-α、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组 别	例数	VEGF (μg/L)	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
健康对照组	115	51.98 ± 10.26	20.72 ± 6.30	6.02 ± 1.95
HRP 组	113	96.22 ± 17.74	26.85 ± 7.27	10.56 ± 3.02
t 值		23.099	6.808	13.508
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4 血清 miR-124、miR-143 水平与 SBP、DBP、VEGF、TNF-α、IL-6 水平关系 Pearson 相关性分析结果显示,HRP 患者血清 miR-124 与 VEGF 水平呈负相关($P < 0.01$),miR-143 与 VEGF 水平呈正相关($P < 0.01$);血清 miR-124、miR-143 表达水平与 SBP、DBP、TNF-α、IL-6 水平均无明显相关性($P > 0.05$),见表 5。

表 5 血清 miR-124、miR-143 水平与 SBP、DBP、VEGF、TNF-α、IL-6 水平的关系				
指标	miR-124		miR-143	
	r 值	P 值	r 值	P 值
SBP	-0.125	0.678	0.192	0.387
DBP	-0.154	0.516	0.183	0.412
VEGF	-0.404	0.000	0.525	0.000
TNF-α	-0.168	0.509	0.106	0.736
IL-6	-0.101	0.759	0.178	0.462

2.5 HRP 危险因素的 Logistic 回归分析 以是否发生 HRP 为因变量,以 SBP、DBP、VEGF、TNF-α、IL-6 及血清 miR-124、miR-143 水平为自变量,行 Logistic 回归分析,结果显示 SBP、DBP、VEGF、miR-143 是 HRP 的危险因素($P < 0.01$),miR-124 是 HRP 的保护因素($P < 0.01$),见表 6。

2.6 血清 miR-124、miR-143 对 HRP 的诊断价值 ROC 曲线显示,血清 miR-124 对 HRP 预测诊断的曲线

下面积(AUC)为 0.838(95% CI 0.787 ~ 0.889),截断值为 0.91,其敏感度、特异度分别为 84.1%、71.3%,约登指数为 0.554;血清 miR-143 对 HRP 预测诊断 AUC 为 0.870(95% CI 0.823 ~ 0.918),截断值为 1.28,其敏感度、特异度分别为 84.2%、78.3%,约登指数为 0.625;两者联合对 HRP 诊断的 AUC 为 0.947(95% CI 0.920 ~ 0.975),其敏感度、特异度分别为 94.7%、82.7%,约登指数为 0.774,见图 1。

表 6 Logistic 回归分析 HRP 的影响因素

指标	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
SBP	0.354	0.168	4.440	0.000	1.425	1.136 ~ 1.788
DBP	0.498	0.155	10.323	0.000	1.645	1.098 ~ 2.464
VEGF	0.405	0.152	7.099	0.000	1.501	1.043 ~ 2.159
TNF- α	0.115	0.113	1.036	0.078	1.121	0.746 ~ 1.645
IL-6	-0.039	0.104	0.141	0.659	0.962	0.528 ~ 1.752
miR-124	-0.437	0.101	18.721	0.000	0.646	0.457 ~ 0.913
miR-143	0.576	0.182	10.016	0.000	1.780	1.149 ~ 2.756

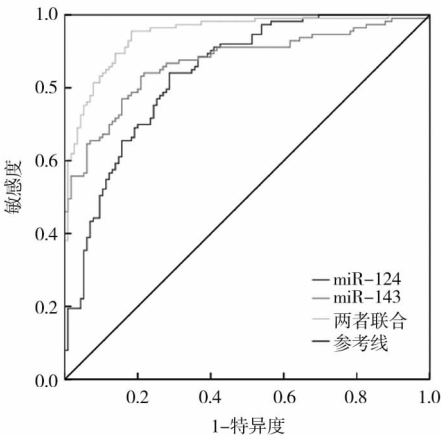


图 1 血清 miR-124、miR-143 对 HRP 预测诊断的 ROC 曲线分析

3 讨论

HRP 是高血压持续一段时间后引起眼底血管及相关部位发生可视变化的心血管疾病,其在高血压患者群体中发病率较高,可对患者视觉造成不可逆的损害^[7]。因此,寻找可靠且高效的诊断指标及影响因素,对提高患者生活质量具有重要意义。

miRNA 是广泛存在于人体内各器官、组织及血液中的单链核苷酸 RNA 分子,在细胞增殖、炎症反应、信号转导、组织分化等生物学过程中起一定调控作用^[8]。miRNA 参与高血压性心力衰竭、肾衰竭、肾纤维化、心脏肥大、出血性脑卒中及眼病等高血压相关的病理过程^[9]。miR-192-5p 主要分布于肾脏中,其在高

血压患者中低表达,可预防高血压的发展^[10]。miR-7-5p 在伴左心室肥大的高血压患者血清中表达上调,其可能在高血压性左心室肥大的发病进展中发挥重要作用^[11]。miR-21 在高血压肾损伤患者尿液中表达异常,与肾损伤的功能标志物相关,可作为高血压肾损伤和纤维化的潜在生物标志物^[12]。以上研究证明,miRNA 表达异常与高血压及高血压相关性疾病的发病进程密切相关,miR-124 在青光眼中发挥调节作用,可促进 Müller 细胞衍生的视网膜神经节细胞生长,具有治疗青光眼的潜力^[13]。Caruso 等^[14]研究发现,miR-124 在肺动脉高压患者肺血管、内皮细胞中呈低表达,其可作为治疗肺动脉高压的新型治疗靶标^[14]。以上研究表明,miR-124 在动脉血压升高的疾病中发挥重要作用。本研究中 HRP 组患者血清 miR-124 表达水平显著下调,与 miR-124 在脑卒中倾向的自发性高血压中趋势类似^[4],提示血清 miR-124 表达水平可能影响 HRP 的发生发展过程。推测 miR-124 可能是通过调节盐皮质激素受体基因 NR3C2 的表达,降低肾素-血管紧张素系统的传导信号,进而降低血压^[15],从而影响 HRP 的发生发展。miR-143-3p 是 miR-143 家族成员,其在妊娠期高血压中呈过表达,可用于筛选心血管疾病后期发展风险较高的患者^[16]。miR-143 在高血压发展过程中表达失调,其可能参与并影响高血压发生与发展^[17]。以上研究表明,miR-143 表达失调与高血压疾病有关。本研究中 HRP 组患者血清 miR-143 表达水平明显上调,提示 miR-143 可能在 HRP 发展进程中起到重要调节作用。miR-143 可维持血管收缩性,参与动脉血压的变化^[15],进而 HRP 发病进程。

微血管形成是视网膜发生病变的重要环节,VEGF 是血管形成不可或缺的相关因子,能够促进血管内皮细胞分裂,加速血管新生^[18]。HRP 是一种炎症性疾病,TNF- α 、IL-6 是重要的促进炎症的细胞因子,两者可反映炎症程度^[19]。Liu 等^[20]发现 VEGF、TNF- α 在重度子痫前期患者视网膜中表达水平上调,表明 VEGF、TNF- α 可能在重度子痫前期引起的视网膜病变中发挥作用。IL-6 在 HRP 患者血清中呈高水平表达,经非诺贝特治疗后,其水平降低,表明 IL-6 可能参与 HRP 的发生、发展^[19]。本研究中 HRP 组患者血清 VEGF、TNF- α 、IL-6 水平明显升高,提示 HRP 的发生与血管内皮调节、炎症因子的作用关系密切。推测 VEGF 过表达可促进血管内皮细胞增殖,其可能通过增加血管通透性,促进血管内皮细胞迁移及血管新生,进而参与 HRP 发生发展;TNF- α 可一定程度损害血-视网膜屏障,增强视网膜血管通透性,引起血管内皮细胞增殖及

血管外基质产生过量,进一步引发视网膜血管增殖,从而在视网膜病变中发挥促进作用;IL-6 可通过诱导 VEGF 增加血管通透性,且其可通过细胞肌丝重排增加血管内皮细胞通透性,从而促使视网膜病变加重。

本研究显示,HRP 患者血清 VEGF 水平与 miR-124 表达水平呈负相关,与 miR-143 表达水平呈正相关,提示 miR-124、miR-143 可能与 VEGF 相互作用,进而共同影响 HRP 的发病进展。分析原因,miR-124、miR-143 作为 miRNA 成员,可能通过影响 VEGF 表达,调节血管内皮细胞增殖、分化、迁移,进而影响血管新生,从而影响 HRP 发病进程。进一步研究发现,SBP、DBP、VEGF、miR-143 是 HRP 的危险因素,miR-124 是 HRP 的保护因素,提示 SBP、DBP、VEGF、miR-143 等水平过高,miR-124 表达水平过低,均可能增加 HRP 患病风险,及时动态监控血清中 miR-124、miR-143 水平,有助于早期判断并及早控制 HRP 的病情发展。血清中 miR-124、miR-143 水平对 HRP 的预测 AUC 分别为 0.838、0.870,当血清 miR-124 相对表达量低于 0.91 或血清 miR-143 相对表达量高于 1.28 时,HRP 患病几率较高,提示血清 miR-124、miR-143 对 HRP 有一定诊断价值,血清 miR-124、miR-143 联合诊断 HRP 的 AUC 为 0.947,其敏感度 94.7%,特异度为 82.7%,提示 miR-124、miR-143 联合诊断价值高于单独诊断,两者联合可增加对 HRP 诊断的效能。

综上所述,HRP 患者血清中 miR-124 表达下调,miR-143 表达上调,两者可能参与 HRP 的发病发展过程,两者联合可增加 HRP 诊断价值,具有临床参考价值。但该研究试验样本较少,结果可能存在一定偏差,且本研究检测指标血清 miR-124、miR-143 对 HRP 的诊断价值未与 SBP、DBP 及临床诊断指标做比较,后续研究将加大样本量进行较深入的研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

韩月圣:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;焦瑞雪:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;张爱雪:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;崔迎欣:进行统计学分析;张乘瑞:课题设计,论文撰写

参考文献

- [1] Chen X, Meng Y, Li J, et al. Serum uric acid concentration is associated with hypertensive retinopathy in hypertensive chinese adults [J]. BMC Ophthalmol, 2017, 17(1):83. DOI: 10.1186/s12886-017-0470-y.
- [2] Nemezc M, Alexandru N, Tanko G, et al. Role of microRNA in endothelial dysfunction and hypertension [J]. Curr Hypertens Rep, 2016, 18(12):87. DOI: 10.1007/s11906-016-0696-8.

- [3] Torres P, Yazmín E, Huesca G, et al. Increased expression of miR-33a in monocytes from Mexican hypertensive patients in elevated carotid intima-media thickness [J]. J Hum Hypertens, 2018, 32(10):681-690. DOI: 10.1038/s41371-018-0102-x.
- [4] Matsuoka H, Tamura A, Kinohara M, et al. Levels of tight junction protein CLDN1 are regulated by microRNA-124 in the cerebellum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(4):817-823. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.063.
- [5] Chen S, Chen R, Zhang T, et al. Relationship of cardiovascular disease risk factors and noncoding RNAs with hypertension: A case-control study [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1):58-65. DOI: 10.1186/s12872-018-0795-3.
- [6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010 [J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(7):579-616. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.
- [7] Harjasouliha A, Raiji V, Garcia G, et al. Review of hypertensive retinopathy [J]. Dis Mon, 2016, 63(3):63-69. DOI: 10.1016/j.disamonth.2016.10.002.
- [8] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5):1423-1432. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.01.029.
- [9] Zhang L, Liu J, Cheng P, et al. Correlation between miRNA target site polymorphisms in the 3'UTR of AVPR1A and the risk of hypertension in the Chinese Han population [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5):2232-2239. DOI: 10.1042/BSR20182232.
- [10] Baker MA, Wang F, Liu Y, et al. MiR-192-5p in the kidney protects against the development of hypertension [J]. Hypertension, 2019, 73(2):399-406. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11875.
- [11] Kaneto CM, Nascimento JS, Moreira MCR, et al. MicroRNA profiling identifies miR-7-5p and miR-26b-5p as differentially expressed in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy [J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(12):e6211. DOI: 10.1590/1414-431X20176211.
- [12] Chen C, Lu C, Qian Y, et al. Urinary miR-21 as a potential biomarker of hypertensive kidney injury and fibrosis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):17737. DOI: 10.1038/s41598-017-18175-3.
- [13] He Y, Li HB, Li X, et al. MiR-124 promotes the growth of retinal ganglion cells derived from müller cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3):973-983. DOI: 10.1159/000487292.
- [14] Caruso P, Dunmore BJ, Schlosser K, et al. Identification of miR-124 as a major regulator of enhanced endothelial cell glycolysis in pulmonary arterial hypertension via PTBP1 and PKM2 [J]. Circulation, 2017, 136(25):2451-2467. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028034.
- [15] 唐青, 邢晓为, 黄利华, 等. miRNA 在高血压疾病中的应用及调控机制 [J]. 中华高血压杂志, 2013, 21(2):30-35. DOI: CNKI: SUN:ZGGZ.0.2013-02-012.

(下转 297 页)

mRNAs 列线图模型对宫颈腺癌患者生存状况的预测价值

张钊红, 关德凤, 杨永秀

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助-重点研究基地建设项目(自然科学类)(561219009); 兰州大学第一临床医学院卓越计划项目(20190060150)

作者单位: 730000 兰州大学第一医院妇产科/甘肃省妇科肿瘤重点实验室

通信作者: 杨永秀, E-mail: yongxiuyang@163.com

【摘要】目的 通过分析宫颈腺癌(CAC)的 mRNAs 差异表达谱及模型 mRNAs 的基因集富集分析(GSEA), 寻找其稳定可靠的靶向治疗、预后评估的新型分子标志物。**方法** 2019 年 8—10 月在兰州大学第一医院实施研究。下载癌症基因组图谱数据库(TCGA)中 CAC 的 mRNAs 相关数据, 使用 R3.6.1 软件进行差异分析、mRNAs 筛选和预后模型构建。使用 GSEA 4.0.1 软件进行模型 mRNAs 的癌症和效应特征基因集富集分析。**结果** 经单因素 Cox 回归、Lasso 回归分析、多因素 Cox 逐步回归分析获得 CAC 患者预后评估的列线图模型。该模型 C-指数为 0.95, 3 年生存率的 AUC 为 0.950 1, 5 年生存率的 AUC 为 0.949 7, 风险评分为 $0.944\ 74 \times \text{CLIP} + 3.866\ 33 \times \text{MYH13} - 3.776\ 3 \times \text{ANKRD53} - 1.912\ 99 \times \text{GLIPR2} - 0.641\ 92 \times \text{CPQ}$, 生存分析提示低风险组患者生存预后显著优于高风险组($P < 0.05$)。经基因集富集分析显示, VEGF_A_UP、V1_UP、MYC TARGETS V1 和 MTORC1 SIGNALING 基因集分别与 4 个和 3 个模型 mRNAs 显著相关。**结论** 列线图模型可有效预测 CAC 患者生存状况, 模型 mRNAs 可能通过 VEGF_A_UP、V1_UP、MYC TARGETS V1 和 MTORC1 SIGNALING 等途径影响患者预后, 模型 mRNAs 及其核心基因集有望成为靶向治疗、预后评估的新靶标。

【关键词】 宫颈腺癌; 生存分析; mRNA; 基因组富集分析; 癌症基因组图谱数据库; 列线图模型

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.014

The predictive value of mRNAs nomogram model of cervical adenocarcinoma to the survival status of patients

Zhang Chaihong, Guan Defeng, Yang Yongxiu. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Hospital of Lanzhou University, Key Laboratory for Gynecologic Oncology Gansu Province, Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Yang Yongxiu, E-mail: yongxiuyang@163.com

Fund program: Special Findings for Basic Scientific Research Project of Central Universities(561219009); Lanzhou University First Clinical Medical College Excellent Project(20190060150)

【Abstract】Objective Through the analysis of mRNA differential expression profile of cervical adenocarcinoma (CAC) and gene set enrichment analysis (GSEA) of model mRNAs, to find a stable and reliable new molecular marker for targeted treatment and prognosis evaluation. **Methods** From August to October 2019, the research was carried out in the First Hospital of Lanzhou University. Download the mRNAs related data of CAC in TCGA, and use r3.6.1 software to carry out differential analysis, mRNAs screening and prognosis model construction. GSEA 4.0.1 software was used to analyze the cancer and effect characteristic gene set enrichment of model mRNAs. **Results** By single factor Cox regression, Lasso regression analysis and multi factor Cox stepwise regression analysis, the nomogram model for prognosis evaluation of CAC patients was obtained. The C index of the model is 0.95, AUC of 3-year survival rate is 0.950 1, AUC of 5-year survival rate is 0.949 7, risk score is $0.944\ 74 \times \text{CLIP} + 3.866\ 33 \times \text{MYH13} - 3.776\ 3 \times \text{ANKRD53} - 1.912\ 99 \times \text{GLIPR2} - 0.641\ 92 \times \text{CPQ}$, survival analysis indicates that survival prognosis of low-risk group is significantly better than that of high-risk group ($P < 0.05$). The analysis of gene set enrichment showed that VEGF_A_UP, V1_UP, MYC TARGETS V1 and MTORC1 signaling gene sets were significantly correlated with 4 and 3 model mRNAs respectively. **Conclusion** The model mRNAs may affect the prognosis of CAC patients through VEGF_A_UP, V1_UP, MYC TARGETS V1 and MTORC1 signaling. The model mRNAs and its core gene set are expected to be new targets for targeted therapy and prognosis evaluation.

[Key words] Cervical adenocarcinoma; Survival analysis; mRNA; Gene set enrichment analysis; Cancer genome atlas; Nomogram model

宫颈癌是女性最常见的癌症之一,发病率和病死率位居女性恶性肿瘤第 4 位^[1],仍是成年女性生命安全的重大威胁。近年来,随着宫颈癌规范化筛查的开展和疫苗的应用,宫颈鳞癌的发病率不断下降,但宫颈腺癌(cervical adenocarcinoma, CAC)发病率仍不断上升,占宫颈癌的 10%~20%^[2-3],并且其与人乳头瘤病毒的关系尚有争议^[4-5],发病人群呈年轻化趋势,早期筛查困难,具有较鳞癌更高的卵巢转移及远处转移率,宫颈腺癌组织学已成为宫颈癌预后不良的因素^[6-7],针对腺癌组织学特异性的基因靶向疗法是宫颈癌新的研究热点,也是改善患者生存期新的切入点。本研究构建列线图预后模型,使用 GSEA_4.0.1 软件进行模型 mRNAs 在 CAC 中的癌症和效应特征基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA),探索模型 mRNAs 在 CAC 中的作用机制及模型 mRNAs 之间相互关系,寻找稳定可靠的 CAC 靶向治疗和预后评估的关键因子,报道如下。

1 资料与方法

1.1 数据准备 本研究于 2019 年 8—10 月在兰州大学第一医院实施,使用 R3.6.1 软件分析癌症基因组图谱数据库(the cancer genome atlas, TCGA)中宫颈腺癌 mRNA 表达数据。在 TCGA 官网(<https://www.cancer.gov/tcga>)获取 CAC 的 mRNA 表达数据建立标准化表达矩阵并加载 R3.6.1 软件 edgeR 包,采用双侧 *t* 检验,筛选显著差异表达 mRNAs;获取 CAC 患者临床资料,合并 mRNAs 差异表达资料构建预后预测模型。

1.2 筛选预后相关 mRNAs 运行 R3.6.1 软件 survival 包、glmnet 包进行单因素 Cox 回归、Lasso 回归分析、多因素 Cox 逐步回归分析,进一步筛选预后相关 mRNAs,使用 survminer 包进行 Log-rank 检验筛选 CAC 患者独立的预后影响因子,计算 C-指数评价模型。

1.3 列线图模型构建及评价 在 R3.6.1 软件中加载 rms 包和 survival 包构建 CAC 患者 3 年和 5 年生存率的列线图预测模型。加载 timeROC 包和 survival 包依据 46 个 CAC 样本的风险评分,计算 3 年和 5 年生存率的 AUC 值。

1.4 模型 mRNAs 分析 在 R3.6.1 软件中加载 limma 包和 beeswarm 包采用 Wilcoxon 检验对模型 mRNAs 在正常组和肿瘤组中的标准化表达数据进行分析。加载 survminer 包和 survival 包,使用中位数法将 46 个

CAC 样本的风险评分分为高风险组和低风险组,进行高、低风险组生存分析。加载 survival 包,使用中位数法分别将 5 个 mRNAs 分为高、低表达组,进行 mRNAs 高、低表达组生存分析。构建模型 mRNAs 的 GSEA 输入文件:表型文件和表达谱文件,使用 GSEA_4.0.1 软件设置基因集数据为 c6.all.v7.0.symbols.gmt 和 h.all.v7.0.symbols.gmt 进行高、低表达组的癌症、效应、免疫特征基因集富集分析,使用 R3.6.1 软件 plyr、ggplot2 和 grid 包绘制多 GSEA 富集图。

2 结果

2.1 mRNAs 表达数据和临床资料 在 TCGA 数据库下载 CAC 的 mRNAs 表达谱资料,包含 3 个正常样本和 48 个 CAC 样本,加载 R3.6.1 软件进行差异表达分析得到 CAC 中 $|\log_{10}FC| > 2$ 且 $FDR < 0.01$ 的显著差异 mRNAs,即 649 个显著上调 mRNAs 和 1 207 个显著下调 mRNAs。下载 CAC 患者临床资料,剔除生存时间为 0 的 2 组样本,共入组 46 个 CAC 样本,用于模型构建。

2.2 筛选 CAC 预后相关 mRNAs 使用 R 软件对 CAC 的 mRNAs 表达与生存数据矩阵进行单因素 Cox 回归分析,筛选得到 $P < 0.01$ 的 22 个 CAC 预后相关 mRNAs,提取 22 个 mRNAs 的表达生存数据进行 Lasso 回归分析,得到最小 Lambda 为 0.110 273 7,包含 10 个 CAC 预后相关 mRNAs,分别是 ADAMTSL4、ANKRD53、CDC25A、CILP、CPQ、CTSF、DST、GLIPR2、MYH13、RNF150。提取这 10 个 mRNAs 的表达生存数据进行多因素 Cox 逐步回归分析,获得 5 个 CAC 预后相关 mRNAs 及其在 46 个 CAC 样本中的风险评分,该模型风险评分 = $0.944\ 74 \times CILP + 3.866\ 33 \times MYH13 - 3.776\ 3 \times ANKRD53 - 1.912\ 99 \times GLIPR2 - 0.641\ 92 \times CPQ$,经 Log-rank 检验 $P < 0.01$,其中 ANKRD53、CILP、GLIPR2、MYH13 可作为 CAC 患者预后评估的独立影响因素, P 值分别为 0.009、0.024、0.007 和 0.005,而 CPQ 的 P 值为 0.131,不能作为患者独立预后因子。

2.3 CAC 患者生存预测模型及其评价 使用 R 软件构建 CAC 患者 3 年生存率和 5 年生存率的列线图预测模型(图 1)。依据 46 个 CAC 样本的风险评分计算模型 C-指数为 0.95,3 年生存率的 AUC 为 0.950 1,5 年生存率的 AUC 为 0.949 7,该模型预测效果较好。

2.4 模型 mRNAs 分析

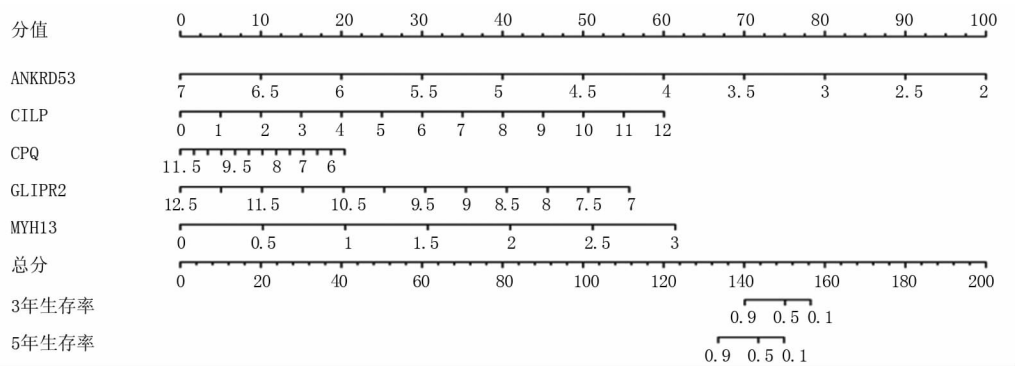


图 1 模型 mRNAs 的列线图预测模型

2.4.4.1 模型 mRNAs 的 TCGA 表达分析:从 CAC 的 mRNA 标准化表达数据矩阵中提取模型 mRNAs 的表达数据,使用 R3.6.1 软件进行正常组和肿瘤组的表达差异分析显示,2 组中 ANKRD53、CILP、GLIPR2、CPQ、MYH13 的表达差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。

2.4.4.2 风险评分与生存预后的关系:使用 R 软件进行高、低风险组生存分析显示,低风险组患者生存预后显著优于高风险组($P < 0.01$)。

2.4.4.3 模型 mRNAs 表达情况与患者预后的关系:使用 R 软件进行 mRNAs 高、低表达组生存分析显示,ANKRD53、CILP、GLIPR2、CPQ 高表达组和 MYH13 低表达组提示 CAC 患者预后良好,其中 ANKRD53、CILP、GLIPR2 高、低表达组差异有统计学意义($P = 0.023, 0.028, 0.030$)。

2.4.4.4 模型 mRNAs 的基因集富集分析

2.4.4.4.1 癌症特征基因集分析 (oncogenic signatures gene sets) 使用 GSEA_4.0.1 软件输入模型 mRNAs 的表型文件和表达谱进行癌症基因集分析显示,5 个模型 mRNAs 共存在 33 个共同显著相关($P < 0.05$)的癌症特征基因集,其中 VEGF_A_UP、V1_UP 基因集与 4 个模型 mRNAs 均显著相关(图 2),RB_P107_DN、V1_DN、JAK2_DN、V1_UP、CYCLIN_D1_KE、V1_DN、JNK_DN、V1_DN、P53_DN、V1_DN、BMI1_DN、MEL18_DN、V1_DN、KRAS、KIDNEY_UP、V1_UP、PTEN_DN、V1_UP 基因集分别与 3 个模型 mRNAs 显著相关,24 个基因集分别与 2 个模型 mRNAs 显著相关。

2.4.4.4.2 效应特征基因集分析 (hallmark gene sets) 使用 GSEA_4.0.1 软件对 5 个 mRNAs 的表型文件和表达谱进行效应特征基因集分析显示,5 个模型 mRNAs 共存在 9 个共同显著相关($P < 0.05$)的效应特征基因集,其中 MYC TARGETS V1 和 MTORC1 SIG-

NALING 分别与 3 个模型 mRNAs 显著相关,MYC TARGETS V2、ANGIOGENESIS、EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION、HEDGEHOG SIGNALING、UNFOLDED PROTEIN RESPONSE、FATTY ACID METABOLISM、MYOGENESIS 分别与 2 个模型 mRNAs 显著相关(图 3)。

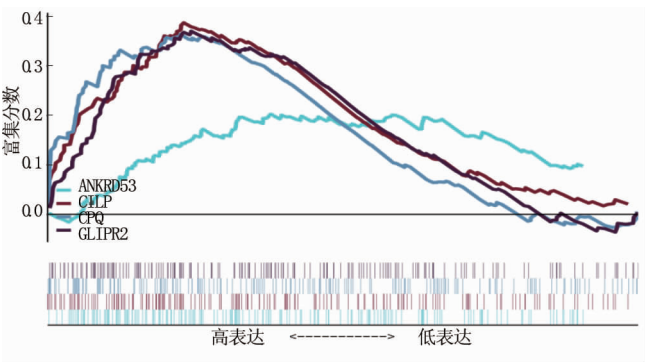


图 2 4 个模型 mRNAs 中 VEGF_A_UP、V1_UP 富集图

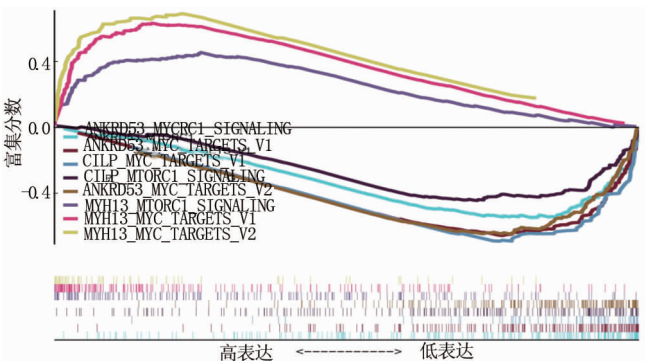


图 3 3 个模型 mRNAs 与核心效应特征基因集富集图

3 讨论

近年来,宫颈癌发病率不断上升,预后不良,复发率、转移率、病死率均较高^[69],有效的预后风险评

估、精准的基因靶向治疗方案、提高治愈率、延长生存期仍是现阶段宫颈腺癌研究的重点和热点。

现阶段,宫颈腺癌患者的预后评估工作主要基于不同的临床病理参数,如是否绝经、子宫旁受累、脉管内瘤栓、淋巴结转移、Silva 分型系统等^[6, 10],不同的影像学参数,如磁共振弥散加权成像和波谱分析等^[11-12]。本研究通过整合 TCGA 中 46 例 CAC 患者的 mRNAs 表达和生存数据,使用 R 软件进行单因素 Cox、Lasso、多因素 Cox 逐步回归分析,构建预后评估准确度较高的分子模型,经模型评价预测准确性高,C-指数为 0.95,3 年生存率的 AUC 为 0.950 1,5 年生存率的 AUC 为 0.949 7,其中 ANKRD53、CILP、GLIPR2、MYH13 可作为 CAC 患者预后评估的独立影响因素,可初步筛选预后不良需进一步行预防性靶向干预的患者。

目前,宫颈腺癌的分子靶向治疗研究主要集中在探索可以作为患者预后标志物和治疗靶标的潜在基因。近年来,高通量测序技术已广泛应用于 CAC 的基因分析,TCGA 数据库 31 例 CAC 患者的体细胞突变数据显示,90.32% 的 CAC 组织样本存在体细胞突变,涉及 17 342 个基因的 8 867 个染色体突变。基因突变与 CAC 患者预后密切相关。Jiang 等^[13]发现,宫颈腺癌较鳞癌具有更高的 KRAS 非同义突变率和更短的无复发生存期。精准靶向性干预异常基因可有效改善 CAC 治疗效果。Takiguchi 等^[14]进行蛋白质印迹分析发现,Src 基因在 CAC 细胞系 (Hela 和 TCO-2) 中高表达,使用比色法测定活细胞计数发现,Src 抑制剂联合化疗药可显著抑制 CAC 细胞生长增殖。Akimoto 等^[15]也发现 claudin-1 在宫颈腺癌呈高表达,敲除 claudin-1 可诱导细胞凋亡,显著抑制 CAC 细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究通过分析高通量测序得到的 CAC 全基因组表达网络,筛选出高度异常表达的 mRNAs 谱,结合患者生存数据,获取与 CAC 患者预后高度相关的新型分子标记构建生存预测模型,并通过对比模型 mRNAs 与全基因组的表达数据,进行模型 mRNAs 的癌症和效应特征基因富集分析,探索模型 mRNAs 在 CAC 中的作用机制及模型 mRNAs 之间的相互关系。癌症特征基因集分析发现,5 个模型 mRNAs 共存在 33 个共同显著相关的癌症特征基因集,其中 VEGF_A_UP、V1_UP 基因集与 4 个模型 mRNAs 均显著相关,8 个基因集分别与 3 个模型 mRNAs 显著相关,24 个基因集分别与 2 个模型 mRNAs 显著相关。ANKRD53、CILP、CPQ 和 GLIPR2 等 4 个模型 mRNAs 在癌症特征方面的联系更加紧密,与 VEGF_A_UP、

V1_UP 基因集均显著相关。MYH13 主要通过 CPQ 与 ANKRD53、CILP 和 GLIPR2 发生联系。效应特征基因集分析发现,5 个模型 mRNAs 共存在 9 个共同显著相关的效应特征基因集,其中 MYC TARGETS V1 和 MTORC1 SIGNALING 分别与 3 个模型 mRNAs 显著相关,7 个基因集分别与 2 个模型 mRNAs 显著相关。ANKRD53、CILP、CPQ 和 MYH13 之间联系紧密,共存在 8 个相关基因集。GLIPR2 主要通过 CPQ 与 ANKRD53、CILP 和 MYH13 发生联系。总之,癌症和效应特征基因集富集分析显示,5 个模型 mRNAs 联系紧密,主要可能通过 VEGF_A_UP、V1_UP、MYC TARGETS V1 和 MTORC1 SIGNALING 等途径在 CAC 中发挥作用并影响患者预后。

综上所述,本研究通过分析 TCGA 中 CAC 患者的 mRNAs 表达和临床数据集,构建预后评估准确度较高的列线图模型,用于筛选预后不良需进一步干预的患者,结合癌症和效应特征基因集富集分析,探索模型 mRNAs 在 CAC 中的作用机制及模型 mRNA 之间的相互关系,从而为 CAC 患者精准靶向性个体化治疗和预后评估提供新的线索。

(致谢:大连医科大学基础医学院全昱冲硕士在实施 R 软件分析中的指导,谨此致谢)

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张钊红:课题设计、实施,数据分析,论文撰写;关德凤:资料收集、数据核对;杨永秀:论文审核

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] 刘萍. 中国大陆 13 年宫颈癌临床流行病学大数据评价 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(1): 41-45. DOI:10.19538/j.fk2018010111.
- [3] Van Der Horst J, Siebers AG, Bulten J, et al. Increasing incidence of invasive and in situ cervical adenocarcinoma in the Netherlands during 2004—2013 [J]. *Cancer Medicine*, 2017, 6(2): 416-423. DOI:10.1002/cam4.971.
- [4] Chen W, Sun HK, Molijn A, et al. The variable characteristics of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix in China [J]. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2018, 22(4): 355-361. DOI:10.1097/LGT.0000000000000408.
- [5] Molijn A, Jenkins D, Chen W, et al. The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma [J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 138(2): 409-416. DOI:10.1002/ijc.29722.
- [6] 袁敏,王岩,古扎丽努尔·阿不力孜. 早期宫颈腺癌临床病理特征及预后相关因素分析 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26

- (14): 1036-1040. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2019.14.010.
- [7] Jonska-Gmyrek J, Gmyrek L, Zolciak-Siwinska A, et al. Adenocarcinoma histology is a poor prognostic factor in locally advanced cervical cancer [J]. *Current Medical Research and Opinion*, 2019, 35 (4): 595-601. DOI:10.1080/03007995.2018.1502166.
- [8] Jung EJ, Byun JM, Kim YN, et al. Cervical adenocarcinoma has a poorer prognosis and a higher propensity for distant recurrence than squamous cell carcinoma [J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2017, 27 (6): 1228-1236. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001009.
- [9] Xie XZ, Song K, Cui BX, et al. A comparison of the prognosis between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in stage IB-IIA cervical cancer [J]. *International Journal of Clinical Oncology*, 2018, 23(3): 522-531. DOI:10.1007/s10147-017-1225-8.
- [10] 赵晶晶,刘一瑶,于静,等. 腺癌浸润方式 Silva 分型系统对 58 例宫颈腺癌患者预后判断的影响 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2019, 20(4): 301-304. DOI:10.13390/j.issn.1672-1861.2019.04.004.
- [11] Lin GG, Lin YC, Wu RC, et al. Developing and validating a multi-variable prediction model to improve the diagnostic accuracy in determination of cervical versus endometrial origin of uterine adenocarcinomas: A prospective MR study combining diffusion-weighted imaging and spectroscopy [J]. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2018, 47(6): 1654-1666. DOI:10.1002/jmri.25899.
- [12] Saida T, Sakata A, Tanaka YO, et al. Clinical and MRI characteristics of uterine cervical adenocarcinoma: Its variants and mimics [J]. *Korean Journal of Radiology*, 2019, 20(3): 364-377. DOI: 10.3348/kjr.2018.0458.
- [13] Jiang W, Xiang L, Pei X, et al. Mutational analysis of KRAS and its clinical implications in cervical cancer patients [J]. *Journal of Gynecologic Oncology*, 2018, 29(1): 1-11. DOI:10.3802/jgo.2018.29.e4.
- [14] Takiguchi E, Nishimura M, Mineda A, et al. Growth inhibitory effect of the Src inhibitor dasatinib in combination with anticancer agents on uterine cervical adenocarcinoma cells [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(5): 4293-4299. DOI:10.3892/etm.2017.5061.
- [15] Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, et al. Estrogen/GPR30 signaling contributes to the malignant potentials of ER-negative cervical adenocarcinoma via regulation of Claudin-1 expression [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(10): 1083-1093. DOI:10.1016/j.neo.2018.08.010.

(收稿日期:2019-10-30)

(上接 274 页)

- [9] Franks S. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 91(3): 786-789. DOI: 10.1055/s-2008-1076143.
- [10] 吴娜,周瑛,李娟,等. 老年慢性心力衰竭患者心脏事件与外周血 Adropin 水平的相关性及其临床意义[J]. *心脏杂志*, 2018, 30(4):446-448. DOI:10.13191/j.chj.2018.0106.
- [11] Kwon OS, Andtbacka RHI, Hyngstrom JR, et al. Vasodilatory function in human skeletal muscle feed arteries with advancing age: the role of adropin[J]. *J Physiol*, 2019, 597(7): 1791-1804. DOI: 10.1113/jp277410.
- [12] Gulen B, Serinken M, Karcioğlu O, et al. Longitudinal clival fracture in a child: Case report and review of the literature[J]. *Pediatr Emerg Care*, 2018, 34(4):e68-e69. DOI:10.2176/nmc.cr.2018-0041.
- [13] Kalkan AK, Cakmak HA, Erturk M, et al. Adropin and irisin in patients with cardiac cachexia[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2018, 111(1):39-47. DOI:10.5935/abc.20180121.
- [14] 孙琳,裴史灼,覃英梅. 血清 VEGF、ES、adropin 联合检测在多囊卵巢综合征中的诊断效能[J]. *山东医药*, 2018, 58(19):62-64. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2018.19.018.
- [15] Liu Q, Wang XY, Qin YY, et al. SPOCD1 promotes the proliferation and metastasis of glioma cells by up-regulating PTX3[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(4):624-635.
- [16] 张美微,侯丽辉,李妍,等. 多囊卵巢综合征患者糖耐量低减的相关因素分析[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(4):392-395. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.04.015.
- [17] 杜静,吴日然,林秀峰,等. 肌肉肌醇联合 D 手性肌醇治疗胰岛素抵抗多囊卵巢综合征患者的临床效果[J]. *中国医药*, 2018, 13(9):1389-1393. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2018.09.027.
- [18] Inal ZO, Erdem S, Gederet Y, et al. The impact of serum adropin and ischemia modified albumin levels based on BMI in PCOS [J]. *Endokrynol Pol*, 2018, 69(2): 135-141. DOI: 10.5603/EP.a2018.0002.
- [19] Saito T, Liu M, Binnie M, et al. Upregulation of alveolar neutrophil enzymes and long pentraxin-3 in human chronic lung allograft dysfunction subtypes [J]. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 2018, 155(6):2774-2776. DOI:10.1016/j.jtcvs.2018.02.039.
- [20] Brunel AS, Wójtowicz A, Lamoth F, et al. Pentraxin-3 polymorphisms and invasive mold infections in acute leukemia patients with intensive chemotherapy [J]. *Haematologica*, 2018, 103(11):e527-e530. DOI:10.3324/haematol.2018.195453.

(收稿日期:2019-10-23)

过表达 miR-155 对强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡的影响及作用机制探讨

苟玉箫, 吴霞, 陈龙, 汪佳利

作者单位: 629000 四川省遂宁市中心医院风湿免疫科

通信作者: 汪佳利, E-mail: 21452934@qq.com

【摘要】目的 探讨过表达 miR-155 对强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡的影响及作用机制。**方法** 选择 2018 年 5—7 月四川省遂宁市中心医院风湿免疫科收治的强直性脊柱炎患者, 取其滑膜细胞进行试验。构建 miR-155 慢病毒表达载体, 并在 293 T 细胞中获得重组慢病毒, 经感染 NP 细胞得到稳定过表达细胞系 GV369-miR-155-NP (GV369-miR-155-NP 组), 同时设置空载体 GV369-NP 组和空白组。荧光显微镜观察慢病毒载体的标签蛋白 GFP 的表达, RT-qPCR 方法检测 miR-155 的表达情况, 流式细胞术检测细胞凋亡, 荧光素酶报告基因分析验证 miR-155 与 FasL 的靶向关系, Western-blot 法检测细胞中凋亡相关蛋白 FADD、Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 的表达, 试剂盒检测细胞线粒体膜电位的变化情况。**结果** 在荧光显微镜下观察, 经慢病毒感染的过表达细胞系和空载体细胞系均出现绿色荧光, 而空白组细胞未见绿色荧光。与空白组比较, GV369-miR-155-NP 组中 miR-155、Bcl-2 表达水平和线粒体膜电位明显升高, 而细胞凋亡率、FADD、Caspase-3 和 Bax 的表达水平均明显下降, 差异均有统计学意义 ($t/P = 12.399/0.000, 8.658/0.000, 4.879/0.002, 12.612/0.000, 8.450/0.000, 7.711/0.000, 6.977/0.001$); GV369-NP 组与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。荧光素酶报告基因分析证实 miR-155 与 FasL 存在靶向关系。**结论** miR-155 可抑制强直性脊柱炎滑膜细胞发生凋亡, 既可通过靶向调控外源性 FasL/Fas 通路参与 Caspase-3 和 FADD 介导的细胞凋亡, 也可通过线粒体途径对细胞凋亡发挥作用。

【关键词】 微小 RNA-155; 强直性脊柱炎; 滑膜细胞; 细胞凋亡

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.015

Effect of overexpression of miR-155 on apoptosis of synovial cells in ankylosing spondylitis and its mechanism Gou Yuxiao, Wu Xia, Chen Long, Wang Jiali. Department of Rheumatology and Immunology, Suining Central Hospital, Sichuan Province, Suining 629000, China

Corresponding author: Wang Jiali, E-mail: 21452934@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of overexpression of miR-155 on apoptosis of synovial cells in ankylosing spondylitis. **Methods** From May to July 2018, the synovial cells of patients with ankylosing spondylitis who were admitted to the Rheumatology and Immunology Department of Suining Central Hospital in Sichuan Province were selected and tested. To construct miR-155 Lentivirus Expression Vector, and obtain recombinant lentivirus in 293 T cells. After infecting NP cells, stable over expression cell line gv369 miR-155 NP (gv369 miR-155 NP group) was obtained. At the same time, empty vector gv369-NP group and blank group were set up. The expression of GFP, miR-155, apoptosis were detected by RT-qPCR, the targeting relationship between miR-155 and FasL was verified by luciferase reporter gene analysis, FADD, caspase 3, Bcl-2 and Bax were detected by Western-blot, and mitochondrial membrane was detected by kit Change of potential. **Results** Observation under a fluorescence microscope showed that both the over-expressing cell line and the empty vector cell line infected with lentivirus appeared green fluorescence, but no green fluorescence was observed in the blank group cells. Compared with the blank group, the expression levels of miR-155, Bcl-2 and mitochondrial membrane potential in the GV369 miR-155 NP group were significantly increased, while the apoptosis rate, FADD, Caspase-3 and Bax expression levels were significantly reduced, and the differences were statistically significant Significance ($t/P = 12.399/0.000, 8.658/0.000, 4.879/0.002, 12.612/0.000, 8.450/0.000, 7.711/0.000, 6.977/0.001$). There was no significant difference between the GV369-NP group and the blank group ($P > 0.05$). Analysis of the luciferase reporter gene confirmed that miR-155 has a targeting relationship with FasL. **Conclusion** The miR-155 can inhibit apoptosis of synovial cells in ankylosing

spondylitis. It can not only participate in Caspase-3 and FADD mediated apoptosis by targeting and regulating exogenous FasL/Fas pathway, but also play a role in apoptosis through mitochondrial pathway.

[Key words] miR-155; Ankylosing spondylitis; Synovial cells; Apoptosis; RT-qPCR

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种免疫相关的慢性炎性关节疾病,主要表现为髋部、腰部、颈部等关节疼痛,具有较高的致畸性和致残性。AS 发病多由感染、免疫遗传因素引起,患者滑膜关节、软骨关节、肌腱及韧带附着点被炎性细胞浸润,引起外周关节炎,严重影响生活质量^[1]。研究发现,滑膜在关节的损伤破坏中发挥着重要作用,而 AS 的常见病理学改变是滑膜组织异常增生,形成滑膜炎,进而引起血管翳,并侵蚀破坏关节软骨,最终导致关节骨化强直^[2]。随着年龄的增大或其他原因,滑膜组织缺少足够的营养物质,渗透性降低,这一过程极有可能导致滑膜细胞活性降低甚至死亡,从而影响滑膜组织的代谢,最终促使滑膜炎形成^[3]。目前尚未完全清楚强直性脊柱炎的分子机制,大量研究发现或与滑膜细胞凋亡密切相关。MicroRNA(miRNA)是存在于真核生物中一类长度为 18~25 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,其发夹结构是由 Dicer 酶加工的单链 RNA 前体(包含 70~90 个碱基)形成,能够与特定靶基因相结合进而参与调控转录后基因的表达^[4],其作用机制主要是直接结合在特定的靶信使 RNA 的 3' 非转录区,促使靶 RNA 发生降解或者翻译受到抑制,从而使目的基因表达受到影响。作为 miRNA 家族的重要成员之一,miR-155 所在的非编码 B 细胞集合基因簇(BIC)第 3 个外显子位于人类 21 号染色体上^[5]。目前 miR-155 在强直性脊柱炎中的作用研究逐渐成为热点,但其作用机制尚不十分明确。因此,现对强直性脊柱炎滑膜细胞进行 miR-155 过表达,并探讨其对细胞凋亡的影响机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)主要细胞:大肠杆菌菌株 DH5 α 、人胚胎肾上皮细胞 293T 由遂宁市中心医院基础医学实验室保存;强直性脊柱炎滑膜细胞由该实验室制备并保存。miR-155 模拟物(miR-155 mimic)及空白对照(mimic control)由上海吉玛生物技术公司代为合成;miR-155 过表达慢病毒载体系统购自上海吉玛生物技术有限公司,由 GV369、辅助包装质粒 pHelper1.0 和 pHelper2.0 3 个载体质粒构成。(2)试剂:DMEM、胎牛血清(FBS)、双抗、0.25% 胰酶购自美国 Gibco 公司;限制性内切酶购自美国 NEB 公司;Taq 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司。(3)仪器:双

荧光素酶报告基因分析试剂盒、DNA Ladder 购自美国 Thermo 公司;JC-1、PCR、反转录试剂盒及去内毒素小量提取质粒试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;SD-001/SD-002 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒购自英文特生物技术北京有限公司;脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;线粒体膜电位检测试剂盒购自美国 R&D 公司;Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒 KGA1023 购自江苏凯基生物技术股份有限公司;HEK293T 细胞、内参 β -actin 抗体、兔抗人 FADD 一抗、兔抗人 Caspase-3、兔抗人 Bcl-2、兔抗人 Bax 一抗和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞制备及培养:强直性脊柱炎滑膜细胞来自 2018 年 5—8 月在四川省遂宁市中心医院风湿免疫科行人工髋关节置换手术的强直性脊柱炎患者,均符合强直性脊柱炎诊断标准^[6]。男女各 4 例,患者年龄 32~55 岁,中位数 41.22 岁。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属知情同意并签署知情同意书。

在无菌超净工作台内,将收集的病变滑膜组织取出,加 D-Hanks 液反复浸泡清洗干净,用灭菌手术剪刀将组织剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小碎块,加入适量在 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中预热的 0.25% 胰酶进行消化,肉眼观察组织无明显块状后,加适量 FBS 终止消化,并吸入离心管中离心 10 min,转至超净台,弃上清,加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基 2 ml 将细胞轻轻吹打开,吸至培养瓶中,再补加适量含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中静置培养,2~3 d 后用倒置显微镜观察细胞生长情况,隔天更换一次培养液,当细胞融合度达到 80%~90% 时进行传代培养。若制备细胞量大或暂时不使用,可加细胞冻存液后置于液氮中冻存,待用时取出复苏培养即可。

1.2.2 miR-155 过表达载体构建及慢病毒收获:PCR 方法扩增出目的片段,酶切并用凝胶回收试剂盒进行纯化回收。连接线性化慢病毒表达载体 GV369,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,涂布具有嘌呤霉素抗性的 LB 平板,挑取菌落进行鉴定,然后将阳性克隆扩大培养后提取质粒,测序正确的阳性克隆命名为 GV369-miR-155。

将生长良好的 293T 细胞置于新的培养瓶中传代

培养,培养条件为 37℃、5% CO₂,次日待细胞长至 70% 左右,弃掉原培养液,更换为无血清培养基继续放于培养箱 2 h 后备用。将构建的阳性质粒 GV369-miR-155、辅助包装质粒 Helper1.0 和 Helper2.0 与转染试剂混合均匀,室温孵育,然后取适量混合液缓慢滴加至备用的 293T 细胞培养瓶中,轻轻晃动混匀后,放于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。同时设置 GV369 空载体转染对照,6 h 后取出弃液,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养,48 h 后吸取细胞培养瓶中营养液,在提前设置好的 4℃ 离心机中离心 10 min,将上清液倒入滤器中过滤,然后转至超速离心管中,4℃ 超速离心 2 h,PBS 重悬沉淀即为包装好的慢病毒液,分装保存备用。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 miR-155 慢病毒过表达稳定细胞系构建:首先筛选嘌呤霉素对强直性脊柱炎滑膜细胞的最低全部致死浓度,将对数生长期的强直性脊柱炎滑膜细胞铺于 48 孔细胞培养板,过夜培养后,每孔加入适量含有不同梯度浓度嘌呤霉素的 10% FBS 的 DMEM 培养基,每隔 48 h 换液,连续筛选 1 周,观察细胞生长状况,全部死亡的浓度即为最低筛选浓度。

复苏强直性脊柱炎滑膜细胞,待细胞生长状态处于对数生长期时铺于 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养过夜,次日细胞长至 75% 左右时,加入适量 GV369-miR-155 慢病毒液和空载体慢病毒液,感染强直性脊柱炎滑膜细胞 8 h 后换新培养液,继续培养 2 d 并在荧光显微镜下观察绿色荧光标签的表达。按照筛选嘌呤霉素最低致死剂量时的细胞密度,将上述细胞传代至 6 孔板,每隔 48 h 换为含最低致死剂量嘌呤霉素的 10% FBS 的 DMEM 培养基,连续筛选 1 周,挑取未被药物杀死的活细胞即为阳性细胞,进行扩大培养即为构建成功的稳定表达细胞系。分别将感染了 GV369-miR-155 及空载体慢病毒液的强直性脊柱炎滑膜细胞系分为 GV369-miR-155-NP 组和 GV369-NP 组,以未转染的滑膜细胞为空白组。

1.3.2 RT-qPCR 法检测 miR-155 的表达效率:收集感染 GV369-miR-155-NP 和 GV369-NP 的细胞及空白组细胞,TRIzol 试剂提取总 RNA,用 DNA/RNA 测量仪测

得 RNA 浓度。取符合要求的 RNA 样本,采用半定量 RT-qPCR 法扩增 miR-155 mRNA。按照 PrimeScrip 反转录试剂盒进行反转录成 cDNA,采用 SYBR Premix Ex Taq 说明书配置 PCR 反应体系,反应条件为 95℃ 预变性 10 min,然后 95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 10 s,40 个循环;95℃ 5 s,60℃ 1 min,95℃ 30 s。扩增结束后,产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 20 min,PUX Mix Marker 作为分子量参照物同时电泳,以 β -actin 为内参,引物序列见表 1,用凝胶成像分析仪在紫外光下采集图像,采用 Gepro 4.2 软件分析目的基因与同一条带 β -actin 的光密度比值。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡:细胞分组处理同上,将各组细胞用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶进行消化,吸至离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗 2 次,收集细胞。加入适量 AnnexinV Binding Buffer 重悬细胞,再分别加 Annexin V-APC 及 7-AAD,室温避光孵育 15 min。用 Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒对细胞双染,以避免与慢病毒表达的 GFP 荧光色谱的重叠,作用 1 h 内将制备好的样品置于流式细胞仪中检测分析。

1.3.4 荧光素酶报告基因分析:以人胚胎肾上皮细胞 293T 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 扩增 FasL 的 3'非翻译区序列,构建至荧光素酶报告基因载体 pGL3 中,记为野生型 pGL3-FasL-WT,同时构建突变型重组质粒 pGL3-FasL-MUT。将 HEK293T 细胞按 30% 左右密度铺 24 孔板,将 miR-155 mimic 及 mimic control 分别与空载质粒、野生型 pGL3-FasL-WT 及突变型 pGL3-FasL-MUT 共转染至 HEK293T 细胞,分为对照组、野生组和突变组。转染后 24 h,根据双荧光素酶测定试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

1.3.5 Western-blot 法检测 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达:细胞分组处理同上,将各组细胞采用 SD-001/SD-002 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒提取收集细胞中总蛋白,并用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量。将制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,加含有 5% BSA 的封闭液室温下封闭 2 h。分别加用封闭液 1:1 000 稀释的兔抗人 FADD 一抗、1:500 稀

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
miR-155	5'-GCGAAAGCATTTCGCAAGAA-3'	5'-GCGAAAGCATTTCGCAAGAA-3'
β -actin	5'-GCTGGATCCATATCGACGAT-3'	5'-GGGTGCCGTGTTCAATACT-3'

释的 Caspase-3 一抗、1:1 000 稀释的兔抗人 Bcl-2 及 1:2 000 稀释的兔抗人 Bax, 置于 4℃ 冰箱孵育过夜。次日, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 再加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 2 h, PBST 洗膜, 加 ECL 进行显色, 暗室曝光拍照, 并以 β -actin 作为内参蛋白。

1.3.6 线粒体膜电位变化情况检测: 细胞分组处理同上, 参照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书, 依次完成实验步骤, 将各组细胞培养 48 h 后, 在不同波长下观察细胞显色水平, 其中红色荧光, 激发波长 490 nm, 发射波长 580 nm; 绿色荧光, 激发波长 490 nm, 发射波长 520 nm 观察。使用计算机采集荧光图像, Image J 软件重叠红绿荧光, 将合成荧光的红、绿色荧光光密度比值作为膜电位表达水平。

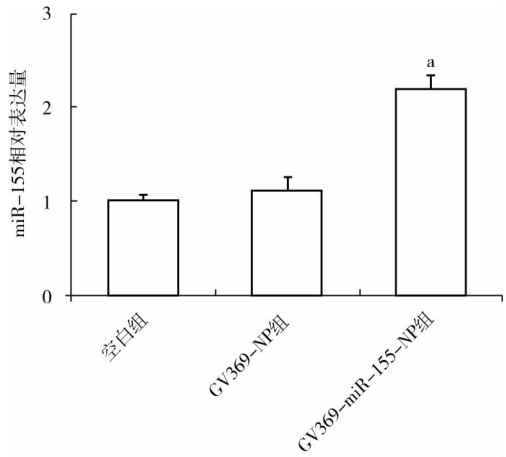
1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用独立样本 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-155 稳定过表达强直性脊柱炎滑膜细胞系建立情况 感染慢病毒的强直性脊柱炎滑膜细胞, 经过适宜浓度的嘌呤霉素筛选后, 得到稳定转染的过表达 miR-155 细胞系 GV369-miR-155-NP, 以及空载体慢病毒细胞系 GV369-NP。在荧光显微镜下观察, 经慢病毒感染的过表达细胞系和空载体细胞系均出现绿色荧光, 即慢病毒表达载体上的标签蛋白 GFP 表达, 表明感染成功, 而空白组细胞未见绿色荧光, 见图 1。

2.2 3 组 miR-155 表达量比较 与空白组比较, GV369-miR-155-NP 组中 miR-155 表达量明显升高 ($t = 12.399, P = 0.000$); GV369-NP 组与空白组中 miR-155 表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 构

建的稳定细胞系能高效表达 miR-155, 见图 2。



注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$

图 2 3 组 miR-155 的表达量比较

2.3 3 组细胞凋亡率比较 与空白组比较, GV369-miR-155-NP 组细胞凋亡率明显降低 ($t = 12.612, P = 0.000$); GV369-NP 组和空白组比较, 细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 3 组荧光素酶活性比较 双荧光素酶报告基因结果显示, 与对照组比较, 转染 miR-155 后, 野生型 FasL 的荧光素酶活性被抑制 ($t = 10.200, P = 0.000$), 突变型 FasL 的荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.5 3 组 FADD、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较 与空白组比较, GV369-miR-155-NP 组中 FADD、Caspase-3 及 Bax 的表达水平明显下降, 而 Bcl-2 表达水平明显升高, 差异均具有统计学意义 ($t = 8.450, P = 0.000; t = 7.711, P = 0.000; t = 6.977, P = 0.001; t = 8.658, P = 0.000$)。GV369-NP 组与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

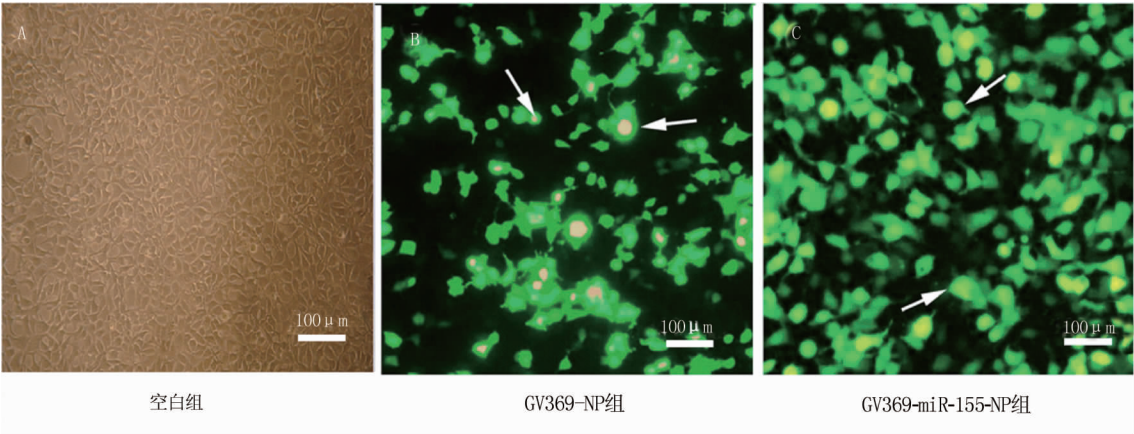
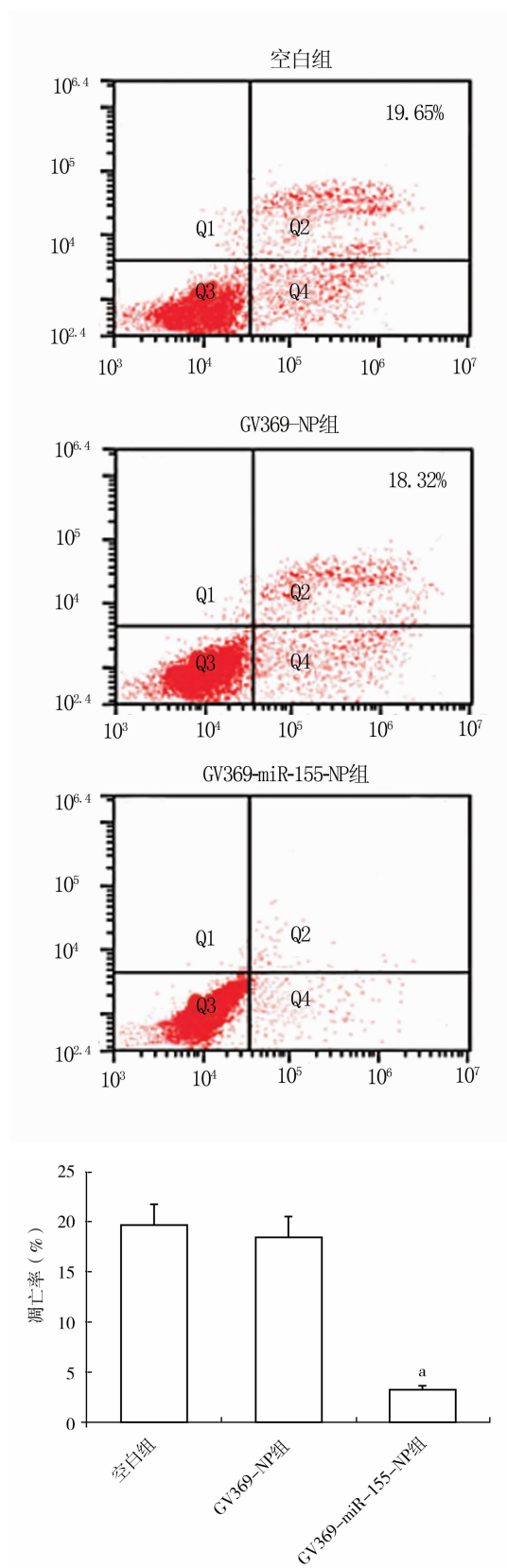
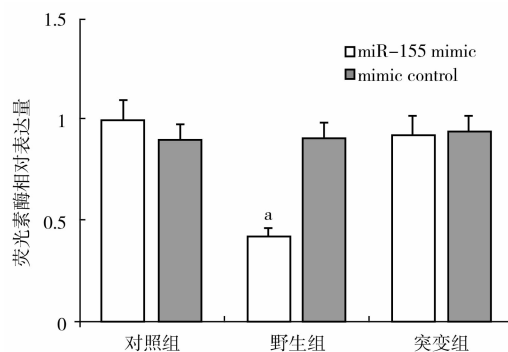


图 1 荧光显微镜观察构建的过表达慢病毒感染 NP 细胞



注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$

图3 3组细胞凋亡率比较



注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$

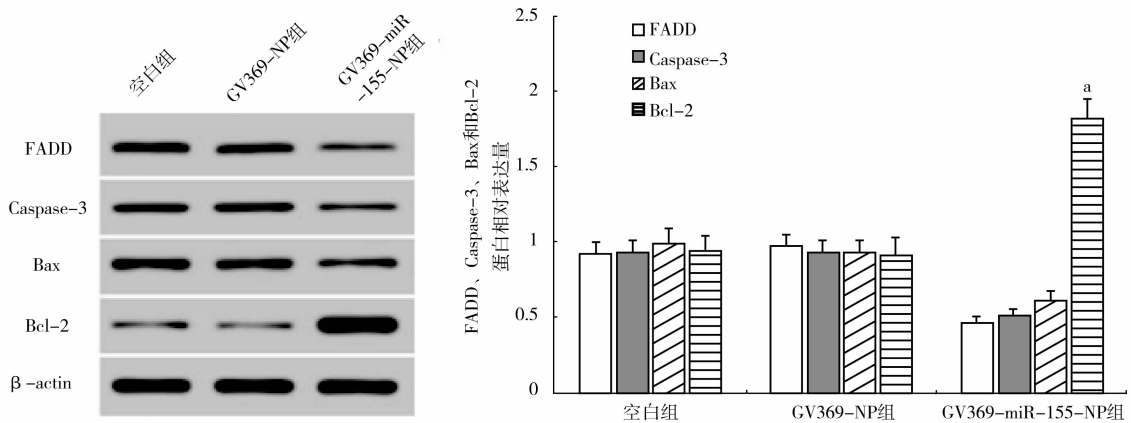
图4 各组荧光素酶活性比较

2.6 3组线粒体膜电位比较 转染后的细胞培养48 h经JC-1处理后,空白组中细胞线粒体膜电位较低(红色荧光与绿色荧光比值较低)。与空白组比较, GV369-miR-155-NP组中细胞线粒体膜电位出现明显上升趋势,差异具有统计学意义($t = 4.879$, $P = 0.002$),空白组与GV369-NP组比较线粒体膜电位变化差异无统计学意义($P > 0.05$),见图6。

3 讨论

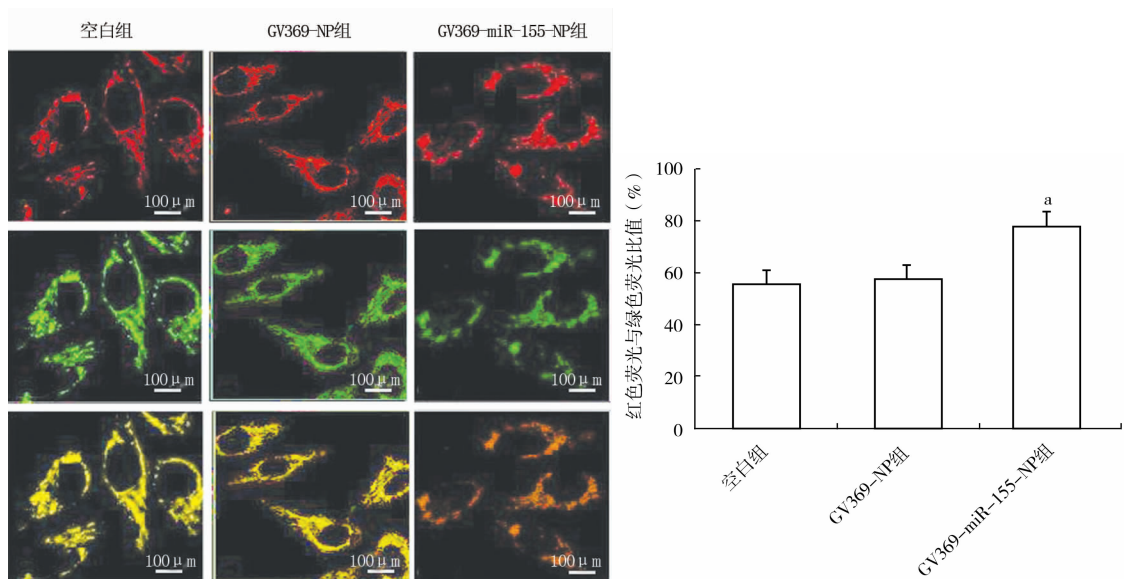
近年,强直性脊柱炎已成为一种常见高发性慢性病,不论是中老年人群还是青年人群均可发病。强直性脊柱炎可引起多种症状,髋部、腰部、颈部等关节疼痛为其主要临床表现^[7]。目前,年龄、饮酒、过度劳累等被认为是导致强直性脊柱炎的外在因素。关于其发病的分子机制与传导通路也存在众多观点,炎症因子、遗传基因、氧化应激、NO诱导、MicroRNA等在强直性脊柱炎的发生发展中起到重要作用^[8],而NF- κ B、PI3K/Akt、MAPK、Wnt/ β -catenin、Notch等被认为是与该病相关的信号传导通路^[9]。这些分子与信号通路相互影响,关系密切,在疾病发生过程中共同起作用。

众多研究表明,miR-155作为MicroRNA家族的重要成员,参与机体多项生理活动。miR-155在银屑病皮损中呈上调表达^[10],与炎症因子刺激有关。另外,miR-155在白血病中相当于一种癌基因,在多种实体肿瘤如结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、肺癌等高度表达,能够调控细胞的增殖、分化与凋亡等^[11-14]。以往研究发现,miR-155在强直性脊柱炎滑膜细胞中表达量比正常滑膜细胞显著降低^[15]。本研究中构建强直性脊柱炎滑膜细胞miR-155过表达细胞系,结果显示,与空白组比较, GV369-miR-155-NP组细胞凋亡率明显降低,这一结果证实miR-155可抑制强直性脊柱炎滑膜细胞发生凋亡,与既往的研究结果相符。



注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$

图 5 3 组细胞中 FADD、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白及其相对表达量比较



注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$

图 6 3 组细胞线粒体膜电位比较

死亡受体与其配体相结合是细胞凋亡外源性通路的介导机制,强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡与外源性通路 FasL/Fas 介导有关^[16]。FasL/Fas 凋亡通路的关键蛋白包含 Caspase-3 及 FADD,有报道称^[17],miR-155 对该通路有调控作用,本研究采用双荧光素酶报告基因验证了 miR-155 与 FasL 具有靶向调控关系。进一步分析构建的稳定过表达 miR-155 细胞系中 FADD 和 Caspase-3 蛋白表达情况,结果显示,与空白组比较, FADD 和 Caspase-3 在 GV369-miR-155-NP 组中的表达水平明显下降。进一步证实 miR-155 对 FADD 和 Caspase-3 的表达起到抑制作用,与其能够抑制细胞凋亡的结果相符。

内源性途径引起的细胞凋亡首先发生于线粒体

内,又称线粒体途径,该途径主要通过 Bcl-2 家族蛋白进行调节,Bcl-2 家族蛋白主要包括抗凋亡成员 Bcl-2、Bcl-W、Bcl-xL 及 Mcl-1 等,促凋亡成员 Bak、Bax 及 Bok 等^[18]。Bcl-2 作为主要的抗凋亡成员在线粒体外膜发挥作用,可以维持膜结构的完整性^[19];Bax 作为主要的促凋亡成员是通过破坏线粒体膜的完整性进而发挥作用的^[20]。Bcl-2 家族蛋白能够使线粒体膜的通透性发生精确的改变,也能诱导线粒体使其通透性转变孔道开放,而保护其外膜免受损伤,同时线粒体基质出现高渗状态,进一步膨胀造成外膜破裂,都能使膜间隙中的凋亡诱导因子、细胞色素 C、促凋亡蛋白等物质进入胞质中,而后促凋亡蛋白可独立破坏核内染色质,也可通过激活 Caspase,最终引起细胞凋亡^[21]。本研究同

时检测了抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax, GV369-miR-155-NP 组中 Bax 的表达水平下降, 而 Bcl-2 表达水平升高, 与其他 2 组比较差异均具有统计学意义。该结果提示, miR-155 在抑制强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡中可能通过线粒体途径介导。为此进一步检测细胞线粒体膜电位的变化情况, 结果 GV369-miR-155-NP 组细胞膜电位保持稳定, 另外 2 组出现显著下降趋势, 再次验证线粒体途径参与了 miR-155 抑制强直性脊柱炎滑膜细胞的凋亡。

综上, miR-155 在强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡中具有重要作用, 可以通过靶向调控外源性 FasL/Fas 通路参与 Caspase-3 和 FADD 介导的细胞凋亡, 此外, miR-155 也可通过线粒体介导的途径抑制强直性脊柱炎滑膜细胞凋亡。此结果为以后进一步研究强直性脊柱炎提供可靠依据, 同时对该病的功能恢复治疗具有重要意义。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

苟玉萧: 设计研究方案, 实施研究过程, 论文撰写; 吴霞: 提出研究思路, 分析试验数据, 论文审核; 陈龙: 实施研究过程, 资料搜集整理, 论文修改; 汪佳利: 课题设计

参考文献

- [1] 吕颖. 强直性脊柱炎患者外周血 microRNA 表达谱的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [2] Ciccio F, Guggino G, Rizzo A, et al. Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2015, 74(9): 1739-1747. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206323.
- [3] 贾相振, 西永明, 刘勇, 等. MMP3 与 Sox9 基因对人椎间盘退变髓核细胞调控作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2017, 53(4): 386-389. DOI: 10.13361/j.qdxy.201704003.
- [4] 杨文雪, 夏启胜, 陶庆文, 等. MicroRNA 在强直性脊柱炎成骨、破骨机制中的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(3): 402-406. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2017.03.024.
- [5] Gao Y, Ma X, Yao Y, et al. miR-155 regulates the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting E2F2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20324-20337. DOI: 10.18632/oncotarget.7951.
- [6] 李义凯, 朱洪民, 陈焕亮, 等. 两种强直性脊柱炎临床诊断标准的比较[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(8): 733-735, 743. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2010.08.004.
- [7] 于文文, 赵东宝. 遗传因素在强直性脊柱炎发病机制中的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(20): 3961-3965. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2016.20.003.
- [8] 蒋劲松. 强直性脊柱炎病变特点与机制研究进展[J]. *中国伤残医学*, 2016, 24(16): 91-92. DOI: 10.13214/j.cnki.cjo-tadm.2016.16.067.

- [9] Fang L, Liu J, Wan L, et al. Xinfeng capsule improves hypercoagulative state by inhibiting miR-155/NF- κ B signaling pathway in patients with active ankylosing spondylitis[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2016, 32(8): 1094-1098. DOI: 10.13423/j.cnki.cjemi.007825.
- [10] 单雪, 王丽华, 王健健, 等. miR-155 与自身免疫性疾病研究进展[J]. *国际遗传学杂志*, 2016, 39(1): 36-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4386.2016.01.007.
- [11] Lv Z, Fan Y, Chen H, et al. Investigation of microRNA-155 as a serum diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(3): 1619-1625. DOI: 10.1007/s13277-014-2760-9.
- [12] Kong W, He L, Coppola M, et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(43): 22855. DOI: 10.1007/s13277-014-2760-9.
- [13] Fang H, Shuang D, Yi Z, et al. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83: 64-69. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.006.
- [14] Narita M, Shimura E, Nagasawa A, et al. Chronic treatment of non-small-cell lung cancer cells with gefitinib leads to an epigenetic loss of epithelial properties associated with reductions in microRNA-155 and-200c[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172115. DOI: 10.1371/journal.pone.0172115.
- [15] Yin S, Du W, Wang F, et al. MicroRNA-155 sensitizes human glioblastoma cells to curcumin via the SHH/GLI1 signaling pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(4): 260-270. DOI: 10.1080/15384047.2016.1250981.
- [16] 马文松, 蔡安季, 苏卓娃, 等. Fas/FasL 在强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群上的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(10): 1229-1230. DOI: 10.3760/j.issn.1001-9030.2007.10.028.
- [17] 吴棣, 徐艳雪, 韩瞳瞳, 等. FasL 的特异性 miRNA 阻断舌鳞癌细胞免疫逃逸的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8): 1115-1119. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.004.
- [18] Russo A, Cardile V, Graziano ACE, et al. Involvement of Bax and Bcl-2 in Induction of Apoptosis by Essential Oils of Three Lebanese Salvia Species in Human Prostate Cancer Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): E292. DOI: 10.3390/ijms19010292.
- [19] Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic Bcl-2 family members in development[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 37-45. DOI: 10.1038/cdd.2017.170.
- [20] 姜西子, 金艾琳, 马琳, 等. 非小细胞肺癌中 PHF20 与凋亡相关蛋白 Bax 的表达及相关性[J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(10): 887-890. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2017.10.006.
- [21] Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Effect of Survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4593-4598. DOI: 10.3892/mmr.2016.5830.

(收稿日期: 2019-08-19)

肿瘤相关巨噬细胞 CD163 在乳腺癌组织中的表达及对乳腺癌细胞生物学特性的影响

陈馨, 张薇, 张伟杰, 赵怡欣, 吴鸿雁, 姚永忠

作者单位: 210008 南京大学医学院附属鼓楼医院普外科

通信作者: 姚永忠, E-mail: loyal1006@hotmail.com

【摘要】目的 分析 CD163 巨噬细胞在乳腺癌组织中的表达及其对乳腺癌细胞增殖、侵袭能力的影响。**方法** 收集 2010 年 1 月—2012 年 12 月南京大学医学院附属鼓楼医院普外科收治的 160 例经病理学证实为乳腺癌患者的组织标本及其癌旁(距癌组织 ≥ 5 cm)正常组织标本,比较乳腺癌组织和癌旁正常组织 CD163 巨噬细胞表达情况,依据染色结果将 CD163 巨噬细胞分为高、低表达组,分析其与乳腺癌患者临床病理特征的关系,采用小分子干扰技术下调巨噬细胞 MH-S 中 CD163 的表达,与乳腺癌细胞 MCF-7 共培养,平板克隆实验观察细胞增殖能力,Transwell 实验观察细胞侵袭能力,流式细胞术检测细胞周期。**结果** 乳腺癌组织中 CD163⁺巨噬细胞浸润数量明显高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($t = 134.273, P < 0.01$);CD163⁺巨噬细胞在不同年龄及肿瘤直径中的浸润数量差异无统计学意义(P 均 > 0.05),而在不同分化程度、TNM 分期及淋巴结转移间差异有统计学意义($\chi^2 = 23.498, 13.965, 9.753, P < 0.01$)。正常表达 CD163 的 MH-S 共培养 MCF-7 细胞的增殖能力和侵袭能力均明显高于低表达 CD163 的 MH-S 共培养的 MCF-7 细胞($t = 11.960, 18.397, P < 0.01$);与 siRNA-NC 组相比,siRNA-FAM 组的 G1 期 MCF-7 细胞所占的比例明显增高,差异具有统计学意义($t = 6.398, P < 0.01$),而 G2 期细胞所占的比例明显降低,差异亦具有统计学意义($t = 9.542, P < 0.01$)。**结论** 乳腺癌组织中 CD163⁺巨噬细胞数量明显升高,与临床分期、淋巴结转移、分化程度密切相关,且 CD163 能够增强乳腺癌细胞增殖、侵袭能力。

【关键词】 乳腺癌;CD163;肿瘤相关巨噬细胞;增殖;侵袭

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.016

Expression of tumor-associated macrophage CD163 in breast cancer tissue and its effect on biological characteristics of breast cancer cells Chen Xin, Zhang Wei, Zhang Weijie, Zhao Yixin, Wu Hongyan, Yao Yongzhong. Department of General Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China
Corresponding author: Yao Yongzhong, E-mail: loyal1006@hotmail.com

【Abstract】Objective To analyze the relationship between the expression of CD163⁺ macrophages in breast cancer tissues and clinicopathological parameters and its effect on the proliferation and invasion ability of breast cancer cells. **Methods** From January 2010 to December 2012, 160 tissue specimens of patients with breast cancer confirmed pathologically and normal tissue specimens adjacent to cancer (≥ 5 cm away from the cancer tissue) admitted to the General Surgery Department of Gulou Hospital Affiliated with the Medical College of Nanjing University were collected. The expression of CD163⁺ macrophages in breast cancer tissue and normal tissue adjacent to the cancer were compared. According to the staining results, CD163⁺ macrophages were divided into high and low expression groups. Then analyze its relationship with the clinicopathological characteristics of breast cancer patients. The expression of CD163 in macrophage MH-S was down-regulated by small-molecule interference technology, and then co-cultured with breast cancer cell MCF-7. Cell proliferation was observed by the plate cloning experiment, cell invasion was observed by the Transwell experiment, and the cell cycle was detected by flow cytometry. **Results** The number of CD163⁺ macrophage infiltration in breast cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues adjacent to cancer, and the difference was statistically significant ($t = 134.273, P < 0.01$). The number of CD163⁺ macrophages infiltrating in different ages and tumor diameters had no statistical significance ($P > 0.05$), but there was statistical significance in differentiation degree, TNM stage and lymph node metastasis ($\chi^2 = 23.498, \chi^2 = 13.965, \chi^2 = 9.752, P < 0.01$). The proliferation and invasion ability of MCF-7 cells co-cultured with MH-S with normal expression of CD163 were significantly higher than those of MCF-7 cells co-cultured with MH-S with low expression of CD163 ($t = 11.960,$

$t = 18.397, P < 0.01$). Compared with siRNA NC group, the proportion of G1 in siRNA-FAM group was significantly higher, with statistically a significant difference ($t = 6.398, P < 0.01$), while the proportion of G2 cells was significantly lower than that in siRNA-NC group, with statistically significant difference ($t = 9.542, P < 0.01$). **Conclusion** The number of CD163 + macrophages in breast cancer tissue is significantly increased, which is closely related to clinical stage, lymph node metastasis and differentiation degree, and CD163 can enhance the proliferation and invasion ability of breast cancer cells.

【Key words】 Breast cancer; CD163; Tumor-associated macrophage; Proliferation; Invasion

作为一种高度异质性的恶性肿瘤,乳腺癌在我国的发生率和病死率逐年上升,发病率在(50 ~ 60)/10万,且其发病率与年龄成正相关,其早期检出率低,往往到中晚期才被发现^[1-2]。随着医疗水平的综合发展,尽管该病已得到较好的治疗及预后,但局部复发或远处转移甚至死亡的患者仍较多。文献报道肿瘤转移是引起乳腺癌患者死亡的主要原因^[3],而肿瘤微环境在肿瘤转移过程中起着极其重要的作用,免疫细胞是肿瘤微环境重要组成部分,肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)作为免疫细胞代表,与肿瘤细胞相互作用,从而促进肿瘤的侵袭和转移^[4]。巨噬细胞分为2种类型,其中经典活化巨噬细胞称之为M1巨噬细胞,主要分泌促炎介质,介导Th1型免疫应答;替代性活化细胞称之为M2巨噬细胞,主要分泌抗炎介质,介导Th2型免疫应答^[5]。研究表明,CD163特异性表达于M2型巨噬细胞^[6]。文献报道,在直肠癌、平滑肌肉瘤中CD163巨噬细胞浸润密度与患者预后密切相关,且可作为疾病发生发展、转移的预测指标^[7-8],而CD163在乳腺癌中的作用机制尚存在争议,因此本研究采用免疫组织化学检测CD163在乳腺癌组织中的表达,并分析其与临床病理学参数的关系,同时干扰乳腺癌细胞中CD163的表达,观察乳腺癌细胞增殖、侵袭及凋亡周期的变化,旨在为乳腺癌的防治和预后评估提供新的思路,报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选取2010年1月—2012年12月于南京大学医学院附属鼓楼医院普外科行乳腺外科手术切除的乳腺癌组织及其癌旁(距癌组织 ≥ 5 cm)正常组织标本各160份,所有入选患者在术前均未进行放疗和其他治疗,且6年随访资料完整。160例患者,年龄25 ~ 83(48.32 $\pm$ 12.23)岁;所有组织标本均在4%中性福尔马林液中固定,然后常规取材石蜡包埋,用于后续免疫组织化学法检测。

1.2 材料和试剂 乳腺癌细胞株MCF-7、巨噬细胞MH-S采购自美国ATCC公司,荧光标记的2'-O-甲基siRNA CD163-FAM、稳定阴性对照siRNA CD163-NC和CD163/GAPDH引物购自上海吉玛生物技术有限公

司。兔抗人CD163单克隆抗体采购自上海长岛生物技术有限公司,辣根过氧化物标记的羊抗兔IgG购自上海沪峰化工有限公司,链霉抗生物素蛋白—过氧化物酶(SP)试剂盒购自美国Abcam公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒采购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 免疫组织化学检测 CD163 蛋白表达:将石蜡包埋的组织标本切成5 μ m厚度的切片,放入40%酒精中,40℃水浴处理4 min,展开后置于60℃烘箱中进行烘片。采用二甲苯进行脱蜡20 min,然后梯度酒精进行水化,然后加入3% H₂O₂,室温10 min,从而阻断内源性过氧化物酶的活性,再对CD163蛋白进行高温高压组织修复,PBS进行冲洗,加入5%羊血孵育30 min,除去封闭液,加入一抗,置于4℃冰箱过夜,PBS代替一抗作为阴性对照,次日取出使用PBS冲洗,每张切片滴加二抗,室温下孵育30 min,PBS冲洗5次,每次3 min,加入DAB显色水使用PBS冲洗终止显色,冲洗10 min,盐酸酒精分化后,梯度酒精脱水干燥,光镜下观察组织标本。

1.3.2 CD163 蛋白表达判定标准及分组:CD163的阳性表达位于细胞膜,少量表达于胞质和细胞外间质中,光学显微镜下观察制备好的切片,阳性表达为细胞内出现黄色、棕黄色或黄褐色颗粒。采用双盲法由2名病理科医师独立进行评估,每张切片先在低倍镜下($\times 100$)确定3个阳性染色高密度区及热点区,然后随机选取5个高倍镜视野($\times 400$)在光镜下观察计数阳性细胞数,取平均数作为密度计数结果。依据染色结果,根据cut-off值选中位数作为低表达和高表达的决断点^[9]。其中CD163⁺巨噬细胞数 > 28 个/400倍镜定为高表达, ≤ 28 个/400倍镜为低表达。

1.3.3 细胞培养:乳腺癌细胞株MCF-7、巨噬细胞MH-S于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中培养至对数期,然后调整细胞浓度,以 1×10^5 个细胞/平皿接种于25 ml培养皿中,置于恒温培养箱中培养,培养条件为37℃,5% CO₂,湿度95%。

1.3.4 细胞转染:将生长良好的巨噬细胞MH-S消化

后加含 10% 胎牛血清的高糖培养基,均匀铺至 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,待细胞融合度达 70% 左右时换为无血清培养基待转染用。采用 Lipofectamine2000 转染试剂并参照说明书,分别将阳性质粒 siRNA CD163-FAM 和阴性对照 siRNA CD163-NC 转染至 MH-S 细胞,48 h 后用 Western-blot 法检测 CD163 的表达效率。并设立无转染的 MH-S 细胞为空白对照组(control)。

1.3.5 Western-blot 法检测 CD163 的表达:提取各自细胞中总蛋白,并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定含量。制备蛋白样品,配制 SDS-PAGE 凝胶,电泳后转 PVDF 膜,加含 5% BSA 的封闭液室温下孵育 2 h。分别加适量用封闭液稀释的 CD163 一抗,4℃ 冰箱过夜孵育。次日复温后用 PBST 将 PVDF 膜洗涤干净,分别加适量稀释好的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,室温作用 2 h, PBST 洗涤后加 ECL 避光 5 min,暗室曝光并拍照,同时以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞侵袭:用无血清 RPMI1640 培养基按 1:5 稀释基质胶 Matrigel,并向每个 Transwell 小室中加 50 μl,37℃ 静置 2 h 凝固后备用。取对数期的 MCF-7 和 MH-S 细胞,然后按照 10:1 的比例,调整细胞密度为 5×10^5 /ml,取 250 μl 细胞悬液至 Transwell 小室中,600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 加至下室,并保证下层完全培养基与 Transwell 小室间无气泡产生。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后将 Transwell 小室取出,弃培养液加 PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定下室面,PBS 洗涤,加 0.1% 结晶紫染液室温避光染色 15 min,用棉签轻轻擦掉小室上层未迁移细胞,倒置晾干,置于倒置荧光显微镜下取 5 个高倍视野观察拍照,并计数穿过微孔膜的细胞数。重复实验 3 次,每组取平均数。

1.3.7 平板克隆形成实验检测细胞增殖:取对数期的 MCF-7 和 MH-S 细胞,然后按照 10:1 的比例,以 50% 汇合率接种于 6 孔板中,每组设置 5 个复孔,置于恒温培养箱中培养,培养条件为 37℃、5% CO₂,湿度 95%,培养 2 周,将培养液弃去,PBS 洗涤,加入 1 ml 甲醇固定 10 min,弃去固定液,结晶紫染色,晾干后计数。

1.3.8 流式细胞术检测细胞周期:取对数期的 MCF-7 和 MH-S 细胞,然后按照 10:1 的比例,以 50% 汇合率接种于 96 孔板中,每组设置 5 个复孔,置于恒温培养箱中培养,培养条件为 37℃、5% CO₂,湿度 95%,培养 24 h 后,离心弃上清,重悬细胞并计数,然后取 195 μl Annexin V-FITC 缓冲液重悬细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀,加入 10 μl 碘化丙啶(PI)染色液,混匀。

同时,设置 Annexin V-FITC 和碘化丙啶单染为对照管。室温下,避光孵育 15 min,孵育过程中重悬细胞 2 次,随后置于冰浴中。流式细胞仪检测 DNA 合成前期(G₁)、DNA 合成期(S)与 DNA 合成后期(G₂),实验重复 3 次。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析。计数资料用频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;正态分析计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和癌旁正常组织中 CD163⁺ 巨噬细胞浸润数量比较 乳腺癌组织中 CD163⁺ 巨噬细胞浸润数量为 (52.39 ± 3.24),明显高于癌旁正常组织 (13.25 ± 1.76),差异具有统计学意义(*t* = 134.273, *P* < 0.001)。

2.2 CD163⁺ 巨噬细胞与乳腺癌临床病理参数的关系

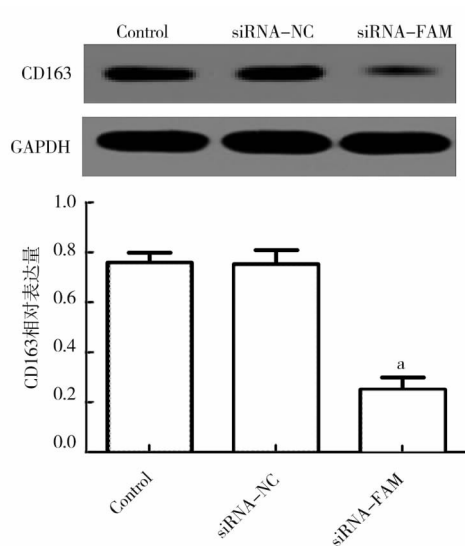
CD163⁺ 巨噬细胞在不同年龄及肿瘤直径中的浸润数量差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05),而在不同分化程度、TNM 分期及淋巴结转移间存在统计学意义(*P* < 0.01),见表 1。

表 1 CD163⁺ 巨噬细胞与乳腺癌临床病理参数的关系 [例(%)]

临床病理学特征	例数	CD163 ⁺		χ^2 值	<i>P</i> 值
		高表达	低表达		
年龄	<45 岁	64	46(71.88) 18(28.13)	0.021	0.885
	≥45 岁	96	70(72.92) 26(27.08)		
肿瘤直径	<2 cm	70	50(71.43) 20(28.57)	0.072	0.789
	≥2 cm	90	66(73.33) 24(26.67)		
分化程度	低分化	12	12(100.00) 0	23.498	0.001
	中分化	64	38(59.38) 26(40.62)		
	高分化	84	28(33.33) 56(66.67)		
TNM 分期	I + II 期	78	46(58.97) 32(41.03)	13.965	0.000
	III + IV 期	82	70(85.37) 12(14.63)		
淋巴结转移	有	90	74(82.22) 16(17.78)	9.753	0.002
	无	70	42(60.00) 28(40.00)		

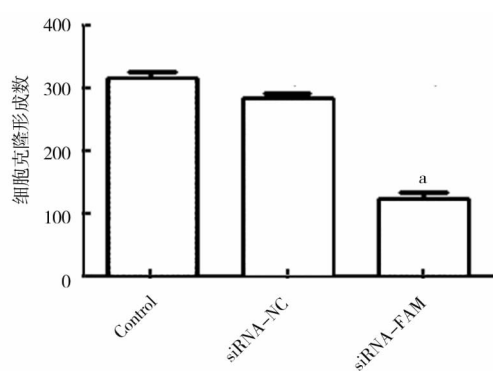
2.3 转染后各组 MH-S 中 CD163 蛋白表达比较 siRNA-FAM 亚组 CD163 明显低于 siRNA-NC 亚组,差异具有统计学意义(*t* = 12.164, *P* < 0.01),提示成功构建了 CD163 低表达的 MH-S 巨噬细胞。见图 1。

2.4 巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力的影响 平板克隆形成实验结果显示,siRNA-FAM 亚组细胞克隆形成数明显低于 siRNA-NC 亚组,差异具有统计学意义(*t* = 11.960, *P* < 0.01),见图 2。



注:与 siRNA-NC 亚组比较,^a $P < 0.001$

图 1 转染后各组 MH-S 细胞中 CD163 表达水平比较



注:与 siRNA-NC 亚组比较,^a $P < 0.001$

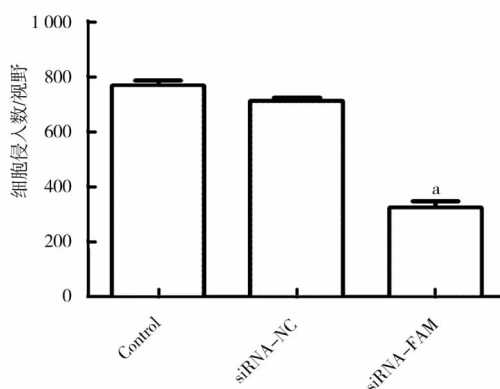
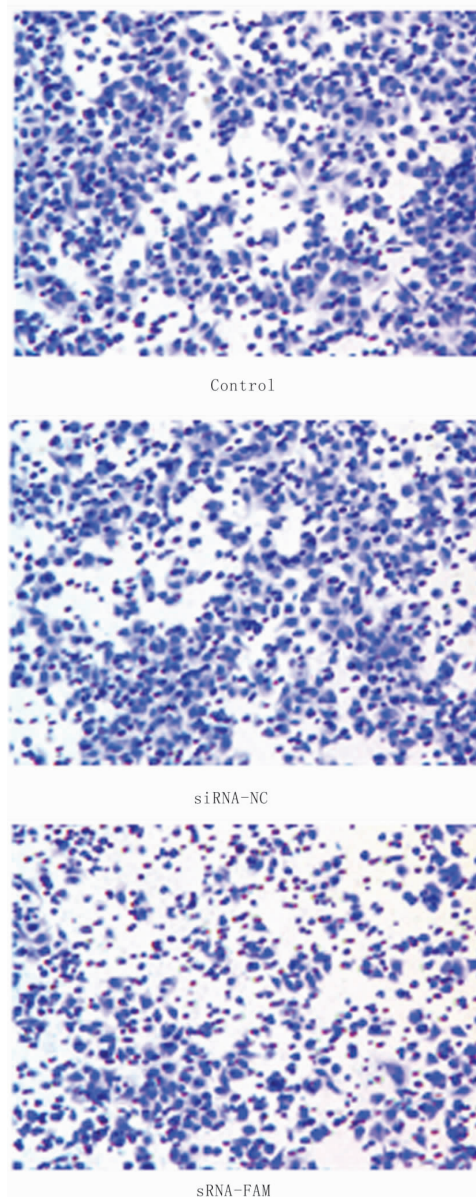
图 2 巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖能力的影响

2.5 巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示,siRNA-FAM 亚组细胞侵袭能力明显低于 siRNA-NC 亚组,差异具有统计学意义($t = 18.397, P < 0.05$),见图 3。

2.6 巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌 MCF-7 细胞周期的影响 流式细胞仪检测细胞周期结果显示,与 siRNA-NC 组相比,siRNA-FAM 组 G1 期 MCF-7 细胞所占的比例明显增高,差异具有统计学意义($t = 6.398, P < 0.01$),而 G2 期细胞所占的比例明显低于 siRNA-NC 组,具有显著的统计学意义($t = 9.542, P < 0.01$),见图 4。

3 讨论

乳腺癌作为临床常见肿瘤,是引起女性癌症相关死亡的主要原因,文献报道^[10],肿瘤发生发展过程中

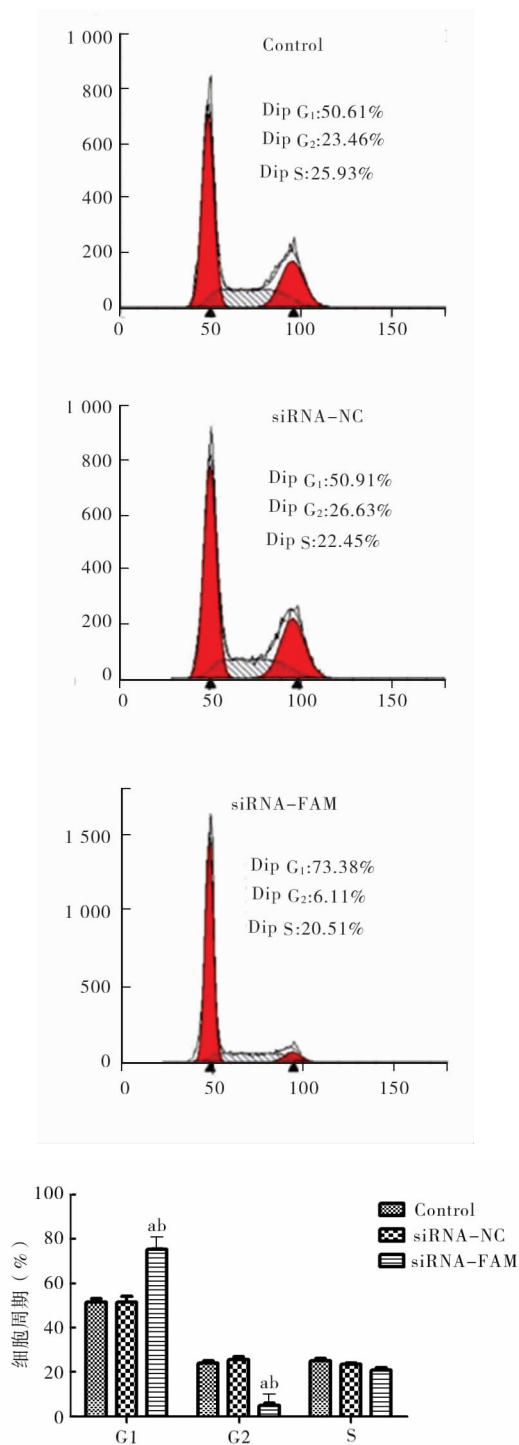


注:与 siRNA-NC 亚组比较,^a $P < 0.05$

图 3 巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌细胞 MCF-7 侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 400$)

平的巨噬细胞患者预后往往较差^[11-12],因此近年来肿瘤相关巨噬细胞浸润成为医学工作者研究的热点。

文献报道^[13-14],CD16/32、CD11c 及 CD11b 等在 M1 型巨噬细胞中高表达,而 CD163、CD206 等在 M2 型巨噬细胞中高表达,其中 CD163 是一种富含半胱氨酸的膜蛋白,其主要参与巨噬细胞内吞清除血红蛋白-珠蛋白复合物,从而保护机体免受游离血红蛋白介导的氧化损伤,其也是 M2 型 TAMs 的分子标志物。本研究采用免疫组织化学方法检测乳腺癌组织和癌旁正常组织中 CD163⁺巨噬细胞浸润数量,结果显示,乳腺癌组织中 CD163⁺巨噬细胞浸润数量均明显高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示乳腺癌中存在炎症反应,可能是因为肿瘤细胞和间质细胞分泌的细胞因子,募集了血液循环中的单核细胞,并且促使其在肿瘤组织处转变为巨噬细胞。文献报道,M2 型巨噬细胞浸润后能够促进淋巴管生成,进而促进淋巴结转移^[15],本研究进一步探讨了 CD163 与乳腺癌患者年龄、淋巴结转移、肿瘤直径、分化程度等病理学参数的相关性,结果显示 CD163⁺巨噬细胞在不同年龄及肿瘤直径中的浸润数量差异无统计学意义(P 均 > 0.05),而在分化程度、TNM 分期及淋巴结转移间差异具有统计学意义($P < 0.05$),进一步提示 M2 型巨噬细胞浸润深度能够作为判断患者病情的指标。文献报道,M2 型巨噬细胞不仅能够抑制 T 细胞分化,诱导免疫耐受,还能促进肿瘤血管生成,因此多数学者认为高水平的 TAMs 或 M2 型巨噬细胞肿瘤患者预后往往不良^[16-17]。肿瘤细胞增殖、侵袭、细胞周期与肿瘤生长、转移密切相关,直接影响到肿瘤的发生发展,本研究采用细胞转染技术,构建了 CD163 低表达的巨噬细胞 MH-S,然后与乳腺癌细胞 MCF-7 共培养,结果正常表达 CD163 的 MH-S 共培养 MCF-7 细胞增殖能力和侵袭能力均明显高于与低表达 CD163 的 MH-S 共培养 MCF-7 细胞,提示 CD163 表达水平影响乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力,黄冬云等^[18]采用细胞转染技术下调巨噬细胞中 CD163 的表达,然后与肺癌细胞共培养,结果显示,肺癌细胞 A549 的增殖能力和侵袭能力均明显下降,与本研究结果一致。本研究还采用流式细胞仪检测了共培养乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期,结果显示,与 siRNA-NC 组相比,siRNA-FAM 组的 G1 期 MCF-7 细胞所占的比例明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 G2 期细胞所占的比例明显低于 siRNA-NC 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示降低巨噬细胞中 CD163 表达会使乳腺癌细胞 MCF-7 细胞周期被阻滞于 G1 期。



注:与 control 组比较,^a $P < 0.01$;与 siRNA-NC 组比较,^b $P < 0.01$

图 4 流式细胞术检测巨噬细胞中 CD163 对乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡周期的影响

会伴随炎性细胞浸润,而巨噬细胞是主要的炎性细胞,其作为机体固有免疫反应重要组成成分,在不同组织微环境中可分化为不同亚型,从而发挥不同的生物学作用,研究发现口腔癌、食管癌等恶性肿瘤组织中高水

综上所述,乳腺癌组织中 CD163⁺巨噬细胞数量明显升高,与临床分期、淋巴结转移、分化程度密切相关,且 CD163 能够增强乳腺癌细胞增殖、侵袭能力,可为临床评估乳腺癌患者预后提供依据。

利益冲突:无

作者贡献声明

陈馨、姚永忠:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,提出研究思路,分析实验数据,论文审核;张薇、张伟杰、赵怡欣、吴鸿雁:实施研究过程,资料收集整理

参考文献

- [1] Desantis CE, Fedewa SA, Goding SA, et al. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(1):31-42. DOI: 10.3322/caac.21320.
- [2] Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, et al. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes[J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2010, 28(17):2868-2873. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.5001.
- [3] Schiavon G, H rebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESRI mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(313):182. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7551.
- [4] Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: A meta-analysis of the literature[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(18):30576-30586. DOI: 10.18632/oncotarget.15736.
- [5] Petty AJ, Yang, YP. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2017, 9(3):289-302. DOI: 10.2217/imt-2016-0135.
- [6] Chen XJ, Han LF, Wu XG, et al. Clinical significance of CD163⁺ and CD68⁺ tumor-associated macrophages in high-risk HPV-related cervical cancer[J]. *Journal of Cancer*, 2017, 8(18):3868-3875. DOI: 10.7150/jca.21444.
- [7] 张银旭, 张俊华, 刘宇, 等. 直肠癌组织中肿瘤相关巨噬细胞、炎性因子的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2011, 51(18):97-98. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2011.18.064.
- [8] Hemmerich A, Shaar M, Burbridge R, et al. Metastatic renal cell carcinoma as solitary subcentimeter polypoid gastric mucosal lesions:

Clinicopathologic analysis of five cases[J]. *Gastroenterology Research*, 2018, 11(1):25-30. DOI: 10.14740/gr952w.

- [9] Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: the 7th edition of theAJCC cancer staging manualand the future of TNM[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2010, 17(6):1471-1474. DOI: 10.1245/s10434-010-0985-4.
- [10] 范晶炎, 程忠平. 肿瘤相关中性粒细胞蛋白酶在肿瘤增殖、侵袭及转移病机中的作用[J]. *医学综述*, 2017, 23(20):4018-4022. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.20.013.
- [11] 周笑天, 陈东, 金震宁, 等. 核因子 κ B 对维持口腔癌相关巨噬细胞炎症细胞募集表型的作用[J]. *上海口腔医学*, 2017, 26(2):151-155. DOI: 10.19439/j.sjos.2017.02.005.
- [12] 解瑞玲, 董伯升, 成媛, 等. CD68、CD163 阳性巨噬细胞在食管癌组织浸润及对预后的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(5):523-526. DOI: CNKI:SUN:DSDX.0.2011-05-028.
- [13] Mathias G, Nico M, Benjamin S, et al. Transient receptor potential melastatin subfamily member 2 cation channel regulates detrimental immune cell invasion in ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2014, 45(11):3395-3402. DOI: 10.1161/strokeaha.114.005836.
- [14] Qin X, Chen G, Feng YH, et al. Early treatment with chloroquine inhibits the immune response against plasmodium yoelii infection in mice[J]. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2014, 234(4):271-280. DOI: 10.1620/tjem.234.271.
- [15] 解瑞玲, 申淑景, 董伯升, 等. 食管癌组织 M2 型巨噬细胞浸润与淋巴结转移和预后的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34(1):49-50. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.01.011.
- [16] 周剑, 贺家勇, 刘清, 等. 食管鳞状细胞癌中 M2 型巨噬细胞浸润与肿瘤转移和临床分期相关性的 Meta 分析[J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(11):15-19. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2017.11.003.
- [17] 李舒眉, 冯红超, 马竹君, 等. CD68⁺ 和 CD163⁺ 巨噬细胞在口腔鳞状细胞癌中的浸润及作用[J]. *重庆医学*, 2017, 46(20):2764-2766. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.20.009.
- [18] 黄冬云, 许文景, 周锐, 等. CD163 分子在非小细胞肺癌患者组织中表达及其对肺癌细胞侵袭和增殖的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(3):410-413. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2016.03.025.

(收稿日期:2019-10-18)

(上接 279 页)

- [16] Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, et al. Postpartum profiling of microRNAs involved in pathogenesis of cardiovascular/cerebrovascular diseases in women exposed to pregnancy-related complications[J]. *Int J Cardiol*, 2019, 291(9):158-167. DOI: 10.1016/j.ijcard.2019.05.036.
- [17] 廖静雯, 张琳, 张严焱, 等. 高血压和增龄对大鼠小动脉平滑肌表型转换和 miR-143/145 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3):230-237. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3949.2017.03.003.
- [18] 周星利, 王青, 罗一青. 妊娠高血压视网膜病变患者产前血管

新生因子和血管内皮功能的检测及意义[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(8):169-171. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.40.

- [19] 李婷, 宋艳. 非诺贝特对高血压性视网膜病变和炎症因子的影响[J/OL]. *中华眼科医学杂志:电子版*, 2016, 6(4):167-173. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2016.04.004.
- [20] Liu F, Wang Y, Wang X, et al. Role of agonistic autoantibodies against type-1 angiotensin II receptor in the pathogenesis of retinopathy in preeclampsia[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(6):29036-29046. DOI: 10.1038/srep29036.

(收稿日期:2019-09-26)

足细胞内陷性肾小球病 1 例及文献复习

张丹阳, 王少亭, 胡晓舟, 张瑾

作者单位: 450052 郑州大学第五附属医院肾内科

通信作者: 王少亭, E-mail: shaotingwang@126.com

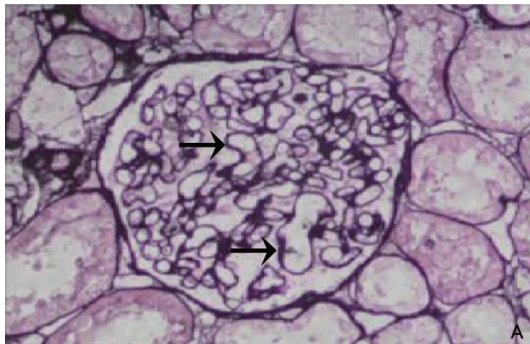
【关键词】 足细胞内陷性肾小球病; 肾活检; 诊断; 治疗

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.017

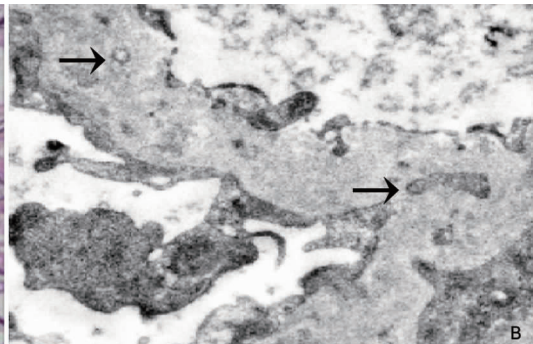
患者, 女, 26 岁。因妊娠晚期间断水肿伴血压升高 2 个月, 终止妊娠后血压反复升高 8 个月于 2016 年 8 月 11 日入院。患者 10 个月前无明显诱因出现双下肢水肿, 未治疗。9 个月前, 双下肢水肿加重并出现颜面部浮肿, 血压 180/100 mmHg, 尿蛋白(+), 予以降压治疗。8 个月前剖宫产手术后水肿消退, 血压恢复正常。6 个月前停降压药物。2 个月前无明显诱因再次出现颜面及双下肢水肿, 血压 170/100 mmHg。1 个月前查血清白蛋白 23.5 g/L, TG 5.35 mmol/L, TC 6.86 mmol/L, 尿素氮 3.1 mmol/L, 肌酐 34 μ mol/L, 尿蛋白(+++), 给予药物降压治疗, 症状未缓解。后多次复查, 尿蛋白(+++), 无发热、皮疹、关节痛、口眼干燥、明显脱发及尿量异常。体格检查: T 36.7℃, BP 134/104 mmHg。双下肢中度指凹性水肿。实验室检查: 尿蛋白定量 5.38 g/24 h; 血清白蛋白 25.2 g/L; TC 7.51 mmol/L, TG 2.22 mmol/L, LDL-C 4.02 mmol/L, 抗磷脂酶 A2 受体抗体定量 146.20 RU/ml。肾功能、甲状腺功能、补体 C3 及 C4 均正常, ANA 和 ANCA(-)。双肾彩色超声: 双肾实质弥漫性病变。肾活检病理: 光镜见肾小球足细胞轻度肿胀, 基底膜皱缩空泡变性、不规则增厚; 系膜细胞及基质局灶节段性轻中度增生; 毛细血管袢开放欠规则(图 1A)。免疫荧光见 IgG(+++), IgM(+), C3(+)颗粒状沉积于肾小球毛细血管壁。电镜观察肾小球见毛细血管袢僵硬, 基底膜明显不规则增厚,

内可见微管样和质膜样结构, 足细胞肿胀, 足突弥漫融合, 系膜基质节段性增生(图 1B)。诊断为足细胞内陷性肾小球病(podocytic infolding glomerulopathy, PIG)。予依那普利 20 mg/d, 美托洛尔 25 mg/d, 黄葵胶囊 7.5 g/d 治疗, 患者水肿及蛋白尿减轻, 血压下降。出院后予依那普利片 20 mg/d, 美托洛尔片 25 mg/d 维持治疗。多次复查尿蛋白波动于 0.67~0.93 g/ml, 肾功能及血压均在正常范围内。

讨论 足细胞内陷性肾小球病是近年来新认识的独立病种。它首次报道于 1992 年, 然后由日本肾脏病学会于 2008 年提出了 PIG 的概念。查询有关文献, 既往已确诊的 31 例 PIG 病例^[1-6]及本例患者均来自亚洲, 女性多于男性。65.63% 的患者被诊断为自身免疫性疾病, 其中 76.19% 为系统性红斑狼疮, 其他疾病包括肿瘤、慢性甲状腺炎、肾积水及乙型肝炎病毒感染。15.63% 无基础疾病。有部分病变轻微, 光镜无特异改变。电镜是确诊该病的金标准, 其特征为电镜下增厚的肾小球基底膜内微球、微管和足细胞浸润。患者一般会出现蛋白尿, 尿蛋白 0.3~16.8 g/d 不等, 并伴有肾功能损伤。治疗方面, 25 例患者使用泼尼松治疗, 10~50 mg/d, 其中 3 例患者接受冲击疗法。5 例系统性红斑狼疮患者加用免疫抑制剂, 包括吗替麦考酚酯、环孢菌素 A、羟氯喹和他克莫司。对于未分化结缔组织病患者, 除应用糖皮质激素外还应用吗替麦考酚酯和单剂量利妥昔单



注: 光镜检查示肾小球系膜细胞和基质局灶节段性增生, 基底膜皱缩、空泡变性、不规则增厚, 毛细血管袢开放欠规则(PASM 染色, $\times 200$)



注: 电镜检查示肾小球基底膜内可见微管样和质膜样结构(箭头), 足突弥漫融合, 未见明显电子致密物沉积($\times 4\ 000$)

图 1 患者肾活检病理检查结果

抗。在 29 例随访完善的患者中,27 例患者的蛋白尿水平下降,2 例患者的蛋白尿较前无明显好转甚至恶化。本例患者为青年女性,临床症状为大量蛋白尿、低蛋白血症、水肿、高脂血症、高血压,抗磷脂酶 A2 受体抗体定量 146.20 RU/ml,无血尿,肾功能正常。病理活检电镜观察诊断为 PIG。经过降压、降尿蛋白治疗后,患者预后良好。PIG 病因、发病机制未明,可能的机制为:(1)补体系统过度活化的免疫异常,C5b-9 对足细胞进行攻击^[7]。(2)足细胞损伤,破坏足细胞基质生物合成和降解之间的平衡,肾小球基底膜(GBM)增厚同时通透性增加^[8,9]。以往报道 5 例无伴随疾病,尚不清楚这 5 例是否真正代表了原发性 PIG,其与自身免疫异常是否有关有待探讨。因此,未来的研究应阐明临床病理学特征、免疫学证据、发病机制和治疗方法,以便更好地预防及诊治 PIG。

参考文献

- [1] Joh K, Taguchi T, Shigematsu H, et al. Proposal of podocytic infolding glomerulopathy as a new disease entity: a review of 25 cases from nationwide research in Japan[J]. Clin Exp Nephrol, 2008,12(6): 421-431. DOI:10.1007/s10157-008-0104-z.
- [2] Iguchi A, Sohma A, Yamazaki H, et al. A case of podocytic infolding glomerulopathy with focal segmental glomerulosclerosis[J]. Case Rep Nephrol Urol, 2013,3(2):110-116. DOI:10.1159/000354591.
- [3] Harada M, Kamijo Y, Ehara T, et al. A case of podocytic infolding glomerulopathy with multiple myeloma[J]. BMC Nephrol, 2014,15:

32. DOI:10.1186/1471-2369-15-32.
- [4] Kwon KW, Jeong HJ, Lee JH. Podocytic infolding glomerulopathy: A case report[J]. Ultrastruct Pathol, 2016,40(6):374-377. DOI:10.1080/01913123.2016.1229703.
- [5] Matthai SM, Mohapatra A, Mathew AJ, et al. Podocyte infolding glomerulopathy (PIG) in a patient with undifferentiated connective tissue disease: A case report[J]. Am J Kidney Dis, 2018,72(1):149-153. DOI:10.1053/j.ajkd.2017.11.023.
- [6] Zhang T, Sun W, Xue J, et al. Podocytic infolding glomerulopathy: two new cases with connective tissue disease and literature review[J]. Clin Rheumatol, 2019,38(5):1521-1528. DOI:10.1007/s10067-019-04504-6.
- [7] Fujigaki Y, Muranaka Y, Sakakima M, et al. Analysis of intra-GBM microstructures in a SLE case with glomerulopathy associated with podocytic infolding[J]. Clin Exp Nephrol, 2008,12(6):432-439. DOI:10.1007/s10157-008-0095-9.
- [8] Katsuhiko A, Isao S, Kazumi I, et al. Selective modulation of the secretion of proteinases and their inhibitors by growth factors in cultured differentiated podocytes[J]. Kidney International, 2002, 62(3): 822-831. DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00539.x.
- [9] Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease[J]. Cell & Tissue Research, 2012, 347(1):129-140. DOI:10.1007/s00441-011-1169-7.

(收稿日期:2019-07-29)

罕见病例

重度低钾血症合并甲状腺功能减退症致横纹肌溶解综合征 1 例

雷玉英,王伟,李芳,张笑

基金项目:云南省应用基础研究(2015FB059)

作者单位:650031 昆明医科大学第二附属医院消化内科(雷玉英),急诊内科(王伟、李芳、张笑)

通信作者:王伟,E-mail:95616591@qq.com

【关键词】横纹肌溶解综合征;低钾血症;甲状腺功能减退症;诊断;治疗

【DOI】10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.018

1 病例简介

患者,男,24 岁,因“腹痛、腹泻、呕吐 3 个月余,站立及行走不稳 1 d”于 2018 年 10 月 22 日就诊。患者近 3 个月反复出现腹痛、腹泻、呕吐,为上腹部阵发性隐痛,3~4 次/周,持续时间不详,无放射或转移,与进食和体位改变无关,腹泻 3~4 次/天,为黄色稀水样便,量中等,无黏液、脓血,呕吐胃内容物,非喷射性,量少。自起病来精神进行性变差,纳差,少尿,体质量未测量。于外院予对症支持治疗,疗效欠佳,并出现站立及行走不稳,遂转入我院。既往有毒品摄入史(具体不详),余无特殊。入院查体:消瘦,嗜睡,舌质稍干,双上肢肌力Ⅳ级,双下肢肌力Ⅲ级。辅助检查:血气分析 pH 7.323,实际碱剩余-11.9 mmol/L, HCO₃⁻ 12.5 mmol/L,乳酸 1.5 mmol/L, K⁺ 1.11 mmol/L;

心肌肌钙蛋白 I(cTnI)0.05 ng/ml,肌红蛋白(MYO) >1 000 ng/ml,肌酸激酶同工酶(CK-MB) 84.4 ng/ml。血常规 WBC 18.18 × 10⁹/L, N 79.80%, Hb 87 g/L, PLT 92 × 10⁹/L, 血生化 TP 62.7 g/L, Alb 31.6 g/L, ALT 359 U/L, AST 369 U/L, K⁺ 1.31 mmol/L, Na⁺ 157.3 mmol/L, Cl⁻ 129.2 mmol/L, Ca²⁺ 1.88 mmol/L, 尿素 3.17 mmol/L, 肌酐 82 μmol/L。心电图无 ST-T 段改变,腹部 CT 示腹盆腔内肠管扩张、积气,见多发液平。立即给予禁食、胃肠减压、补钾维持水电解质平衡、营养支持、保肝、莫西沙星抗感染、乌司他丁清除炎性因子等治疗。23 日检查示, TSH、T₃、T₄、FT₃、FT₄ 显著降低,其余激素水平正常。动态监测血象进行性升高,完善血培养未见异常。24 日患者小便呈浓茶色,急查:肌酸激酶(CK)58 339 U/L,提示横纹肌溶解,给予血浆置换(冰冻

血浆 1 000 ml)、持续血液滤过治疗。动态监测发现 Alb 显著降低,给予输注人血白蛋白。26 日 Hb 骤降至 48 g/L,给予输注悬浮红细胞 4 U,并完善贫血三项和抗球蛋白试验未见异常,随后 Hb 未再进行性下降。28 日完善磷脂综合征相关抗体、抗中性粒细胞胞浆抗体、抗肾小球基底膜抗体、ANA 谱排外潜在自身免疫性疾病。经治疗,患者 CK、CK-MB、转氨酶显著下降,MYO 仍高(>1 000 U/L),血钾、四肢肌力恢复正常,腹痛、腹泻、呕吐逐渐消失,饮食恢复正常,精神明显改善。于 30 日转外院继续诊治。11 月 20 日电话随访患者精神、饮食和乏力较前持续改善。最后诊断:(1)横纹肌溶解综合征;(2)重度低钾血症;(3)甲状腺功能减退症。

2 讨论

2.1 病因 横纹肌溶解综合征(rhabdomyolysis, RM)是指一系列可影响横纹肌细胞膜通道及其能量供应的因素导致横纹肌细胞膜完整性破坏,释放出大量肌酸激酶、肌红蛋白、小分子物质等细胞内容物入血引起器官功能损伤及生化紊乱的一组综合征。RM 的病因很多,总体上可分为剧烈运动、强体力活动、挤压伤等创伤性因素,以及药物、中毒、感染、内分泌及代谢性疾病、遗传性和自身免疫性疾病等非创伤因素^[1-2]。

该患者为重度低钾血症(血钾 1.31 mmol/L),发生低钾血症的原因:(1)丢失过多,长期腹泻、呕吐,考虑肠道感染可能;(2)摄入不足,长期纳差。患者重度低钾,乏力症状突出,出现不完全麻痹性肠梗阻,尿呈浓茶色,血清 CK 最高达 58 339 U/L,可明确诊断为 RM。患者无 RM 的常见病因,在甲状腺功能减退症患者中,CK 可能会轻至中度升高^[3-4],但甲状腺功能减退导致 RM 相对罕见^[4-5],且报道的病例中多有其他可能导致 RM 的因素,如使用降脂药物或剧烈运动^[6-7]。综上所述,本例患者考虑为重度低钾血症合并甲状腺功能减退症导致 RM。

2.2 机制

2.2.1 RM 与低钾血症的关系:(1) K^+ 对骨骼肌的供血有调节作用。机体运动时,骨骼肌细胞内的 K^+ 释放入组织间隙使局部 K^+ 过高,引发局部小动脉、毛细血管舒张,增加细胞灌注,低 K^+ 时血供减少,导致骨骼肌痉挛、缺血坏死及横纹肌溶解。(2) K^+ 参与能量代谢,缺 K^+ 时肌细胞糖原合成和储存减少,能量储备不足。(3) K^+ 跨细胞膜的分布变化可能影响肌肉组织的兴奋性和收缩性,低 K^+ 会影响门控通道及一些 K^+ 通道的传导,改变 K^+ 平衡电位同时影响膜静息电位导致超极化,另外,糖酵解酶被抑制、脂质分解增加,大量游离脂肪酸在肌细胞内堆积,膜通透性增加,细胞内容物直接释放入血。(4)低 K^+ 时 Na^+-K^+-ATP 酶功能障碍,细胞内 Na^+ 增加,激活 Na^+-Ca^{2+} 交换, Ca^{2+} 内流增多,直接导致细胞损伤或 ATP 损耗, Ca^{2+} 超载使肌动蛋白和肌球蛋白发生氧化应激,影响骨骼肌兴奋-收缩偶联,并激活细胞内的 Ca^{2+} 相关蛋白酶、磷脂酶产生瀑布式级联反应,引起细胞骨架和膜蛋白破坏、肌纤维坏死。(5)严重低钾使细胞内钾大量外流,肌细胞新陈代谢紊乱而发生非炎性坏死,引起横纹肌溶解^[1,8]。

该患者还合并营养不良,Alb 最低仅 20.6 g/L,低蛋白血症可导致肌细胞营养不良,肌细胞膜在收缩和舒张时不稳定,钙

离子内流过多,导致肌细胞变性坏死。

2.2.2 RM 与甲状腺功能减退的关系:甲状腺功能减退致 RM 的机制尚不明确,但公认的假设为甲状腺功能减退致糖原分解或线粒体氧化代谢功能受损^[9]。甲状腺素缺乏导致以下变化:肌纤维从快速抽搐 II 型转换为慢速抽搐 I 型,存在葡糖氨基葡聚糖沉积,肌动蛋白-肌球蛋白收缩性差,肌球蛋白 ATP 酶活性低,骨骼肌中 ATP 转换率低,肌肉血管灌注不足,肌肉组织缺氧,肌肉能量储存低^[10]。

RM 的典型表现包括肌肉酸痛、乏力、尿色加深(浓茶色或酱油色)。本病例缺乏肌肉酸痛症状,患者未能及时发现尿色加深,后因乏力症状突出,以至于站立及行走不稳。而乏力属非特异性症状,长期摄入不足或丢失过多致低钾均可解释,而低钾血症导致 RM 在临床上相当罕见,因此容易漏诊,后发现患者小便呈浓茶色,进一步完善 CK,复习相关文献后诊断为低钾血症合并甲状腺功能减退所致 RM。本病漏诊后果严重,所以对此类患者要详细询问病史、积极寻找病因。

参考文献

- [1] Horwitz H, Woeien VA, Petersen LW, et al. Hypokalemia and rhabdomyolysis[J]. J Pharmacol Pharmacother, 2015, 6(2): 98-99. DOI: 10.4103/0976-500X.155488.
- [2] Zhang W, Li CW, Zeng CY, et al. Rhabdomyolysis presenting with severe hypokalemia in hypertensive patients: a case series[J]. BMC Res Notes, 2013, 6(5): 155. DOI: 10.1186/1756-0500-6-155.
- [3] Van Staa TP, Carr DF, O'Meara H, et al. Predictors and outcomes of increases in creatine phosphokinase concentrations or rhabdomyolysis risk during statin treatment[J]. Br J Clin Pharmacol, 2014, 78(3): 649-659. DOI: 10.1111/bcp.12367.
- [4] Sindoni A, Rodolico C, Pappalardo MA, et al. Hypothyroid myopathy: A peculiar clinical presentation of thyroid failure. Review of the literature[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2016, 17(4): 499-519. DOI: 10.1007/s11154-016-9357-0.
- [5] Salehi N, Agoston E, Munir I, et al. Rhabdomyolysis in a patient with severe hypothyroidism[J]. Am J Case Rep, 2017, 18(4): 912-918. DOI: 10.12659/ajcr.904691.
- [6] Ambapkar SN, Shetty N, Dwivedy A, et al. Statin-induced rhabdomyolysis in patient with renal failure and underlying undiagnosed hypothyroidism[J]. Indian J Crit Care Med, 2016, 20(5): 305-307. DOI: 10.4103/0972-5229.182210.
- [7] Naz A, Issa M. Rhabdomyolysis and acute renal impairment in a patient with hypothyroidism: A case report[J]. Case Rep Med, 2014, 2014: 139170. DOI: 10.1155/2014/139170.
- [8] Zutt R, Linthorst GE, Wanders RJ, et al. Rhabdomyolysis: review of the literature[J]. Neuromuscul Disord, 2014, 24(8): 651-659. DOI: 10.1016/j.nmd.2014.05.005.
- [9] Altay M, Duranay M, Ceri M, et al. Rhabdomyolysis due to hypothyroidism[J]. Nephrol Dial Transplant, 2005, 20(4): 847-848. DOI: 10.1093/ndt/gfh745.
- [10] Kuo HT, Jeng CY. Overt hypothyroidism with rhabdomyolysis and myopathy: a case report[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(5): 633-637. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.05.023.

以共济失调为主要表现的布氏杆菌病 1 例

赵京燕, 李建军, 张强胜, 潘朝

作者单位: 050091 石家庄, 河北以岭医院肌萎缩专科

通信作者: 赵京燕, E-mail: emmablue1234@163.com

【关键词】布氏杆菌病, 神经型; 共济失调; 复视; 诊断; 治疗

【DOI】10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.019

患者, 男, 30 岁。因左眼复视伴进行性双下肢行走不稳 6 个月入院。自诉于 2018 年 12 月左右无明显诱因逐渐出现左眼外展时复视, 伴排尿困难, 尿等待时间长, 在当地县医院以“前列腺炎”治疗, 效果不佳。2019 年 4 月出现双下肢行走僵硬不稳, 如踩棉花, 不能走直线, 大便费力, 听力减退, 复视情况同前, 就诊于外院, 查泌尿彩色超声“膀胱腔内沉积物, 前列腺钙化斑, 双肾结构、输尿管未见明显异常, 头颅 CT 平扫未见明显异常, 未明确诊断。为进一步诊治于 2019 年 5 月以“共济失调”收住我院。查体: 左眼外展时复视, 右眼视物正常, 听力减退, 双上肢抬举活动尚可, 无明显束带感, 双下肢行走僵硬不稳, 如踩棉花, 不能走直线, 肌力 4 级, 肌张力偏高, 双侧 Babinski 征 (+), 四肢深浅感觉无明显异常, 闭目难立征阳性, 指鼻试验准确, 跟膝胫试验不稳。小便不利, 大便费力。

胸椎 MR 提示“胸 3 椎体后部血管瘤”。肌电图示“左 H 反射潜伏期延长, 右 H 反射未引出, 余神经传导速度正常, F 波潜伏期正常, 双下肢被检肌用力时电位数减少, 双上肢被检肌未见特征性改变, 低频衰减不明显, 高频无递增。左皮质 P40 潜伏期延长, 波幅减低, 右皮质 P40 潜伏期延长, 听性脑干反应异常, 双 P100 潜伏期延长”。余检查无异常。6 月 5 日查患者血清虎红平板凝集试验及布氏杆菌凝集实验均为阳性(滴度最低 1:200), 再次追问病史, 患者及家属提及发病 4 个月前有屠宰羊史, 宰羊后 2 个月出现过发热, 无其他不适, 服用退热药后缓解。进一步检测脑脊液中的 DNA, 鉴定布氏杆菌置信度为“高”; 脑脊液检查为淡黄微浊, 白细胞 $30 \times 10^6/L$, 淋巴细胞占 95%, 蛋白质 208 mg/dl, 葡萄糖 1.05 mmol/L; 最终诊断为“神经型布氏杆菌病”, 给予针对病原菌的治疗, 行走不稳症状有所好转。

讨论 布氏杆菌病是由布鲁杆菌引起的动物传染病, 属于变态反应性疾病。该病主要传染源是羊、牛、猪, 传播途径包括皮肤黏膜接触、消化道及呼吸道等^[1], 95% 以上的患者表现为发热、间歇热(波浪热), 多汗、头痛、体质量下降、乏力、固定或游走性反复发作的关节(包括脊柱)疼痛、活动受限、全身不适、精神抑制等, 查体可见肝脾及淋巴结肿大, 但不是必备的表现, 且临床上许多患者并无明确的牛羊接触史或牛羊肉食用史, 故误诊率相对较高^[2]。该病早期诊断治疗预后尚可, 如诊断不清或治疗不彻底, 可造成多系统损害, 其神经系统并发症

发生率为 1.7% ~ 10.0%^[3], 称为神经型布氏杆菌病(neurobrucellosis, NB), 当此类患者仅以神经系统局部症状就诊, 影像学又无特异性改变, 极易漏诊、误诊。

神经系统症状可以是布氏杆菌病的唯一表现, 也可以是慢性布氏杆菌病的系统症状之一。既往文献总结发现, NB 以脑膜炎、脑炎和脑脊髓膜炎、脊髓炎最为常见(头痛、脑膜刺激征阳性、痉挛性下肢轻瘫、尿便潴留), 颅神经损害常累及听神经(听力受损)、外展神经(复视)及面神经(面瘫)^[4-5], 亦可引起周围神经损害(手足麻木、双下肢无力)、视神经受损(视力下降、重者失明)^[6-7]。国外尚有脑梗死、蛛网膜下腔出血、颅内静脉血栓等报道^[8], 而 MR 可无明显影像学改变。多数患者在感染后 2 ~ 12 个月诊断该病^[3], 且部分患者有后遗症(瘫痪、听觉丧失、痴呆及括约肌功能障碍), 复发率为 5% ~ 10%^[9]。

诊断标准可依据 2012 年原国家卫生和计划生育委员会颁布的《布氏杆菌病诊疗指南》: (1) 神经系统的相关临床表现; (2) 脑脊液改变, 白细胞升高, 以淋巴细胞为主, 蛋白质升高, 葡萄糖降低; (3) 血清或脑脊液布氏杆菌凝集试验阳性; (4) 针对布氏杆菌病原治疗病情好转。治疗应用对细胞内和中枢神经系统具有较强渗透作用的抗生素, 一般以多西环素或米诺环素、利福平为基础用药, 联合选用氨基糖苷类、头孢三代或喹诺酮类药物, 也有文献报道使用糖皮质激素, 但尚未形成规范化指导意见。

本例患者特点: (1) 患者非农牧民, 未与牛羊等有密切接触史。追问病史得知患者 4 个多月前曾徒手宰羊, 羊未行有效的动物检疫, 杀羊过程没有防护设施, 考虑感染与此有关。(2) 以共济失调症状为主要临床表现的 NB 病例文献报道较少, 国内文献提及 2 例类似患者^[10-11], 血清布氏杆菌凝集试验阳性, 但布鲁氏菌 PCR 定量、培养阴性, 其中 1 例患者胸腰椎 MR 可见脊髓内异常信号。(3) 本患者脑及脊髓 MR 检查均未见明显异常, 且病原菌接触史、发热及神经系统症状分别单独出现, 时间间隔均为几个月, 极易漏诊。

综上, 临床医生应提高对本病的认识及诊治水平, 当出现不明原因神经系统的表现时, 尤其是不明原因的听力、视力下降及眼肌麻痹, 即使患者否认布氏杆菌接触史, 影像学及脑脊液等相关检查未提示炎症反应改变时, 应考虑神经型布氏杆菌病的可能。

(下转 306 页)

尿毒症心肌病的诊断与治疗研究进展

蒲玲综述 丁国华审校

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81770687)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院肾内科

通信作者: 丁国华, E-mail: ghxding@qq.com

【摘 要】 尿毒症心肌病是慢性肾脏病(CKD)患者死亡的主要原因之一,其产生与血流动力学异常、尿毒症毒素等多种因素综合作用密切相关。左心室肥厚(LVH)是 CKD 患者最常见的心脏改变,一般是预后不良的信号,是 CKD 患者发生心律失常、心肌缺血、心力衰竭,甚至猝死的独立危险因素。目前尿毒症心肌病的发生机制尚未阐明,治疗方法还需进一步研究,文章对尿毒症心肌病的诊断与治疗研究进展进行综述。

【关键词】 尿毒症;心肌病;诊断;治疗

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.020

Research progress in diagnosis and treatment of uremic cardiomyopathy Pu Ling, Ding Guohua. Department of Nephrology, Renmin Hospital, Wuhan University, Hubei Province, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Ding Guohua, E-mail: ghxding@qq.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81770687)

【Abstract】 Uremic cardiomyopathy is one of the main causes of death in patients with chronic kidney disease (CKD), which is closely related to hemodynamic abnormalities, uremic toxins and other factors. Left ventricular hypertrophy (LVH) is the most common cardiac change in CKD patients, which is generally a signal of poor prognosis. It is an independent risk factor for arrhythmia, myocardial ischemia, heart failure and even sudden death in CKD patients. At present, the pathogenesis of uremic cardiomyopathy has not been clarified, and the treatment method needs further study. This paper reviews the research progress of diagnosis and treatment of uremic cardiomyopathy.

【Key words】 Uremia; Cardiomyopathy; Diagnosis; Treatment

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的主要并发症之一,也是患者死亡的主要原因^[1]。具体包括高血压、尿毒症心肌病、心力衰竭、动脉粥样硬化、心包疾病及毛细血管密度降低等,其中尿毒症心肌病是 CKD 患者除血管钙化外 CVD 病死率高的主要原因^[2]。尿毒症心肌病是在慢性肾衰竭基础上因血压升高、容量负荷过重及内毒素影响下机体内环境紊乱出现的心肌病变,其病理特点主要表现为心肌细胞肥大变性、心肌间质纤维化、心室重塑,最终导致心脏左室肥厚(LVH)、心脏功能失调,发生心力衰竭及心律失常^[3]。目前尿毒症心肌病的发病机制尚未阐明,国内外公认的发病机制主要有高血压与容量负荷加重、肾性贫血、继发性甲状旁腺功能亢进、尿毒症毒素、RAAS 系统激活等,此外还有动脉硬化导致的心肌缺血、营养物质丢失(特别是左卡尼汀和蛋白质)、血清成纤维细胞生长因

子 23(FGF23)水平升高和可溶性 Klotho 血清水平降低及胰岛素抵抗等^[4-5]。目前尿毒症心肌病检查手段有限,治疗方案还在持续更新,因此对尿毒症心肌病的诊断与治疗研究进展作一综述。

1 检查方法与诊断

1.1 实验室检查 除了有尿毒症患者普遍存在的肌酐、尿素氮、肾素、血管紧张素、血脂等指标增高和血红蛋白、血清白蛋白及肌酐清除率降低的特点外,尿毒症心肌病还有目前国内外均有报道的脑钠肽、内皮素、肌红蛋白、肌钙蛋白等增高,并且有研究认为肌钙蛋白 I 可能是无症状透析患者心血管事件有价值的预测标志物^[6]。众所周知,诊断尿毒症心肌病的金标准是心肌组织活检,可直观观察心肌细胞、心脏组织的变化情况,其中发现局灶性淀粉样变性可高度提示尿毒症心肌病,但由于是有创性操作,风险较大,患者常不易接受活检而未在临床上广泛应用。

1.2 心电图 心电图经济而简单的特点使其成为临床上应用最广泛的观察心律失常与心肌损害的工具之一。尿毒症心肌病患者的心电图改变主要表现为左室高电压、部分导联 ST-T 改变、左室肥厚及不同类型的心律失常,并不是特征性改变,作为诊断工具的特异性较低,故常将其作为常规辅助检查。

1.3 心脏彩色超声 与心电图相比,心脏彩色超声同样具有经济、简便的特点,而超声心动图能直观、准确、无创且动态地观察心脏的大小、结构,测量心室壁厚度,评估心脏功能,且可早期及时地发现心脏病变,进行追踪及动态观察,多表现为左心增大、左室肥厚、主动脉增宽、射血分数和心排出量减少、心包积液,可为临床筛查与诊断尿毒症心肌病提供可靠的依据^[7]。

1.4 心脏磁共振显像检查 心脏磁共振是一项比较新的检查技术,其准确度较高、成像清晰,已得到学术界的普遍认可,但未在临床上广泛应用。心脏磁共振除了能对心脏的结构与功能进行准确分析,还能显示心肌组织的特征学信息,对尿毒症心肌病的病理生理机制探索、病情评估、预后及疗效评估等方面有重要临床意义^[8-10]。钆对比剂延迟增强技术可以通过静脉注射细胞外间隙对比剂 Gd-DTPA 使病变心肌表现出与邻近正常心肌明显差异的高信号,识别慢性肾衰竭患者心血管疾病的亚型,具体表现为心内膜下延迟强化和弥漫性延迟强化,为深入探索尿毒症心肌病的病理生理机制提供了新的方法^[11-12]。T1 mapping 可以测量组织纵向弛豫时间(T1 值),在许多心脏疾病的诊断、预后和疗效评估等方面有类似生物标志物的效果,虽然目前研究较少,但 T1 mapping 在尿毒症心肌病中应用前景仍然十分广阔^[13]。细胞外容积成像是 T1 mapping 基础上衍生出的一种后处理技术,能够发现心肌纤维化,并能进行精确定量评估^[14]。此外,磁共振成像技术能评估心包改变及测量心外膜脂肪容量,磁共振波谱能评估心肌代谢情况,T2 mapping 具有潜在识别肥厚性心肌病患者未来心血管事件较高风险的能力^[8,15]。应变编码磁共振是一种无需注射造影剂就能早期、准确地检测各种心肌病的技术,有利于在疾病早期开始心脏相关治疗^[16]。

1.5 诊断依据 尿毒症心肌病的特点是 CKD 发生后再出现心肌损害,主要诊断依据:(1)肾脏病病史;(2)有肾功能衰竭和心血管系统的症状和体征;(3)辅助检查:①尿毒症患者常见异常指标,以及脑钠肽、肌红蛋白、肌钙蛋白增高;②心电图检查有左室肥厚、心律失常、ST-T 改变等;③心脏超声提示左室肥厚、左心增大、射血分数和心输出量减少等;④若行心脏磁共振检

查可表现为心腔增大、室壁运动异常、心肌纤维化及心内膜下延迟强化和弥漫性延迟强化等特点。

2 治疗

2.1 肾脏替代治疗 中分子和大分子毒素在体内蓄积是 CKD 患者发生心血管事件的主要因素之一,因此清除尿毒症毒素是改善尿毒症患者心脏功能的主要目的。肾脏替代治疗有 3 种,包括肾移植、血液透析和腹膜透析。(1)肾移植:是治疗尿毒症最有效的方法,可以清除尿毒症毒素,纠正贫血、高血压等并发症,改善左室功能和结构^[17-18]。有研究表明,单纯肾移植能解决继发于 CKD 心肌病患儿的心脏功能障碍^[19]。但是肾移植术后,患者需要长期服用糖皮质激素及环孢素等免疫抑制剂,可增加患者的感染风险。(2)血液透析:不同类型的透析治疗均可通过交换机制直接清除部分尿毒症毒素、纠正电解质酸碱平衡紊乱及改善心脏功能。血液透析是比较传统的方式,利用超滤和半透膜的弥散作用清除小分子毒素,但清除中分子和大分子类毒素作用较差。血液透析滤过相比于传统血液透析能更高效地清除毒素,此外其对流作用有利于清除中分子和大分子毒素。血浆置换则是通过吸附作用清除毒素,对患者的食欲下降、恶心呕吐和皮肤瘙痒等症状均有改善。有研究表明,血液透析滤过和血液透析联合血液灌流对中大分子类和蛋白质结合类毒素的清除效果更好^[20]。因此,对于接受维持性血液透析治疗的尿毒症患者在进行传统的血液透析治疗同时,应间断接受血液透析滤过或联合血液灌流治疗,提高中分子和大分子毒素清除率。(3)腹膜透析:是一种利用患者自身腹膜作为透析膜的透析方式,其相对于血液透析更廉价、更方便、社会回归率更高、对血流动力学影响更小,受到许多患者的青睐。但腹膜透析患者常出现腹膜炎、透析不充分、腹透管堵塞等而终止腹膜透析转为血液透析。此外,腹膜透析对高钾血症、急性心力衰竭等紧急并发症的治疗效果较血液透析差。因此,对于伴有不同并发症的 CKD 患者应尽早采用合适的肾脏替代治疗方案,或者采取联合治疗方案,尽可能改善患者急性症状与中远期并发症,降低心血管事件的发生,改善患者的生存质量,延长患者生命。

2.2 改善营养不良状态 CKD 患者大多存在不同程度的贫血与低蛋白血症,纠正贫血与低白蛋白血症可以改善尿毒症心肌病症状。紧急情况下输注浓缩红细胞、促红细胞生成素、铁剂、维生素 B₁₂ 及叶酸等可有效纠正贫血。有研究表明,促红细胞生成素不仅能通过纠正贫血来降低心率与增加心输出量而达到改善心功能、部分逆转左心室肥厚的作用,此外促红细胞生成素

还有减少氧自由基产生的作用,能增强心肌细胞对缺血缺氧环境的耐受性,从而达到减少心肌损害和心血管事件的作用^[21]。对于 CKD 患者应给予优质蛋白饮食,严重低蛋白血症患者可酌情考虑静脉输注人血白蛋白,以保证足量蛋白质的摄入,保障机体正常生命活动需要。

2.3 合理控制血压 CKD 患者的血压原则上应控制在 130/80 mmHg 以下,目前临床上常用的降压药包括血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)、钙通道拮抗剂、 β 受体阻滞剂、利尿剂、血管扩张剂等。对于合并蛋白尿的 CKD 患者,ACEI 类/ARB 类降压药常作为首选。有研究表明,大剂量依那普利治疗可逆转实验性尿毒症心肌病的心肌纤维化^[22]。在 CKD 患者中,长期使用 ACEI 或联合治疗后有左心室肥厚减轻现象^[23]。钙通道阻滞剂能明显减少 CKD 患者心力衰竭和卒中的发生率,改善患者的预后^[24]。使用 β 受体阻滞剂可治疗透析患者的左心室肥厚或有症状的心力衰竭,其首选药物为卡维地洛^[25]。

2.4 内皮素受体拮抗剂 内皮素是主要由血管内皮产生的具有很强收缩肾脏血管作用的物质。与 CKD 的发生与发展有非常密切的联系。内皮素对肾脏功能的影响主要表现为促使尿钠排泄增加、减少肾血流、降低肾小球滤过率和促进肾间质纤维化等。异常增高的内皮素能减少肾血流量,降低肾小球滤过率,加重高血压和蛋白尿,加速 CKD 的进展,故内皮素受体拮抗剂可抑制内皮素的收缩血管作用,改善肾脏血流动力学,降低血压,减少蛋白尿,延缓 CKD 的发展进程,内皮素受体拮抗剂与血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂联用能更好地保护肾脏功能^[26]。

2.5 营养心肌细胞治疗 目前营养心肌细胞的药物改善心肌能量代谢受到广泛关注,其中的代表药为曲美他嗪。有研究表明,曲美他嗪可通过阻断脂肪酸氧化促使机体增加对葡萄糖的摄取利用,优化心肌能量代谢,抑制炎症反应,从而改善心肌纤维化、减少心脏重构^[27]。

2.6 纠正钙磷代谢紊乱与降低血甲状旁腺激素(PTH) 在透析治疗的基础上,减少含磷较高的食物摄入,补充钙盐,同时配合使用维生素 D,可降低尿毒症患者的血磷浓度,升高血钙浓度,反馈性调节 PTH 分泌降低,从而减少钙盐在心血管沉积,达到防治心血管钙化与心肌纤维化、改善心功能的作用。

2.7 中医中药治疗 尿毒症心肌病在我国中医理论中属于“脱症”“厥症”等范畴,治疗上应予以活血、益

气生血治疗,常用的中药有当归、黄芪、补骨脂、炒白术、熟地黄、川芎、鸡血藤等^[28]。临床上常用的中药注射剂有丹参注射液、黄芪注射液、生麦注射液等;此外肾炎康复片、肾衰宁、白令胶囊、黄葵胶囊等口服药物也应用非常广泛。这些药物主要通过改善循环、护肾排毒来改善血液循环、促进肾脏微循环、减少尿毒症毒素蓄积。

2.8 Klotho 基因治疗 随着对肾脏病发病机制与病理生理学特点的深入研究,Klotho 基因逐渐被更多人认识,它是在肾脏中高表达的一种抗衰老基因,目前发现 Klotho 家族成员包括 α -Klotho、 β -Klotho 及 γ -Klotho 3 种蛋白。Klotho 基因编码的蛋白具有的生物学作用多种多样,主要包括抗氧化应激、抗细胞凋亡、抗炎性反应、抗纤维化及抗肿瘤等^[29]。CKD 是 α -Klotho 缺乏的状态,对包括心血管系统在内的许多器官发挥着负性作用。许多研究均发现,Klotho 蛋白是糖尿病肾病血管钙化的保护因素,Klotho 基因缺乏可加重血管钙化,而 Klotho 基因过表达则可改善血管病变,其作用可能主要通过 Klotho 基因过表达抑制血管平滑肌细胞对磷的吸收,减少平滑肌细胞向成骨细胞转化,从而减轻心血管钙化程度^[30-31]。此外,Klotho 还与血管内皮功能紊乱有关,是一种血管保护蛋白,可能机制是通过调节血管内皮生长因子的表达,维持血管内皮的生理结构稳定,降低炎症反应及拮抗蛋白酶的活性等^[29]。目前已有研究报道,外源性补充 Klotho 可以改善尿毒症小鼠的心血管钙化与左心室肥厚^[32-33]。这些研究无疑为尿毒症心肌病的治疗方法提供了新的线索。随着医学生物信息技术与基因检测技术的不断发展,医学已进入基因诊断阶段,并即将进入基因治疗时代。针对尿毒症心肌病的 Klotho 基因缺陷可尝试基因治疗方式,但具体治疗方法还需要进一步深入研究。

2.9 其他 大麻素受体 1 型(CB1R)在尿毒症心肌病的心肌肥大和纤维化等病理变化的发展中起着重要的作用,在 CKD 小鼠模型中阻断 CB1R 可减弱左心室肥厚和 Akt 介导的心肌纤维化,因此,开发靶向 CB1R 的药物可能是治疗尿毒症心肌病的潜在有效方法^[34]。维生素 D 受体激活剂,特别是帕里骨化醇,通过调节 miR-29b 与 miR-30c 减弱心肌纤维化,改善左心室肥厚^[35]。此外,靶向由 Na^+/K^+ -ATP 酶信号传导功能介导的 ROS 扩增环可为尿毒症心肌病及相关疾病提供新的治疗靶标^[36]。有研究发现,用 pNaKtide 抑制 Na^+/K^+ -ATP 酶氧化剂扩增和用钴原卟啉(CoPP)诱导血红素加氧酶-1(HO-1)显著减弱了尿毒症心肌病表型特征的发展^[37]。

3 小结

心血管并发症是维持性透析患者高住院率和高病死率的主要原因,其中尿毒症心肌病是终末期肾病患者的主要并发症之一。尿毒症心肌病发病机制复杂,缺乏典型症状与体征,辅助检查缺乏典型特征,缺乏针对性治疗方案。同时,尿毒症心肌病的相关研究正在不断开展,需深入研究尿毒症心肌病的发病机制,以寻求更有效的治疗方法,降低尿毒症患者的住院率与病死率,改善患者的生存质量。

参考文献

- [1] Briet M, Boutouyrie P, Laurent S, et al. Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD[J]. *Kidney International*, 2012, 82(4):388-400. DOI: 10.1038/ki.2012.131.
- [2] Edwards Nicola C, Moody William E, Chue Colin D, et al. Defining the natural history of uremic cardiomyopathy in chronic kidney disease: the role of cardiovascular magnetic resonance[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2014, 7(7):703-714. DOI: 10.1016/j.jcmg.2013.09.025.
- [3] Semple D, Smith K, Bhandari S, et al. Uremic cardiomyopathy and insulin resistance: A critical role for akt[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 22(2):207-215. DOI: 10.1681/ASN.2009090900.
- [4] Grabner A, Faul C. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2016, 25(4):314-324. DOI: 10.1097/MNH.000000000000231.
- [5] Semple DJ, Bhandari S, Seymour AML. Uremic cardiomyopathy is characterized by loss of the cardioprotective effects of insulin[J]. *AJP: Renal Physiology*, 2012, 303(9):F1275-F1286. DOI: 10.1152/ajprenal.00048.2012.
- [6] Dionísio LM, Luvizoto MJ, Gribner C, et al. Biomarkers of cardio-renal syndrome in uremic myocardiopathy animal model[J]. *Brazilian Journal of Nephrology*, 2018, 40(2):105-111. DOI: 10.1590/2175-8239-jbn-3878.
- [7] 李燕, 刘自鹏. 超声心动图在筛查与诊断尿毒症心肌病中的应用研究[J]. *西南国防医药*, 2016, 26(8):857-859. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2016.08.011.
- [8] 崔亚东, 张旻, 陈敏. 心脏磁共振在尿毒症性心肌病中的应用进展[J]. *放射学实践*, 2018, 33(5):98-102. DOI: 10.13609/j.cnki.1000-0313.2018.05.020.
- [9] Abdurrachim D, Prompers JJ. Evaluation of cardiac energetics by non-invasive ³¹P magnetic resonance spectroscopy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5ptB):1939-1948. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.11.013.
- [10] Sanaani A, Fuisz A. Cardiac Magnetic resonance for diagnosis and risk stratification[J]. *Cardiol Clin*, 2019, 37:27-33. DOI: 10.1016/j.ccl.2018.08.002.
- [11] Burt JR, Zimmerman SL, Kamel IR, et al. Myocardial T1 mapping: techniques and potential applications[J]. *RadioGraphics*, 2014, 34(2):377-395. DOI: 10.1148/rg.342125121.
- [12] Edwards NC, Moody WE, Chue CD, et al. Defining the natural history of uremic cardiomyopathy in chronic kidney disease: the role of cardiovascular magnetic resonance[J]. *JACC Cardiovascular Imaging*, 2014, 7(7):703-714. DOI: 10.1016/j.jcmg.2013.09.025.
- [13] Shah RV, Kato S, Roujol S, et al. Native Myocardial T1 as a Biomarker of Cardiac Structure in Non-Ischemic Cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 2016, 117(2):282-288. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.10.046.
- [14] Moon JC, Messroghli DR, Kellman P, et al. Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: A Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR working group of the European society of cardiology consensus statement[J]. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2013, 15(1):92. DOI: 10.1186/1532-429X-15-92.
- [15] Gastl M, Gotschy A, von Spiczak J, et al. Cardiovascular magnetic resonance T2* mapping for structural alterations in hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Eur J Radiol Open*, 2019, 6:78-84. DOI: 10.1016/j.ejro.2019.01.007.
- [16] Korosoglou G, Giusca S, Hofmann NP, et al. Strain-encoded magnetic resonance: a method for the assessment of myocardial deformation[J]. *ESC Heart Failure*, 2019, 6(4):584-602. DOI: 10.1002/ehf2.12442.
- [17] Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation[J]. *Transplant International*, 2015, 28(1):10-21. DOI: 10.1111/tri.12413.
- [18] Zapolski T, Furmaga J, Wysockiński AP, et al. The atrial uremic cardiomyopathy regression in patients after kidney transplantation-the prospective echocardiographic study[J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1):152. DOI: 10.1186/s12882-019-1333-y.
- [19] Riar SK, Mitsnefes MM, Nehus EJ, et al. Kidney transplantation in children with decreased left ventricular systolic function: a Midwest Pediatric Nephrology Consortium study[J]. *Pediatric Nephrology*, 2015, 30(8):1343-1348. DOI: 10.1007/s00467-015-3066-x.
- [20] 段胜东. 不同血液透析方法对维持性透析患者尿毒症毒素清除效果及营养状态的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2015, 19(19):26-29. DOI: 10.7619/jcmp.201519008.
- [21] Aydin M, Hakan N, Deveci U, et al. Comment on the paper entitled erythropoietin ameliorates oxidative stress and tissue injury following renal ischemia/reperfusion in rat kidney and lung[J]. *Medical Principles and Practice*, 2014, 23(5):485. DOI: 10.1159/000362338.
- [22] Tyralla K, Adamczak M, Benz K, et al. High-dose enalapril treatment reverses myocardial fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e15287. DOI: 10.1371/journal.pone.0015287.
- [23] Hampl H, Hennig L, Rosenberger C, et al. Effects of optimized heart failure therapy and anemia correction with Epoetin β on left ventricular mass in hemodialysis patients[J]. *American Journal of Nephrology*, 2005, 25(3):211-220. DOI: 10.1159/000085881.
- [24] 王伟铭, 徐丽梨. 钙离子拮抗剂类降压药在肾脏病中的合理应用[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2014, (5):251-254. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3216.2014.05.006.
- [25] 戴黎, 周祖莲. β -受体阻滞剂在终末期肾脏病患者的应用推荐

- [J]. 科学咨询:科技·管理, 2018(40):64-65. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4822. 2018. 40. 052.
- [26] Tobe S, Kohan DE, Singarayer R. Endothelin Receptor Antagonists: New Hope for Renal Protection [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2015, 17(7): 57. DOI: 10. 1007/s11906-015-0568-7.
- [27] 张莹, 史大卓. 曲美他嗪优化心肌代谢的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(13): 2313-2316. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2015. 13. 004.
- [28] 王学敏, 袁彬. 当归补血汤联合可调节曲线透析对尿毒症心脏病患者效果的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(75): 185, 190. DOI: CNKI:SUN:WMIA.O. 2018-75-138.
- [29] 武晓碧, 汪晓霞, 张希尧, 等. Klotho 蛋白在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(11): 184-187. DOI: 10. 13241/j. pmb. 2017. 11. 046.
- [30] Hum JM, Obryan LM, Tatiparthi AK, et al. Chronic hyperphosphatemia and vascular calcification are reduced by stable delivery of soluble klotho[J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2017, 28(4): 1162-1174. DOI: 10. 1681/ASN. 2015111266.
- [31] 丁浩, 危志强, 印荻, 等. Klotho 蛋白在慢性肾脏病中的作用研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(9): 1690-1695. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2017. 09. 006.
- [32] Yang K, Wang C, Nie L, et al. Klotho protects against indoxyl sulphate-Induced myocardial hypertrophy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10): 2434-2446. DOI: 10. 1681/ASN. 2014060543.
- [33] Hu MC, Shi M, Gillings N, et al. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy [J]. *Kidney International*, 2017, 91(5): 1104-1114. DOI: 10. 1016/j. kint. 2016. 10. 034.
- [34] Lin CY, Hsu YJ, Hsu SC, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonist attenuates left ventricular hypertrophy and Akt-mediated cardiac fibrosis in experimental uremia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 85: 249-261. DOI: 10. 1016/j. yjmcc. 2015. 06. 010.
- [35] Panizo S, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, et al. Regulation of miR-29b and miR-30c by vitamin D receptor activators contributes to attenuate uraemia-induced cardiac fibrosis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(11): 1831-1840. DOI: 10. 1093/ndt/gfx060.
- [36] Wang X, Liu J, Drummond CA, et al. Sodium potassium adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) as a therapeutic target for uremic cardiomyopathy [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2017, 21(5): 531-541. DOI: 10. 1080/14728222. 2017. 1311864.
- [37] Liu J, Tian J, Chaudhry M, et al. Attenuation of Na^+/K^+ -ATPase Mediated Oxidant Amplification with pNaKtide Ameliorates Experimental Uremic Cardiomyopathy [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34592. DOI: 10. 1038/srep34592.

(收稿日期: 2018-08-21)

(上接 301 页)

参考文献

- [1] Zheng R, Xie S, Lu X, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiology and Clinical Manifestations of Human Brucellosis in China [J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018: 5712920. DOI: 10. 1155/2018/5712920.
- [2] 噬血细胞综合征中国专家联盟. 噬血细胞综合征诊治中国专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(2): 91-95. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2018. 02. 004.
- [3] Akdeniz H, Irmak H, Anlar O, et al. Central nervous system brucellosis: presentation, diagnosis and treatment [J]. *J Infect*, 1998, 36(3): 297-301. DOI: 10. 1016/S0163-4453(98)94279-7.
- [4] Gul HC, Erdem H, Bek S. Overview of neurobrucellosis: a pooled analysis of 187 cases [J]. *International Journal of Infectious Diseases Ijidd Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2009, 13(6): 339-343. DOI: 10. 1016 / j. ijid. 2009. 02. 015.
- [5] 王心慧, 韩艺华, 厉婷, 等. 以痉挛性截瘫和听力改变为主要表现的神经型布氏菌病 2 例报告并文献复习 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(1): 73-75. DOI: 1003-2754(2015)01-0073-03.
- [6] 任彩云, 张哲林, 殷旭华, 等. 神经型布氏杆菌病周围神经损害的临床与电生理研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(5): 279-283. DOI: 10. 3969 / j. issn. 1002-0152. 2017. 05. 005.
- [7] 贾宇, 矫黎东, 王玉平, 等. 以渐进性视力下降为主要表现的神经型布氏杆菌病 1 例报道并文献复习 [J]. 疑难病杂志, 2018, 17(12): 1384-1386. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2018. 12. 020.
- [8] 许莉, 牛松涛. 神经系统布氏杆菌病研究现状 [J]. 中华神经科杂志, 2009, 42(10): 706-708. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1006-7876. 2009. 10. 015.
- [9] Ko J, Splitter A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(1): 65-78. DOI: 10. 1128/CMR. 16. 1. 65-78. 2003.
- [10] 杨昱, 高纪称. 神经型布氏杆菌病临床特点及其治疗 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14(21): 3254-3256. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 21. 051.
- [11] 李燕, 杨宇, 杨光, 等. 以脊髓病变为主症的神经型布氏杆菌病 3 例病例分析 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(12): 1112-1114. DOI: 1003-2754(2017)12-1112-03.

(收稿日期: 2019-07-23)

循环 miRNA 作为癫痫诊断潜在生物标志物的研究进展

赵海燕, 黄颖综述 李永男 审核

基金项目: 黑龙江省卫生计生委科研课题(2018128); 哈尔滨医科大学附属第四医院特别资助项目(HYDSYTB201910)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科

通信作者: 李永男, E-mail: yongnanli818@aliyun.com

【摘 要】 癫痫是一种常见的慢性神经系统疾病, 由于其病因及临床表现的复杂性和异质性, 成为最难诊疗的疾病之一。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 在癫痫患者和癫痫动物模型中发现差异性表达的 miRNAs, 并且可以在循环中检测到 miRNAs 的表达变化, 这为癫痫的精准诊治提供了新的思路 and 方向。文章总结了癫痫患者或癫痫动物模型中差异性表达的循环 miRNAs, 并对可能作为癫痫诊断潜在生物标志物和治疗靶点进行综述。

【关键词】 微小 RNA; 癫痫; 诊断; 生物标志物

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.021

Research progress of circulating miRNA as potential biomarker for epilepsy diagnosis Zhao Haiyan, Huang Ying, Li Yongnan. Department of Neurology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang Province, Harbin 150001, China

Corresponding author: Li Yongnan, E-mail: yongnanli818@aliyun.com

Fund program: Scientific Research Project of Heilongjiang Health and Family Planning Commission (2018128); Special Support Project of the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University (HYDSYTB201910)

【Abstract】 Epilepsy is a common chronic nervous system disease. Because of the complexity and heterogeneity of its etiology and clinical manifestations, it has become one of the most difficult diseases to diagnose and treat. In recent years, with the development of molecular biology technology, miRNAs with different expression are found in epilepsy patients and animal models, and the expression changes of miRNAs can be detected in the circulation, which provides a new idea and direction for the accurate diagnosis and treatment of epilepsy. This paper summarizes the circulating miRNAs differentially expressed in epileptic patients or animal models, and reviews the potential biomarkers and therapeutic targets for epilepsy diagnosis.

【Key words】 miRNA; Epilepsy; Diagnosis; Biomarkers

癫痫是一种常见的危害性极大并且发病机制尚不明确的慢性神经系统疾病, 其特征是不可预测性的癫痫发作。由于其致残率高、临床反复发作和病程漫长, 严重影响患者的身心健康并且给社会带来经济负担。近年来, 通过对循环 miRNA 表达谱的研究, 在癫痫患者和癫痫动物模型中已确定存在 100 多种不同 miRNAs 的表达变化, 并有证据表明癫痫与循环 miRNAs 表达变化有关。本文就癫痫患者或癫痫动物模型中差异性表达的循环 miRNA 及其与癫痫的相关性进行综述。

1 癫痫诊疗现状

全世界癫痫患者有 6 500 万人, 约占世界人口的 1% ~ 2%^[1-2]。目前, 其诊断主要依赖于病史和临床辅助检查^[3], 而辅助检查中除在癫痫监测单元中进行长

时程动态脑电图外, 其他类型的脑电图检测率有限, 许多癫痫患者的脑部影像学检查为阴性^[4]。目前, 大部分癫痫患者经过正规的抗癫痫药物治疗可有效控制, 但仍有部分患者不能完全控制, 其主要因素之一是癫痫病因的复杂性及异质性。随着 2015 年精准医学概念的提出, 越来越多的学者开始关注如何能做到疾病的精确诊断和靶向治疗。因此, 找出有效的生物标志物将有助于对癫痫作出快速正确的诊断和分类, 同时为开发癫痫靶向药物治疗提供理论基础。

2 循环 miRNA 作为癫痫潜在生物标志物

2.1 循环 miRNA MicroRNA(miRNA)是内源性 18 ~ 23 个碱基的小片段非编码 RNA, 作为基因表达的转录后调节因子, 主要通过与其靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区结合, 使目标 mRNA 降解或抑制其翻译, 从而实现

转录后水平调控基因表达,参与调控个体发育、细胞增殖及分化、细胞死亡、代谢等生物学过程,在基本生命活动中发挥重要作用^[5]。存在于血液、尿液、唾液、精液、泪液、乳汁及羊水等体液中的一类 miRNA 统称为循环 miRNA^[6]。近年来,循环 miRNA 因其具有稳定、易检测、经济及无创等特点而备受关注,已成为许多疾病的新型诊断工具^[7]。

2.2 循环 miRNA 作为癫痫潜在生物标志物 在脑组织中,特定细胞类型表达特定的 miRNA,这些 miRNA 是维持其生理特性和细胞骨架所必需的。已发现 miRNA 在神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞中富集或独特表达^[8-9]。合成 miRNA 关键酶的缺失可导致脑组织结构和功能上的巨大变化,从而导致神经变性和反复痫性发作(即癫痫)的发生,即使一种 miRNA 的缺失也足以产生明显的中枢神经系统疾病表型^[10]。研究发现,在癫痫患者脑组织和癫痫动物模型中发生 miRNA 表达变化,并且这些变化也可以在循环中检测到^[11]。这些研究结果为在 miRNA 水平对癫痫的诊断和治疗开辟了新的途径,也为癫痫患者的靶向治疗带来新的希望。目前,对癫痫相关 miRNA 的研究主要是对差异性表达的循环 miRNA 进行筛选。然而,这些差异性表达的循环 miRNA 在癫痫的发生和发展的机制尚不十分明确。

3 循环 miRNAs 表达与癫痫的相关性研究

3.1 miR-134 研究表明,miR-134 在大脑中丰富表达,可定位于神经元树突,并负向调节树突棘的大小^[12]。Avansini 等^[13]通过对颞叶内侧癫痫(mesial temporal lobe epilepsy, MTLE)14 例、局灶性皮质发育不良(focal cortical dysplasia, FCD)13 例和正常对照 16 例的血浆 miRNA 进行高通量测序分析发现,与正常对照组相比,hsa-miR-134 在 MTLE 患者血浆中显著下调,而在 FCD 患者血浆中没有下调。为了进一步评估 hsa-miR-134 作为 MTLE 生物标志物的稳定性,应用实时定量 PCR 法验证了 65 例 MTLE 患者和 83 例对照组的独立队列证实,与对照组相比,MTLE 患者血浆中 hsa-miR-134 显著下调。因此,hsa-miR-134 的表达下调或是 MTLE 一种潜在的非侵入性生物标志物。最近的研究表明^[14],通过侧脑室注入红藻氨酸(kainic acid, KA)诱导的癫痫持续状态(status epilepticus, SE)大鼠模型中,miR-134 的表达在大鼠海马中显著上调。而应用 miR-134 拮抗剂后,不仅减少癫痫发作,并且抑制癫痫损伤所诱导的内质网应激和凋亡相关的 CHOP、Bim 和细胞色素 C 的表达,还促进海马中环腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element

binding protein, CREB)的表达。TUNEL 和 Nissl 染色分析亦显示,沉默 miR-134 的表达,可抑制癫痫所诱导的海马 CA3 区锥体神经元凋亡及苔藓纤维的异常发芽。在戊四唑(pentylenetetrazol, PTZ)癫痫模型、穿孔途径刺激(perforant pathway stimulation, PPS)癫痫模型等多种颞叶癫痫模型中,沉默 miR-134 均可起到有效的抗癫痫作用^[15-17]。这些研究结果表明,miR-134 可能是有效的颞叶癫痫诊断标志物,而抑制其表达是治疗颞叶癫痫的干预措施。

3.2 miR-301a-3p Wang 等^[18]使用 Illumina HiSeq 2000 测序发现,30 例耐药性患者和 30 例非耐药性癫痫患者之间血清 miRNA 存在差异性表达。然后,通过实时定量 PCR 法在 77 例耐药性癫痫患者、81 例非耐药性癫痫患者和 85 例健康对照者中验证所选择的 miRNA。发现与非耐药性癫痫组和健康对照组相比,耐药性癫痫组血清 miR-194-5p、miR-301a-3p、miR-30b-5p、miR-342-5p 和 miR-4446-3p 表达显著下调。其中,miR-301a-3p 是鉴别耐药性癫痫和非耐药性最有价值的生物标志物。多元回归分析显示,miR-301a 是耐药癫痫诊断的潜在生物标志物,其敏感度为 80.5%,特异度为 81.2%,且其表达水平下调与癫痫发作的严重程度呈负相关。这一结果表明,血清 miR-301a-3p 或成为耐药性癫痫诊断的潜在生物标志物。

3.3 miR-106b 及 miR-146a Wang 等^[19]使用 Illumina HiSeq2000 测序筛选 30 例癫痫患者和 30 例健康对照组血清中差异性表达的 miRNAs。然后,通过实时定量 PCR 对 117 例癫痫患者和 112 例健康对照者中进行验证。发现与对照组相比,癫痫患者血清 miR-7d-5p、miR-106b-5p、miR-130a-3p 和 miR-146a-5p 表达上调,而 miR-15a-5p 和 miR-194-5p 表达下调。其中,miR-106b-5p 对癫痫的诊断价值最高,其敏感度为 80.3%,特异度为 81.2%。这一结果提示,miR-106b-5p 可作为癫痫新的无创性诊断生物标志物。An 等^[20]招募了 90 例癫痫患者(其中,57 例为全身性癫痫发作,33 例为局灶性癫痫发作)和 90 例健康对照者,通过 PCR 方法检测了癫痫患者和对照组血清中 4 种与癫痫相关 miRNAs,即 miR-106b、miR-146a、miR-194-5p 和 miR-301a 的表达水平。发现与对照组相比,癫痫组血清 miR-106b、miR-146a 和 miR-301a 显著上调,而 miR-194-5p 显著下调。进一步研究发现,血清 miR-106b 和 miR-146a 的表达上调水平与癫痫发作严重程度呈正相关,且在血清中两者联合检测对癫痫的预测具有更好的敏感度和特异度。这些研究表明,血清 miR-106b 及 miR-146a 可以作为诊断癫痫和评估其严

重程度的潜在生物标志物。

3.4 miR-129-2-3p Sun 等^[21]研究难治性颞叶癫痫(temporal lobe epilepsy, TLE)患者的颞叶皮质组织与血浆中所表达 miRNA 的相关性,首先,在手术中切除致痫灶的 9 例难治性 TLE 患者的颞叶皮质和 8 例因高血压颞叶出血而行脑出血清创术所获得的颞叶皮质中,使用 Affymetrix miRNA 4.0 微阵列法筛选出差异性表达的 miRNAs;然后,应用实时定量 PCR 方法,在 13 例难治性 TLE 患者(包括 9 例用于微阵列筛选的患者)和 13 例无癫痫发作史及抗癫痫药物接触史的对照者(高血压颞叶出血而行脑出血清创术的患者作对照)的颞叶皮质脑组织中验证所选的差异性表达 miRNAs;最后,再通过实时定量 PCR 检测来自 25 例难治性 TLE 患者和 25 例对照者血浆样品中所选 miRNAs 的表达水平。结果显示,miR-129-2-3p 在难治性 TLE 患者的颞叶皮质组织和血浆中均表达上调,且随癫痫发作频率的增加,血浆中 miRNA-129-2-3p 的表达水平也上调,癫痫患者的预后亦差。因此,血浆 miRNA-129-2-3p 或作为潜在的非侵入性生物标志物,可用于难治性 TLE 的早期检测和临床预后评估。

3.5 miR-145 研究表明,在 SH-SY5Y 细胞水平 miR-145 表达增高,可诱导 BCL2 相互作用蛋白 3(Bnip3)的转录和表达,引起 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达增多,进而线粒体自噬受抑制,最终导致 SH-SY5Y 细胞凋亡^[22]。Shen 等^[23]通过实时定量 PCR 分析,40 例难治性颞叶癫痫患者和 42 例健康对照者血浆中的 miR-145-5p 表达水平,发现 miR-145-5p 在难治性颞叶癫痫患者血浆中的表达明显下调,而且其表达的降低程度与癫痫患者的发病年龄、癫痫发作频率呈正相关。此项研究表明,血浆 miR-145-5p 可作为难治性颞叶癫痫早期检测和临床评估的潜在非侵入性生物标志物。

3.6 miR-141 近年来,由于 miR-141 家族具有诱导神经肿瘤细胞凋亡的特点,而作为抑癌基因受广泛关注^[24]。在许多癌症中,miR-141 的表达水平下调,影响肿瘤细胞凋亡、衰老、增殖和浸润^[25]。Liu 等^[26]通过微阵列分析和实时定量 PCR 方法,检测皮下注射 KA 制作的 SE 小鼠模型血清中 miR-141 表达水平,发现与正常对照组相比,SE 组小鼠血清中 miR-141 显著上调。在体外细胞癫痫模型中显示,过表达的 miR-141 可促进 caspase-3、caspase-9、Bax 及 p53 蛋白表达和降低细胞沉默调节蛋白 1(silent information regulator 1, SIRT1)的表达,并诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖;而应用 miR-141 拮抗剂则引起与此相反的效果。这一研究结果表明,通过对 miR-141 在癫痫动物模型中表达

水平的变化及其所诱导细胞凋亡通路的进一步探索,血清 miR-141 或作为癫痫诊断和治疗的生物标志物。

3.7 miR-30a 为了探究癫痫患者在癫痫发作期与癫痫发作间期循环 miRNAs 的表达差异,Sun 等对 3 例癫痫患者分别在癫痫发作期和发作间期收集血清用于 miRNAs 表达谱分析。结果显示,与癫痫发作间期相比,在癫痫发作期患者血清中 15 个 miRNA 表达上调,10 个 miRNA 表达下调。然后,在 90 例癫痫患者组成的扩展队列中进行实时定量 PCR 验证,发现与癫痫发作间期相比,癫痫发作期患者血清中 miR-30a、miR-378、miR-106b 和 miR-15a 表达上调。其中,miR-30a 的表达上调水平与发作频率呈正相关,而与癫痫发病的性别、年龄、病史长短无显著相关性^[27]。因此,血清 miR-30a 可有助于预测癫痫发作的预后。

4 小结及展望

到目前为止,对癫痫诊断的辅助检查主要是基于脑电图和影像学检查,然而这些辅助检查的阳性率不高,且费用较昂贵。因此,需要寻找经济实惠、简便易行的新型诊断生物标志物。近年来,通过对循环 miRNA 表达谱的研究,在癫痫患者和癫痫动物模型中已确定存在 100 多种不同 miRNAs 的表达变化,并有证据表明癫痫与循环 miRNAs 表达变化有关。然而,由于游离的循环 miRNA 生成具有高度异质性,且 miRNA 的循环环境中存在 RNA 酶、pH 变化等因素,这在很大程度上限制了其作为生物标志物的潜力。如果 miRNA 被包装在外泌体中,外泌体的膜结构可以有效保护封闭的 miRNA 免受生物体液中存在的 RNA 酶的影响,从而使外泌体中的 miRNA 比游离的循环 miRNA 更可靠。与此同时,外泌体中 miRNA 还可直接反映来源细胞的生理、病理及其功能状态^[28],更有助于癫痫的精准诊断和治疗。通过对外泌体中差异性表达的 miRNA 及其靶基因和相关调控通路的研究,可更好地对癫痫进行诊治。

参考文献

- [1] Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P. Epilepsy: new advances[J]. Lancet (London, England), 2015, 385 (9971): 884-898. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60456-6.
- [2] Egbanya DL, Hussain S, Lai YC, et al. Changes in synaptic AMPA receptor concentration and composition in chronic temporal lobe epilepsy[J]. Molecular and Cellular Neurosciences, 2018, 92: 93-103. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.07.004.
- [3] Walker LE, Janigro D, Heinemann U, et al. WONOEP appraisal: Molecular and cellular biomarkers for epilepsy[J]. Epilepsia, 2016, 57(9): 1354-1362. DOI: 10.1111/epi.13460.
- [4] Muhlhofer W, Tan YL, Mueller SG. MRI-negative temporal lobe epilepsy-What do we know[J]. Epilepsia, 2017, 58(5): 727-742.

- DOI:10.1111/epi.13699.
- [5] Bhaskaran M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease[J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51(4):759-774. DOI:10.1177/0300985813502820.
 - [6] 王晓军, 周殿明. 循环 miRNAs 分析检测方法研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2019, 36(1):72-77. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2019.01.019.
 - [7] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum; a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Research*, 2008, 18(10):997-1006. DOI:10.1038/cr.2008.282.
 - [8] He M, Liu Y, Wang X, et al. Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain[J]. *Neuron*, 2012, 73(1):35-48. DOI:10.1016/j.neuron.2011.11.010.
 - [9] Jovicic A, Roshan R, Moiso N, et al. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2013, 33(12):5127-5137. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0600-12.2013.
 - [10] Fiorenza A, Lopez-Atalaya JP, Rovira V, et al. Blocking miRNA biogenesis in adult forebrain neurons enhances seizure susceptibility, fear memory, and food intake by increasing neuronal responsiveness[J]. *Cerebral Cortex (New York)*, 2016, 26(4):1619-1633. DOI:10.1093/cercor/bhu332.
 - [11] Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility[J]. *The Lancet Neurology*, 2016, 15(13):1368-1376. DOI:10.1016/S1474-4422(16)30246-0.
 - [12] Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. *Nature*, 2006, 439(7074):283-289. DOI:10.1038/nature04367.
 - [13] Avansini SH, de Sousa Lima BP, Secolin R, et al. MicroRNA hsa-miR-134 is a circulating biomarker for mesial temporal lobe epilepsy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0173060. DOI:10.1371/journal.pone.0173060.
 - [14] Gao X, Guo M, Meng D, et al. Silencing microRNA-134 alleviates hippocampal damage and occurrence of spontaneous seizures after intraventricular kainic acid-induced status epilepticus in rats[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13:145. DOI:10.3389/fncel.2019.00145.
 - [15] Wilcox KS, Dixon-Salazar T, Sills GJ, et al. Issues related to development of new antiseizure treatments[J]. *Epilepsia*, 2013, 54(Suppl 4):24-34. DOI:10.1111/epi.12296.
 - [16] Norwood BA, Bumanglag AV, Osculati F, et al. Classic hippocampal sclerosis and hippocampal-onset epilepsy produced by a single "cryptic" episode of focal hippocampal excitation in awake rats[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2010, 518(16):3381-3407. DOI:10.1002/cne.22406.
 - [17] Reschke CR, Silva LF, Norwood BA, et al. Potent anti-seizure effects of locked nucleic acid antagomirs targeting miR-134 in multiple mouse and rat models of epilepsy[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2017, 6:45-56. DOI:10.1016/j.omtn.2016.11.002M.
 - [18] Wang J, Tan L, Tan L, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:10201. DOI:10.1038/srep10201.
 - [19] Wang J, Yu JT, Tan L, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:9522. DOI:10.1038/srep09522.
 - [20] An N, Zhao W, Liu Y, et al. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy[J]. *Epilepsy Research*, 2016, 127:311-316. DOI:10.1016/j.eplesyres.2016.09.019.
 - [21] Sun Y, Wang X, Wang Z, et al. Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA-935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy[J]. *Epilepsy Research*, 2016, 127:276-283. DOI:10.1016/j.eplesyres.2016.09.016.
 - [22] Liu H, Huang H, Li R, et al. Mitophagy protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against the TNF α -induced inflammatory injury: Involvement of microRNA-145 and Bnip3[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 109:957-968. DOI:10.1016/j.biopha.2018.10.123.
 - [23] Shen CH, Zhang YX, Zheng Y, et al. Expression of plasma microRNA-145-5p and its correlation with clinical features in patients with refractory epilepsy[J]. *Epilepsy Research*, 2019, 154:21-25. DOI:10.1016/j.eplesyres.2019.04.010.
 - [24] Wang M, Hu M, Li Z, et al. miR-141-3p functions as a tumor suppressor modulating activating transcription factor 5 in glioma[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 490(4):1260-1267. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.05.179.
 - [25] Xiong X, Deng J, Zeng C, et al. MicroRNA-141 is a tumor regulator and prognostic biomarker in human glioblastoma[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(4):4455-4460. DOI:10.3892/ol.2017.6735.
 - [26] Liu D, Li S, Gong L, et al. Suppression of microRNA-141 suppressed p53 to protect against neural apoptosis in epilepsy by SIRT1 expression[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(6):9409-9420. DOI:10.1002/jcb.28216.
 - [27] Sun J, Cheng W, Liu L, et al. Identification of serum miRNAs differentially expressed in human epilepsy at seizure onset and post-seizure[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(6):5318-5324. DOI:10.3892/mmr.2016.5906.
 - [28] Raposo G. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4):373-383. DOI:10.1083/jcb.201211138.

(收稿日期:2019-10-26)

综 述

免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌治疗中的研究进展

卢子龙综述 耿庆审校

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81770095, 81700093)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院胸外科

通信作者: 耿庆, E-mail: szgqing@126.com

【摘 要】 肺癌作为全球死亡率第一的疾病,常见的治疗方案有手术治疗、化疗、放疗,针对驱动基因阳性者还可以选择性使用靶向治疗,但肺癌患者 5 年生存率仍然较低。非小细胞肺癌作为最常见的一类肺癌,临床上急需新的治疗方式,近年来免疫治疗作为一种新型有效的肿瘤治疗方式为非小细胞肺癌患者提供可能,文章对 NSCLC 免疫检查点抑制剂治疗的临床研究现状进行综述。

【关键词】 非小细胞肺癌;免疫检查点抑制剂;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4;程序性死亡因子-1/程序性死亡因子-1 配体

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.022

Research progress of immune checkpoint inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer Lu Zilong, Geng

Qing. Department of Thoracic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Province, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Geng Qing, E-mail: szgqing@126.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770095, 81700093)

【Abstract】 As the disease with the highest mortality rate in the world, lung cancer is commonly treated with surgical treatment, chemotherapy, and radiotherapy. Targeted therapy can also be used selectively for patients with positive driver genes, but the 5-year survival rate of lung cancer patients is still low. As the most common type of lung cancer, non-small cell lung cancer is in urgent need of new treatment methods in clinical practice. In recent years, immunotherapy, as a new and effective tumor treatment method, has brought good news to patients with non-small cell lung cancer. This paper will review the clinical research status of NSCLC immune checkpoint inhibitor therapy.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; Immune checkpoint inhibitors; Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; Programmed death 1/ programmed death-ligand 1

根据 2018 年全球癌症统计数据,肺癌是人群中最常见的癌症,2018 年诊断为肺癌的人数约为 200 万人,因肺癌而死亡的人数约为 176 万人^[1]。肺癌依据病因可分为原发性肺癌和继发性肺癌,而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是原发性肺癌中最常见的类型,占肺癌的 85%~90%^[2]。依据 SEER 数据库分析,过去 40 年中整体肺癌患者五年生存率仍不足 21%^[3],肺癌的临床治疗面临巨大考验。近年来免疫治疗兴起,免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)广泛应用于黑色素瘤、前列腺癌^[4]、NSCLC 等恶性肿瘤的一二线治疗中,如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)抑制剂、程序性死亡受体 1/配体 1(programmed death 1, PD-1/programmed death ligand-1, PD-L1)抑制剂等。T 细胞表面接受的抑制性

信号通路称为免疫检查点,免疫检查点过表达即会抑制 T 细胞的免疫功能,ICI 通过阻断免疫检查点,增强 T 细胞活性起到抗肿瘤的作用^[5]。本文总结了 ICI 在 NSCLC 中的作用机制、治疗标志物的选择及常见抑制剂的临床疗效和相关不良反应,旨在梳理这种新型治疗方式进展,并作出展望。

1 免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌机制

免疫学认为肿瘤的发生与转归过程是机体通过获得性免疫抵抗肿瘤生成,而肿瘤细胞通过多种机制逃避机体免疫系统识别和攻击,肿瘤细胞摆脱免疫杀伤作用随即进行生长和转移。免疫反应始于抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)的抗原摄取、加工和呈递,抗原通过 APC 与主要组织相容性复合体分子(major histocompatibility complex, MHC)结合传递到 T 细胞表面受体;并且 T 细胞上 CD28 受体与 APC 上的

CD80 / CD86 配体结合在一起,2 种信号共同激活 T 细胞^[6]。肺癌细胞的免疫逃逸主要通过免疫检查点途径减弱免疫反应,常见如 CTLA-4、PD-1 等,见图 1。

1.1 抗 CTLA-4 抗体 CTLA-4 为 CD28 的同源类似物,对比 CD28 而言,CTLA-4 与 CD80/CD86 更具亲和力,因此 CTLA-4 通过竞争性作用,抢先与 CD80/CD86 相结合,另外 CTLA-4 可下调 APC 上 CD80/CD86 的表达或通过细胞胞吞作用将其移除,借此阻断 CD28 的结合路径来抑制 T 细胞激活^[7]。CTLA-4 在 T 细胞活化激活免疫反应过程中起负调节作用,抗 CTLA-4 抗体可阻断抑制信号,诱导 T 细胞活化增殖,恢复其功能。

1.2 抗 PD-1/PD-L1 抗体 PD-1 是一种 I 型跨膜糖蛋白,Ishida 等最早于 1992 年在分离小鼠 T 细胞参与程序性细胞死亡过程发现。PD-1 有 2 种配体 PD-L1 及 PD-L2,正常组织 PD-L1 表达是对组织损伤持续的炎症反应后控制组织自身的免疫应答表现,PD-L1 在 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、胰岛细胞等多种细胞上表达,PD-L2 主要在巨噬细胞、B 细胞群上表达,基础表达量低^[8]。PD-1 与配体结合后,细胞质结构域中的酪氨酸残基被磷酸化随即募集蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein-tyrosine-phosphatase, PTP),这些 PTP 导致信号传导通路中信号激酶去磷酸化,CD28 受体的阳性刺激信号传导受阻^[9]。PD-1 信号导致激活转录因子 (TFs) 减少,如激活蛋白 1 (AP1),核转录因子的激活 T 细胞 (NFAT) 和 NF- κ B,阻断 T 细胞激活,并抑制其增殖过程^[10]。

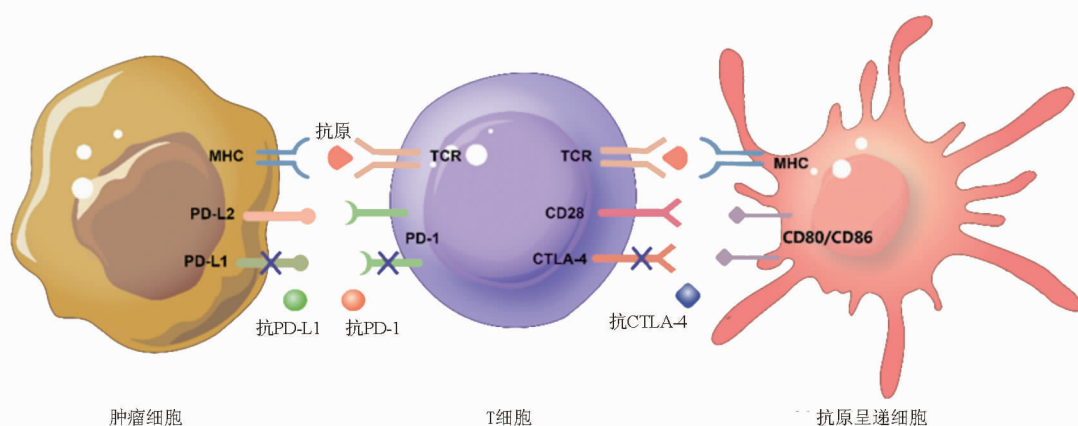
2 NSCLC 免疫治疗疗效预测标志物的选择

肺腺癌患者在选择靶向治疗时根据基因检测及驱

动基因阳性结果可以选择性使用不同靶向药物治疗,特定的生物标志物可以预测患者进行免疫治疗时能否临床获益。免疫治疗中常用的生物标志物有 PD-L1 表达、肿瘤突变负荷 (tumor mutation burden, TMB)、微卫星高度不稳定性 (microsatellite instability-high, MSI-H) 或错配修复缺陷 (deficient mismatch repair, dMMR)、肠道微生物菌群、肿瘤浸润性淋巴细胞等。

2.1 PD-L1 Topalian 等^[11]在评估 PD-L1 表达用于预测免疫治疗作用的临床试验中,5% 肿瘤细胞表达 PD-L1 为阳性组,结果显示 PD-L1 阳性肿瘤患者的总体反应率高于 PD-L1 阴性肿瘤患者。基于 Checkmate 024 研究 Pembrolizumab 获 FDA 批准作为 PD-L1 表达 $\geq 50\%$ 转移性 NSCLC 的一线治疗^[12]。但研究发现,PD-L1 既可以由肿瘤微环境中肿瘤细胞表达,也可由免疫细胞和部分炎性细胞表达,因此 PD-L1 表达具有干扰性^[13]。Rittmeyer 等^[14]在研究 Atezolizumab 与多西他赛用于 NSCLC 的临床试验中,发现无论 PD-L1 表达水平如何,Atezolizumab 组生存率改善均优于多西他赛组。另外部分临床试验证实,在 PD-L1 表达阴性的肿瘤患者中使用免疫检查点抑制剂,患者仍然可以获得临床治疗效果^[15]。PD-L1 表达也受到不同检测方法 (免疫组织化学、流式细胞术和 mRNA 表达) 限制^[16],因此单项的 PD-L1 表达水平并不足以成为一个完美的免疫治疗生物标志物。

2.2 TMB TMB 是指每一个编码肿瘤基因组区域突变的总数,研究认为癌细胞内的每个肿瘤突变都有可能产生肿瘤特异性抗原 (新抗原),因此突变越多,产生的新抗原越多,免疫系统识别抗原几率增加,免疫治疗效果更好。Yarchoan 等^[17]的临床研究显示,肿瘤突



注:TCR 在 APC 上的 MHC 分子中呈递抗原,APC 上的 CD80/CD86 配体与 T 细胞上的 CD28 受体共刺激相互作用。CTLA-4 竞争性结合 CD80/CD86,PD-1 与其配体 PD-L1/PD-L2 结合。抗 CTLA-4、抗 PD-1、抗 PD-L1 抗体阻断相应的免疫检查点通路,恢复 T 细胞活性

图 1 T 细胞活化机制与免疫检查点抑制剂作用机制

变负荷与免疫治疗客观反应率之间存在显著相关性 ($P < 0.001$)。TMB 水平越高,肿瘤免疫治疗效果越好,已在黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌^[18-20]等肿瘤的临床研究中显示出明显的优越性。Hellmann 等^[21]试验证实,TMB ≥ 10 mut/Mb 的 NSCLC 患者接受免疫治疗时无进展生存期明显更长。但近期部分临床试验显示 TMB 水平与 PD-1 治疗效果无明显相关性^[22-23],病毒阳性患者 TMB 较低 ($P < 0.01$),总生存期 (overall survival, OS) 反而较好,且试验证实 TMB 预测与性别有关,TMB 对女性肺癌患者的预测能力明显优于男性患者^[24]。TMB 又会受到采样时间,肿瘤异质性等因素影响,因此需要推行新的检测方法,推动 TMB 检测用于临床实践。

2.3 肠道微生物菌群 人体肠道微生物群大约重 1 000 g, 约有 30 个种属,数量多达 10^{14} 个,总数约是人体细胞总数的 10 倍,又被成为人类第二基因组^[25]。研究发现 ICI 治疗后疗效显著组患者体内有广泛存在的 AKK 菌,无反应组患者 AKK 细菌水平较低^[26]。在晚期黑色素瘤患者中,ICI 治疗反应组与无反应组体内肠道菌群丰度不同,肠道菌群种类、数量与疗效相关,反应组中 Ruminococcaceae 家族细菌的相对丰度更高^[27]。Matson 等^[28]分析免疫治疗前转移性黑色素瘤患者的基线粪便样本,发现反应组中具有丰富的细菌种类,包括长双歧杆菌、鹰嘴菌和粪肠球菌,并且用患者粪便重建无菌小鼠发现补充双歧杆菌后可以改善小鼠肿瘤控制,增强 T 细胞反应,提高抗 PD-L1 治疗的疗效。另外在研究抗生素治疗对晚期 NSCLC 及尿路上皮癌患者抗 PD-1 或 PD-L1 治疗影响试验中,抗生素治疗患者的 PFS 和 OS 明显缩短,主要原因为抗生素的使用扰乱了肠道菌群的丰度,影响了免疫治疗作用^[29]。在 NSCLC 的 ICI 治疗中也发现了相同结论^[30],但目前肠道菌群影响免疫治疗的机制尚未完全明确。

2.4 肿瘤浸润性淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) TIL 是肿瘤微环境组成部分之一,对肿瘤的生物性质及免疫治疗具有重要影响^[31]。依据 PD-L1 表达状态及 TIL 数量,肿瘤可分为 4 类: I 型适应性免疫抗性 (PD-L1 阳性和高 TIL), II 型免疫忽视 (PD-L1 阴性和低 TIL), III 型内源性诱导 (PD-L1 阳性和低 TIL) 和 IV 型免疫耐受 (PD-L1 阴性和高 TILs), 研究显示, I 型 NSCLC 患者免疫治疗具有较好效果^[32]。具体疗效需要更多临床数据进行验证。

3 免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌中的临床应用

3.1 免疫检查点抑制剂的单药治疗 近年来随着免

疫治疗的兴起,人源性抗 CTLA-4 抗体 (Ipilimumab、Tremelimumab),人源性抗 PD-1/PD-L1 抗体 (Pembrolizumab、Nivolumab、Atezolizumab) 在 NSCLC 的治疗取得了丰硕的成果,多种 ICI 被批准用于 NSCLC 的单药治疗。基于 KEYNOTE024 和 042 的结果 Pembrolizumab 单药用于一线治疗 PD-L1 阳性 NSCLC 患者,尤其是 PD-L1 高表达人群^[33]。经与多西他赛相比的 CheckMate-017 和 CheckMate-057 试验,Nivolumab 获批用于晚期复发性或难治性 NSCLC 的二线治疗^[15,34]。POP-LAR 的一项 II 期临床试验证实单药 Atezolizumab 用于肺癌治疗的有效性,并且这种作用在 PD-L1 高表达患者中更明显^[35],后经 OAK III 期试验验证,Atezolizumab 成功获批用于既往接受过治疗的转移性 NSCLC 患者,无论患者 PD-L1 表达状态如何均可应用^[36]。

3.2 免疫检查点抑制剂联合化疗 随着 KEYNOTE 021 首次成功将铂类化疗与 ICI 联合治疗晚期 NSCLC 患者,无论 PD-L1 的表达如何,与单纯化疗及 Pembrolizumab 单药治疗相比,Pembrolizumab 加化疗组的 ORR 显著改善,而肿瘤进展率和死亡的风险率降低 50%^[37],免疫治疗转入到联合治疗阶段。CheckMate 012 试验中^[38],Nivolumab 联合传统化疗组客观反应率高达 47%,特别是 Nivolumab (5 mg/kg) 加紫杉醇—卡铂组,2 年 OS 率达到了 62%。在 KEYNOTE-189 试验中^[39],对于先前未治疗的转移性非鳞状 NSCLC 且无 EGFR 或 ALK 突变的患者,Pembrolizumab 联合培美曲塞和铂类药物组中位无进展生存期达到 8.8 个月,12 个月总生存率为 69.2%。IMpower132 试验结果证实,Atezolizumab 联合化疗组 PFS 优于单纯化疗组,且 IMpower150 证实无论 PD-L1 表达和 EGFR 或 ALK 遗传改变状态如何,Atezolizumab 联合贝伐单抗和标准化疗均显示 OS 优势^[40]。FDA 批准 Atezolizumab 联合贝伐单抗和标准化疗用于一线治疗转移性非鳞状非小细胞肺癌且无 EGFR 或 ALK 基因组畸变的肿瘤患者。

3.3 免疫检查点抑制剂联合治疗 基于 PD-1 途径与 CTLA4 途径的作用方式不同,CheckMate 012 试验开始尝试双 ICI 药物治疗方式,对于 NSCLC 患者一线应用 Nivolumab 联合 Ipilimumab 具有可耐受的安全性及治疗作用^[41]。CheckMate 227 试验进一步证实,无论 PD-L1 的状态如何,双 ICI 组 (Nivolumab 联合 Ipilimumab) 与高 TMB 的单纯化疗组相比,中位 PFS 为 7.2 个月 vs. 5.4 个月,ORR 率也更高 45.3% vs. 26.9%。CheckMate 568^[42] 中复发性 III B /IV 期 NSCLC 接受 Nivolumab 联合 Ipilimumab 治疗,252 例患者依据 PD-L1 表达低于 1%、1% 及高于 1% 分组,ORR 率依次为

15%、30% 和 41%，且 ORR 随着 TMB 的增加而增加。然而在 I b 期试验 (NCT02000947) 102 例晚期 NSCLC 患者接受抗 PD-L1 抗体 Durvalumab 和抗 CTLA-4 抗体 Tremelimumab 的联合治疗，29 例 (28%) 因治疗相关的不良事件引起停药，37 例 (36%) 发生了与治疗相关的严重不良事件^[43]。在 III 期临床试验 (NCT02453282) 中，1 118 例患者依据 PD-L1 表达 ($\geq 25\%$ 和 $< 25\%$) 分组，并随机接受 Durvalumab (或 Durvalumab + Tremelimumab) 或化疗治疗，最终主要终点 OS 和 PFS 差异无统计学意义^[44]。在 I b 期试验 (NCT02537418) 中，又将 D + T 方案与化疗联用，24 例晚期 NSCLC 患者中有 17 例得到缓解，ORR 为 52.9%。目前正在进行的 II 期临床试验 (NCT03057106) 和 III 期试验 (NCT02542293) 将进一步探究 D + T 联合铂类化疗的疗效，试验主要终点是 OS，次要终点是 PFS、ORR、生活质量及安全性，具体效果有待研究。

3.4 免疫检查点抑制剂联合吡咯啉 2, 3-双加氧酶 (IDO-1) 抑制剂 吡咯啉-2,3-二加氧酶 1 (Indolamine-2,3-dioxygenase 1, IDO-1)，是一种可催化色氨酸代谢为犬尿氨酸的金属蛋白酶，IDO-1 将色氨酸氧化为 N-乙酰基犬尿氨酸，然后将其转化为分解代谢产物^[45]。色氨酸被消耗后，T 细胞活化激酶 PKC- θ 的活性下降，且色氨酸分解代谢产物通过与芳香烃受体结合促进 CD4⁺ T 细胞分化成 Treg 细胞，同时限制其分化成 Th17 细胞，免疫系统受到抑制^[46]。经多重定量免疫荧光测量 552 例 I ~ IV 期肺癌患者中 PD-L1、IDO-1、B7-H4 和不同的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 亚型的水平，PD-L1 和 IDO-1 升高与明显的 B 细胞和 T 细胞浸润一致，两者出现有限的共表达现象^[47]。ECHO-202/KEYNOTE-037 试验中选用了 IDO-1 抑制剂 Epacadostat 联合 Pembrolizumab 治疗 NSCLC 患者，最终 40 例可评估疗效的患者 ORR 为 35%，DCR 为 60%，所有患者中，最常见的不良反应是疲劳 (19%)、关节痛 (9%) 和 AST 升高 (9%)，E + P 方案一般耐受性良好，对晚期 NSCLC 治疗有效^[48]。

3.5 免疫检查点抑制剂联合放疗 对于晚期 NSCLC 患者而言，放疗的大量射线照射一方面可以破坏细胞内的 DNA，有效减慢肿瘤转移并缓解局部压迫症状，另一方面通过放疗杀死的肿瘤细胞会释放出大量新的抗原激活机体的免疫反应，因此对于晚期 NSCLC 治疗，免疫检查点抑制剂联合放疗成为一种新的有效治疗方式。76 例复发转移性非小细胞肺癌患者随机接受 Pembrolizumab (每 3 周 200 mg / kg) 治疗 (对照组) 或先接受放疗 (8 Gy $\times$ 3 次) 后再接受 Pembrolizumab

治疗 (试验组)，12 周时试验组与对照组相比，ORR 为 36% vs. 18%，PFS 为 6.6 个月 vs. 1.9 个月，中位总体生存期为 15.9 个月 vs. 7.6 个月，亚组分析显示，对于 PD-L1 阴性肿瘤患者，增大放疗剂量疗效更佳，结果显示，在 Pembrolizumab 治疗前一定程度的放疗有助于改善治疗效果^[49]。NCT02316002 试验中晚期 NSCLC 患者接受局部消融治疗后，静脉注射 Pembrolizumab 治疗，每 21 d 200 mg，共 8 个周期，PFS 中位数为 19.1 个月，12 个月的总体平均生存率为 90.9%，24 个月时为 77.5%，结果证实，晚期肺癌患者在局部消融治疗后接受 Pembrolizumab 可改善 PFS 并且不影响生活质量^[50]。但这种治疗方式也存在许多问题需要解决，如 ICI 相关的最佳放疗剂量和时间、PD-L1 状态的影响，如何在这些组合中添加免疫检查点抑制剂等，有待进一步的试验研究去探索出理想的治疗组合方式。

3.6 免疫检查点抑制剂联合靶向治疗 对于具有 EGFR、BRAF、ALK 或 ROS1 等驱动基因突变的敏感性 NSCLC 患者而言，一线首选酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI) 靶向治疗。由于靶向治疗的耐药性等问题，人们尝试 ICI 联合 TKI 的治疗方法，尽管部分亚组显示出积极信号但总体而言临床疗效不佳，不良反应显著^[51]。对于这类患者推荐在 TKI 治疗无效或无法耐受 TKI 药物反应时，再选用 ICI 治疗。

4 ICI 治疗相关不良事件

ICI 在临床实践中的应用也会出现一系列毒性反应，包括肺炎、肝炎、结肠炎和内分泌病变等，常发生在治疗后 2 周 ~ 3 个月，最常见的不良反应为嗜睡、皮疹、瘙痒、肝毒性、腹泻、结肠炎和垂体炎^[52]。免疫相关不良反应的主要治疗手段包括降低剂量或停止使用药物，以及考虑免疫抑制，对于严重的毒性反应，应永久终止免疫治疗^[53]。

综上，非小细胞肺癌的免疫检查点抑制剂治疗已取得成果，但对于精准免疫治疗来说仍任重道远，ICI 治疗精准标志物的选择、ICI 药物联用的组合方式及药物剂量等问题仍需要进一步的探索。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2014, 25 (Suppl 3): iii27-39. DOI: 10.1093/annonc/mdl199.
- [3] Lu T, Yang X, Huang Y, et al. Trends in the incidence, treat-

- ment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 943-953. DOI: 10.2147/CMAR.S187317.
- [4] 刘洋, 刘修恒. 免疫检查点阻断剂治疗前列腺癌的研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2017, 16(8): 852-856. DOI:10.3969/j. issn. 1671-6450. 2017. 028.
- [5] 薛雯, 贾宇, 江一帆, 等. 免疫检查点抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(4): 341-349. DOI: 10.19586/j. 2095-2341. 2019. 0019.
- [6] Reck M, Heigener D, Reinmuth N. Immunotherapy for small-cell lung cancer: emerging evidence[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(7): 931-943. DOI: 10.2217/fon-2015-0012.
- [7] Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4[J]. *Science*, 2011, 332(6029): 600-603. DOI: 10.1126/science.1202947.
- [8] Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(3): 153-167. DOI: 10.1038/nri.2017.108.
- [9] Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 92. DOI: 10.1186/s13045-019-0779-5.
- [10] Wu X, Gu Z, Chen Y, et al. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, 17: 661-674. DOI: 10.1016/j. csbj. 2019. 03. 006.
- [11] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454. DOI: 10.1056/NEJMoa1200690.
- [12] Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1823-1833. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.
- [13] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 563-567. DOI: 10.1038/nature14011.
- [14] Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): A phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 255-265. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
- [15] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135. DOI: 10.1056/NEJMoa1504627.
- [16] Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(4): 203-220. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.168.
- [17] Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(25): 2500-2501. DOI: 10.1056/NEJMc1713444.
- [18] Van Allen EM, Miao D, Schilling B, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma[J]. *Science*, 2015, 350(6257): 207-211. DOI: 10.1126/science. aad0095.
- [19] 殷悦, 张羽白, 邢丽娜. 肿瘤突变负荷对非小细胞肺癌免疫治疗疗效的预测价值[J]. *华老年多器官疾病杂志*, 2018, 17(9): 717-720. DOI:10.11915/j. issn. 1671-5403.
- [20] Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al. Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with Ipilimumab in small-cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 853-861. e4. DOI: 10.1016/j. ccell. 2018. 03. 018.
- [21] Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2093-2104. DOI: 10.1056/NEJMoa1801946.
- [22] Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with Nivolumab[J]. *Cell*, 2017, 171(4): 934-949, e16. DOI: 10.1016/j. cell. 2017. 09. 028.
- [23] Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(4): 98811. DOI: 10.1172/jci. insight. 98811.
- [24] Wang S, Zhang J, He Z, et al. The predictive power of tumor mutational burden in lung cancer immunotherapy response is influenced by patients' sex[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(10): 2840-2849. DOI: 10.1002/ijc. 32327.
- [25] 章必成, 彭敏, 宋启斌. 肠道微生物群与免疫治疗疗效的关系[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(11): 1056-1059. DOI:10.11735/j. issn. 1671-170X.
- [26] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 91-97. DOI: 10.1126/science. aar3706.
- [27] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97-103. DOI: 10.1126/science. aar4236.
- [28] Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients[J]. *Science*, 2018, 359(6371): 104-108. DOI: 10.1126/science. aar3290.
- [29] Yu G, Gail MH, Consonni D, et al. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features[J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 163. DOI: 10.1186/s13059-016-1021-1.
- [30] Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(6): 1437-1444. DOI: 10.1093/annonc/ mdy103.
- [31] 刘丹丹, 韩雷, 于津浦. 肿瘤免疫治疗疗效和预后相关生物标志物的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(10): 1148-1155. DOI:10.3872/j. issn. 1007-385x.
- [32] Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, et al. Low PD-1 expression in cytotoxic CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes confers an immune-

- privileged tissue microenvironment in NSCLC with a prognostic and predictive value[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 407-419. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.
- [33] Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10183): 1819-1830. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32409-7.
- [34] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17): 1627-1639. DOI: 10.1056/NEJMoa1507643.
- [35] Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2016, 387(10030): 1837-1846. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
- [36] Brahmer JR, Govindan R, Anders RA, et al. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 75. DOI: 10.1186/s40425-018-0382-2.
- [37] Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: A randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(11): 1497-1508. DOI: 10.1016/S1473-0475(16)30498-3.
- [38] Rizvi NA, Hellmann MD, Brahmer JR, et al. Nivolumab in combination with platinum-based doublet chemotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(25): 2969-2979. DOI: 10.1200/JCO.2016.66.9861.
- [39] Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2078-2092. DOI: 10.1056/NEJMoa1801005.
- [40] Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(24): 2288-2301. DOI: 10.1056/NEJMoa1716948.
- [41] Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): Results of an open-label, phase 1, multicohort study[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(1): 31-41. DOI: 10.1016/S1473-0475(16)30624-6.
- [42] Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-Line Nivolumab plus Ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 568): Outcomes by programmed death ligand 1 and tumor mutational burden as biomarkers[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(12): 992-1000. DOI: 10.1200/JCO.18.01042.
- [43] Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, et al. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: A multicentre, phase 1b study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(3): 299-308. DOI: 10.1016/S1473-0475(15)00544-6.
- [44] Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, et al. LBA6Durvalumab with or without tremelimumab vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for metastatic non-small cell lung cancer: MYSTIC[J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29(suppl_10). DOI:10.1093/annonc/mdy511.005.
- [45] Prendergast GC, Mondal A, Dey S, et al. Inflammatory reprogramming with IDO1 inhibitors: Turning immunologically unresponsive 'Cold' tumors 'Hot'[J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(1): 38-58. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.11.005.
- [46] Zhu MMT, Dancsok AR, Nielsen TO. Indoleamine dioxygenase inhibitors: Clinical rationale and current development[J]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21(1): 2. DOI: 10.1007/s11912-019-0750-1.
- [47] Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, et al. Differential expression and significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in human lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(2): 370-378. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0150.
- [48] Mitchell TC, Hamid O, Smith DC, et al. Epcadostat plus Pembrolizumab in patients with advanced solid tumors: Phase I results from a multicenter, open-label phase I/II trial (ECHO-202/KEYNOTE-037)[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(32): Jco2018789602. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.9602.
- [49] Theelen WSME, Peulen HMU, Lalezari F, et al. Effect of Pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy vs Pembrolizumab alone on tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer: Results of the PEMBRO-RT phase 2 randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncology*, 2019, 5(9): 1276-1282. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1478.
- [50] Bauml JM, Mick R, Ciunci C, et al. Pembrolizumab after completion of locally ablative therapy for oligometastatic non-small cell lung cancer: A phase 2 trial[J]. *JAMA Oncology*, 2019, 5(9): 1283-1290. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1449.
- [51] Berghoff AS, Bellosillo B, Caux C, et al. Immune checkpoint inhibitor treatment in patients with oncogene-addicted non-small cell lung cancer (NSCLC): Summary of a multidisciplinary round-table discussion[J]. *ESMO Open*, 2019, 4(3): e000498. DOI:10.1136/esmoopen-2019-000498.
- [52] 孙丽, 刘臻, 张述. 免疫检查点抑制剂治疗相关不良反应及处理[J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(10): 1115-1120. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2019.10.021.
- [53] Haanen J, Carbone F, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(suppl_4): iv119-iv142. DOI: 10.1093/annonc/mdx225.

局部高雌激素在子宫内膜异位症发病机制中的作用

程冀妍, 陈喆, 江春花综述 曹颖审校

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81603455); 华北理工大学大学生创新创业训练计划项目(X2018401)

作者单位: 063210 唐山, 华北理工大学中医学院

通信作者: 曹颖, E-mail: couny02@163.com

【摘 要】 子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病, 药物治疗以降低全身雌激素水平为目的, 由此带来的不良反应限制了药物的长时间使用。诸多研究表明, 子宫内膜异位症病灶局部雌激素占主导, 高于血液循环中雌激素水平且不随月经周期变化。局部高雌激素环境有利于异位子宫内膜细胞增殖、迁移、黏附及侵袭, 促进了异位病灶的发生、发展。文章就子宫内膜异位症病灶局部雌激素产生的机制及高雌激素对其发生、发展的影响作一综述, 以期对子宫内膜异位症的治疗提供新思路。

【关键词】 子宫内膜异位症; 雌激素; 局部; 炎症反应; 发病机制

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.023

The role of local high estrogen in the pathogenesis of endometriosis Cheng Jiyan, Chen Zhe, Jiang Chunhua, Cao Ying. Department of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Hebei Province, Tangshan 063210, China

Corresponding author: Cao Ying, E-mail: county02@163.com

Fund program: National Natural Science Youth Fund Project (81603455); North China University of Technology Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (X2018401)

【Abstract】 Endometriosis is an estrogen dependent disease. Drug therapy aims to reduce the level of estrogen in the whole body. The adverse reactions caused by it limit the long-term use of drugs. Many studies have shown that estrogen is dominant in endometriosis, which is higher than that in blood circulation and does not change with menstrual cycle. Local high estrogen environment is conducive to the proliferation, migration, adhesion and invasion of ectopic endometrial cells, and promotes the occurrence and development of ectopic lesions. This article reviews the mechanism of local estrogen production and the effect of high estrogen on the occurrence and development of endometriosis, in order to provide new ideas for the treatment of endometriosis.

【Key words】 Endometriosis; Local estrogen; Inflammation; Mechanism

子宫内膜异位症是子宫内膜间质及腺体生长在子宫外其他组织或器官, 如腹壁、卵巢、宫骶韧带等部位, 引起以进行性痛经、慢性盆腔痛、性交困难、不孕等为主要临床表现的一种疾病。严重的子宫内膜异位症可导致盆腔解剖结构改变, 形成广泛粘连。该病在育龄期女性中的患病率可达 1% ~ 6.8%^[1-2], 甚至更高, 严重影响了育龄期女性身体健康及生活质量^[3]。虽然子宫内膜异位症发生的病理机制尚未阐明, 但大量的流行病学及临床研究均表明, 子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病。雌二醇(estradiol, E2)具有促进异位病灶细胞黏附、侵袭、增殖, 抑制凋亡, 维持炎症反应的作用^[4-6]。现阶段的药物治疗, 主要以降低循环中雌激素水平为主, 其带来的不良反应限制了药物的长

期应用^[7]。更有研究表明, 腹膜型及深部浸润型子宫内膜异位症病灶局部雌激素水平不随月经发生周期性变化^[8], 子宫内膜异位症患者异位病灶中雌激素水平升高, 而血液循环中雌激素水平并未升高^[6], 以上均说明局部雌激素代谢在子宫内膜异位症的发生发展中起着重要作用。子宫内膜异位症理想治疗方案为靶向抑制病灶局部产生的雌激素, 因此充分认识病变局部的雌激素代谢及其作用, 可能为研究新的子宫内膜异位症治疗药物提供思路。

1 异位病灶中雌激素的来源

绝经期前女性体内雌激素主要来源于卵巢, 卵泡膜细胞在各种酶的催化作用下, 将血液中的胆固醇转化为雄烯二酮和睾酮。芳香化酶是雌激素的主要合成

酶,在排卵前其将雄烯二酮转化为雌酮(estrone, E1),将睾酮转化为 E2。除卵巢外,一些非性腺器官和组织,如外周皮肤和脂肪组织也可将肾上腺分泌的雄烯二酮转化为 E1, E1 还可在类固醇脱氢酶的作用下转化为 E2。异位内膜间质细胞自身也可合成雌激素,且合成能力较在位内膜、正常内膜明显增强^[9]。因此异位病灶中的雌激素来源有 4 种:(1)排卵前卵泡分泌的 E2 随血液循环进入异位组织;(2)排卵期卵泡破裂,卵泡液中的 E2 直接进入腹腔;(3)周围组织如脂肪、皮肤、骨骼肌等,通过旁分泌和自分泌生成雌激素;(4)异位内膜间质细胞将胆固醇转化为 E2,经旁分泌作用于异位病灶^[4]。

2 病灶局部雌激素水平升高

相较于血清中 E2、E2/E1 比值的周期性变化,异位病灶中的 E2 及 E2/E1 比值远高于同期血清,且不随月经周期而改变, E2 始终是异位病灶微环境中的优势激素^[8]。大量基因组学研究发现^[10-12],在异位组织中多种性激素受体及参与性激素合成代谢的酶基因表达失调,如雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)表达下调, ER β 表达上调,雌激素合成相关酶如芳香化酶、17 β 羟化类固醇脱氢酶 (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD) 基因表达增加。一种高雌激素依赖性基因 Cyp11A 在子宫内膜异位症患者的在位内膜及异位病灶中表达上调^[13]。此外,在雌激素刺激下,子宫内膜下肌层的蠕动波显著增强。子宫内膜异位症患者外周血中雌激素水平正常,其子宫肌层蠕动波却增强,与控制性超促排卵卵巢过度刺激时类似^[14]。以上证据均表明,在子宫内膜异位症病灶局部存在高雌激素环境,其与病灶组织微环境对雌激素合成代谢的调控密切相关,减少异位病灶微环境中 E2 合成对于治疗子宫内膜异位症具有重要意义。

3 局部高雌激素形成机制

芳香化酶是将雄激素转化为雌激素的限速酶,其在正常子宫内膜中不表达,在子宫内膜异位症患者异位内膜及在位内膜中均高表达,这是导致异位病灶雌激素合成增加的重要原因^[4]。芳香化酶可将卵巢及肾上腺来源的雄烯二酮转化为 E1, E1 在 17 β -HSD 作用下被转化为 E2。环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 类似物或前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 能够上调异位内膜间质细胞中芳香化酶的表达,而 PGE2 的合成由环氧合酶 2 (cyclooxygenase type 2, COX-2) 所调控。此外, PGE2 能够上调性激素合成急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR) 表达,后者能够促进胆固醇进入线粒体

合成性激素^[15]。以上研究表明炎性反应环境能够有利于异位病灶合成 E2。类固醇生成因子-1 (steroidogenic factor-1, SF-1) 在正常子宫内膜腺体和间质细胞中几乎无表达,在异位内膜间质细胞中高表达, SF-1 与芳香化酶及 StAR 基因的启动子区结合,可激活上述基因转录^[16]。另有研究认为异位内膜间质细胞中上游刺激因子 2 (upstream stimulatory factor 2, USF2) 及转录因子 21 (transcription factor 21, TF21) 表达明显高于在位内膜间质细胞, USF2 与 TF21 能够协同作用,与 SF-1 基因上游的 E-box 元件相结合,从而激活 SF-1 转录^[17]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1, PGC-1) 是一种调节类固醇合成的转录共激活剂,在卵巢子宫内膜异位囊肿中高表达,可以激活芳香化酶的转录活性。由腹腔巨噬细胞和异位病灶产生的主要致炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 可以激活异位内膜间质细胞中 PGC-1 α 转录^[18],这一发现也证明病灶局部炎性反应环境与高雌激素状态密切相关。

4 局部高雌激素对子宫内膜异位症发生发展的影响

雌激素通过与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合发挥生物学作用。ER 存在于细胞核、细胞质及细胞膜上。雌激素激活核受体 ER 后,能够激活多种基因转录。此外,雌激素还可以与细胞质及细胞膜上的 ER 或 G 蛋白偶联雌激素受体 1 (G-protein coupled estrogen receptor 1, GPER) 结合,通过非基因组方式发挥作用^[19]。ER α 和 ER β 是 2 种最经典的雌激素受体。在正常子宫内膜中,以 ER α 占主导,特别是子宫内膜增殖主要依赖 ER α 的作用。子宫内膜异位症病灶中呈现 ER α 表达下调, ER β 表达上调的表现, ER α /ER β 的比值下降^[20-21]。在异位内膜间质细胞中 ER α 表达下调与 3'端附近启动子高甲基化有关。此外,在卵巢子宫内膜异位囊肿间质细胞中, ER β 可以直接抑制 ER α 表达。然而在异位内膜间质细胞中, ER β 启动子 CpG 岛的甲基化程度很低;正常内膜间质细胞中,该段序列呈现高甲基化^[20]。病灶局部高雌激素及雌激素受体的变化,使异位组织细胞在增殖、凋亡、黏附、侵袭、血管新生、炎性反应等诸多方面异常,有利于子宫内膜异位症的发生发展。

4.1 雌激素对异位病灶细胞增殖及凋亡影响 E2 诱导 ER β 在 RAS 样雌激素调节生长抑制因子 (ras-like and estrogen-regulated growth inhibitor, RERG) 基因启动子区域富集,促进其转录。PGE2 介导蛋白激酶 A 可以使 RERG 磷酸化并发生核转位,从而诱导异位内

膜细胞增殖^[21]。ER β 还可抑制由肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 诱导的凋亡。凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 是 TNF- α 诱导凋亡的关键蛋白, 异位病灶中 ER β 与 ASK1 相互作用, 从而抑制凋亡发生。应用 ER β 特异性抑制剂 PHTPP 能够显著抑制子宫内膜异位症模型小鼠异位病灶生长^[22]。

4.2 雌激素对异位内膜细胞上皮间质转化的影响

Sampson 经血逆流学说被广泛接受, 即月经期破碎的子宫内膜组织通过输卵管逆流进入腹腔, 黏附并种植形成异位病灶。在此过程中, 上皮间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 可能是实现内膜异位种植的关键环节^[23-24]。EMT 是指上皮细胞失去细胞骨架和细胞间接触的极性, 具备了更强的迁移及侵入能力, 向高运动性的间充质细胞转化。在子宫内膜异位症患者的腹膜异位病灶及周围腹膜组织中, 上皮细胞标志物表达下调而间叶细胞标志物表达上调。随着腹膜间皮细胞的 EMT 改变, 破碎的子宫内膜更容易黏附于腹膜基质, 开始异位生长^[25]。细胞质中大量丰度的 β -catenin 可以发生核转位, 激活 EMT 过程中多种蛋白的基因转录。而雌激素作用下 ER 能够与 β -catenin 的雌激素反应元件结合, 启动 β -catenin 转录^[26]。因此, 雌激素可能通过上调 β -catenin 的表达促进异位内膜细胞 EMT 进程。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是激活 EMT 信号的重要蛋白, 有研究证实雌激素能够促进卵巢子宫内膜异位病灶细胞中 HGF 基因转录, 并上调多种间质细胞标志物的表达, 促进细胞迁移^[27]。此外, 子宫内膜细胞在迁移和侵袭过程中发生组织重构时, 需要破坏细胞外基质。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在腹膜组织破坏及子宫内膜异位生长中发挥重要作用。雌二醇干预下, 异位内膜间质细胞中 MMP9 的表达上调^[28]。以上研究说明雌激素在子宫内膜迁移、黏附、侵袭种植过程中发挥着重要调节作用。

4.3 雌激素促进血管生成 与其他组织相比, 子宫内膜的血管生长呈现复杂的周期性变化。增殖期雌激素促进血管增殖, 分泌期孕激素促进血管成熟^[29]。异位病灶在腹腔种植成功后, 其进一步生长需要依赖血管新生, 这一过程需雌激素的参与。与正常仓鼠相比, 去势后仓鼠子宫内膜异位症病灶血管化程度低, 说明性激素能够促进异位病灶血管新生^[30]。体外实验表明, 雌激素作用下, 血管内皮祖细胞的迁移和成管能力增强^[31]。雌激素可以上调 β -catenin 转录, β -catenin 的

稳定表达激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路, 后者能够直接促进血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 转录^[26]。

4.4 雌激素促进炎症反应发生 子宫内膜异位症被认为是一种慢性炎性反应。大量证据表明, 在异位病灶及子宫内膜异位症患者腹腔液中, 巨噬细胞数量增加^[32]。有研究认为, 病灶局部及腹腔液中巨噬细胞以 ER β 表达为主^[33]。在雌激素干预下, 脊髓背角神经节中趋化因子 (C-C 基序) 配体 2 [chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL-2]、集落刺激因子 1 (colony-stimulating factor-1, CSF-1) 基因表达增加, 从而促进巨噬细胞的募集、生存及活化, 被认为是神经源性炎性反应的关键环节。随着巨噬细胞数量的增加, 腹腔液中 TNF α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子表达增加。此外, 雌激素能够激活 COX-2 基因转录^[34]。而 COX-2 是 PGE2 合成过程中必不可少的催化酶, 花生四烯酸在 COX-2 催化下转化为前列腺素 G2, 后者在 PGE2 合成酶作用下转化为 PGE2。一项在人胎盘绒毛血管内皮细胞中的研究表明, 雌激素受体 β (ER β) 为 COX-2 表达所必需^[35]。因此有学者推测, 在异位病灶中, E2 激活 COX-2 转录的过程至少有一部分需要通过介导 ER β 来完成。由此看来, 炎性介质 PGE2 通过激活 StAR、芳香化酶转录, 促进 E2 合成; E2 与 ER β 结合后激活了 COX-2 转录, 又能够促进 PGE2 的产生。因此在异位病灶中形成了一个炎性反应—雌激素相互作用的恶性循环, 被称为 PGE2-E2 正反馈环^[4,36]。

5 小 结

综上所述, 子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病, 病灶局部高雌激素环境是子宫内膜异位症不容忽视的病理改变, 其形成与病灶局部慢性炎性反应状态息息相关。高雌激素微环境可促进子宫内膜异位组织增殖、黏附、侵袭、血管生成过程, 是组织异位种植的基础; 有利于慢性炎性反应状态的持续, 为病变的进展提供条件。异位病灶高雌激素微环境又几乎不受循环中雌激素变化的影响, 因此降低病灶局部雌激素水平可能是制约子宫内膜异位症药物疗效提高的难点。高雌激素环境与慢性炎性反应状态相互影响, 以炎性反应为靶点的药物研究可能会成为子宫内膜异位症治疗药物研发的重点。

参考文献

- [1] Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, et al. Epidemiology of endometriosis: A large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members [J]. BJOG, 2018, 125 (1) : 55-62. DOI: 10.1111/1471-0528.
- [2] Yen CF, Kim MR, Lee CL. Epidemiologic factors associated with

- endometriosis in East Asia [J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2019, 8(1):4-11. DOI: 10.4103/GMIT.GMIT_83_18.
- [3] Zondervan KT, Becker CM, Koga K, et al. Endometriosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1):9. DOI: 10.1038/s41572-018-0008-5.
- [4] Ferrero S, Remorgida V, Maganza C, et al. Aromatase and endometriosis: estrogens play a role[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1317: 17-23. DOI: 10.1111/nyas.12411.
- [5] 赵红伟, 张宗峰. 雌激素受体 β 在子宫内膜异位症中的作用及意义[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(3):315-318. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.03.025.
- [6] Mori T, Ito F, Koshiba A, et al. Local estrogen formation and its regulation in endometriosis[J]. *Reprod Med Biol*, 2019, 18(4): 305-311. DOI: 10.1002/rmb2.12285.
- [7] 陈竹灵, 程静. 子宫内膜异位症疼痛药物治疗[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(9): 1063-1066. DOI: 10.19538/j.fk2019090127.
- [8] Huhtinen K, Desai R, Stahle M, et al. Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(11):4228-4235. DOI: 10.1210/jc.2012-1154.
- [9] Monsivais D, Dyson MT, Yin P, et al. ER β - and prostaglandin E2-regulated pathways integrate cell proliferation via Ras-like and estrogen-regulated growth inhibitor in endometriosis[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(8):1304-1315. DOI: 10.1210/me.2013-1421.
- [10] Joseph S, Mahale SD. Endometriosis knowledgebase: a gene-based resource on endometriosis [J]. *Database (Oxford)*, 2019, 2019: baz062. DOI: 10.1093/database/baz062.
- [11] Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, et al. Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: What goes wrong in endometriosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15):E3822. DOI: 10.3390/ijms20153822.
- [12] Konings G, Brentjens L, Delvoux B, et al. Intracrine regulation of estrogen and other sex steroid levels in endometrium and non-gynecological tissues, pathology, physiology, and drug discovery[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:940. DOI: 10.3389/fphar.2018.00940.
- [13] Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, et al. Cyr61, a deregulated gene in endometriosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(6):399-407. DOI: 10.1093/molehr/gah053.
- [14] Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, 280(4):529-538. DOI: 10.1007/s00404-009-1191-0.
- [15] Mori T, Ito F, Koshiba A, et al. Aromatase as a target for treating endometriosis[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2018, 44(9):1673-1681. DOI: 10.1111/jog.13743.
- [16] Xue Q, Xu Y, Yang H, et al. Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells[J]. *Reprod Sci*, 2014, 21(3):395-400. DOI: 10.1177/1933719113497283.
- [17] Wu PL, Zhou Y, Zeng C, et al. Transcription factor 21 regulates expression of ER β and SF-1 via upstream stimulatory factor-2 in endometriotic tissues [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, 1861(8):706-717. DOI: 10.1016/j.bbgrm.2018.06.008.
- [18] Suganuma I, Mori T, Ito F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 α enhances local estrogen biosynthesis by stimulating aromatase activity in endometriosis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(7):E1191-1198. DOI: 10.1210/jc.2013-2525.
- [19] Huhtinen K, Stahle M, Perheentupa A, et al. Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 358(2):146-154. DOI: 10.1016/j.mce.2011.08.022.
- [20] Yilmaz BD, Bulun SE. Endometriosis and nuclear receptors [J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(4):473-485. DOI: 10.1093/humupd/dmz005.
- [21] Monsivais D, Dyson MT, Yin P, et al. ER β - and prostaglandin E2-regulated pathways integrate cell proliferation via Ras-like and estrogen-regulated growth inhibitor in endometriosis [J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(8):1304-1315. DOI: 10.1210/me.2013-1421.
- [22] Han SJ, Jung SY, Wu SP, et al. Estrogen receptor β modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis[J]. *Cell*, 2015, 163(4):960-974. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.034.
- [23] 牛亚南, 庄梦斐, 曹阳, 等. 间质-上皮转化参与子宫内膜异位症模型大鼠包囊形成[J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(9):748-756. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2018.09.009.
- [24] 钱文艳, 邹素芳. 上皮间质转化在子宫内膜异位症发病机制中的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2015, 24(4):306-307. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2015.04.032.
- [25] Yang YM, Yang WX. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):41679-41689. DOI: 10.18632/oncotarget.16472.
- [26] Zhang L, Xiong W, Xiong Y, et al. 17 β -Estradiol promotes vascular endothelial growth factor expression via the Wnt/ β -catenin pathway during the pathogenesis of endometriosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22(7):526-535. DOI: 10.1093/molehr/gaw025.
- [27] Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, et al. Estradiol-mediated hepatocyte growth factor is involved in the implantation of endometriotic cells via the mesothelial-to-mesenchymal transition in the peritoneum [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308(11):E950-959. DOI: 10.1152/ajpendo.00573.2014.
- [28] Wang D, Liu Y, Han J, et al. Puerarin suppresses invasion and vascularization of endometriosis tissue stimulated by 17 β -estradiol [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025011.
- [29] Okada H, Tsuzuki T, Shindoh H, et al. Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(5):1180-1187. DOI: 10.1111/jog.12392.
- [30] Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, et al. In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(Suppl 2):1199-1209. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.010.

幽门螺杆菌感染与胃外疾病研究进展

张华洋综述 刘琦审校

作者单位: 550025 贵阳, 贵州医科大学(张华洋); 550004 贵阳, 贵州医科大学附属医院消化内科(刘琦)

通信作者: 刘琦, E-mail: gyqiliu6071@sina.com

【摘要】 幽门螺杆菌感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要原因,且在远端胃腺癌和胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的发生中具有决定性致病作用。随着对幽门螺杆菌研究的不断深入,发现幽门螺杆菌与许多胃外疾病的发生发展有密切联系。文章对幽门螺杆菌与胃外疾病的研究进展进行综述。

【关键词】 幽门螺杆菌;胃外疾病;研究进展

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.03.024

Research progress of helicobacter pylori infection and extragastric diseases Zhang Huayang, Liu Qi. Department of Gastroenterology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Corresponding author: Liu Qi, E-mail: gyqiliu6071@sina.com

【Abstract】 Helicobacter pylori infection is the main cause of chronic gastritis and peptic ulcer, and plays a decisive role in the development of distal gastric adenocarcinoma and gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. With the development of research on Helicobacter pylori, it is found that Helicobacter pylori is closely related to the occurrence and development of many extragastric diseases. This paper reviews the research progress of Helicobacter pylori and extragastric diseases.

【Key words】 Helicobacter pylori; External stomach diseases; Research progress

幽门螺杆菌(helicobacter pylori, Hp)是人类常见的致病菌之一,在人群中具有较高的感染率。自1983年Marshall和Warren在微氧条件下首次从人体的胃黏膜活体标本中找到幽门螺杆菌, Hp感染一直是国内外学者研究的热点。近年来,随着对Hp的进一步研究,越来越多的临床研究表明, Hp感染还在许多胃肠外疾病(包括心脑血管疾病、血液系统疾病、皮肤疾病、神经系统疾病等)的发生、发展中起着一定的作用。

1 幽门螺杆菌感染与心血管疾病

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)由于血管内皮功能障碍与血管壁同时重建相关,伴随着血压升高,局部炎症状态和血液凝固;均趋向于动脉粥样硬化斑块形成,这些斑块不稳定且容易破裂。近期研究发现,合并幽门螺杆菌感染可能是导致冠心病患者斑块稳定性下降、脂质代谢紊乱加剧、炎症反应加重的重要因素之一^[1]。有学者认为幽门螺杆菌感染引起的慢性炎症反应是冠心病的危险因素之一,幽门螺杆菌在冠心病发病机制中的特殊作用被认为与其触发持续的慢性炎症状态有关,该状态在胃上皮细胞内存在,但也

可引起全身性炎症反应,但其炎症反应的机制暂不清楚^[2-3]。Hp特异性抗体(Hp-Ab)、抗Hp-CagA抗体(抗Hp-CagA-Ab)是反映Hp感染是否存在及严重程度的有效抗体,近期一项病例对照研究中^[4],以冠心病患者119例作为冠心病组、健康体检者100例作为正常对照组,发现冠心病组血清中Hp-IgG、抗Hp-CagA-IgG的含量均高于正常对照组,说明幽门螺杆菌感染导致冠心病发病风险增加,且具体含量与冠脉病变存在密切相关,另有研究发现^[5], HP感染者患冠心病风险明显增加,HP阳性患者冠心病风险为HP阴性患者的2.8倍,HP(+)CagA-IgG(-)患者冠心病风险为HP阴性患者的2.5倍,而HP(+)CagA-IgG(+)冠心病风险为HP阴性患者的3.3倍。

2 幽门螺杆菌感染与血液系统疾病

2.1 幽门螺杆菌感染与缺铁性贫血(IDA) 缺铁性贫血与幽门螺杆菌感染有关。幽门螺杆菌感染治疗指南表明,在幽门螺杆菌感染合并缺铁性贫血病例中应该根除幽门螺杆菌感染^[6]。幽门螺杆菌感染导致缺铁性贫血的机制尚不清楚,部分国内外学者认为,幽门

螺杆菌感染引发缺铁性贫血可能与幽门螺杆菌降低人体内维生素 C 浓度、引起胃上皮凋亡而影响铁吸收有关。Xu 等^[7]证明 Hp 感染使胃和十二指肠黏膜上皮溃疡、糜烂及功能紊乱,引起铁和含铁蛋白从胃和十二指肠黏膜中流失。Hershko 等^[8]证实 64% ~ 75% 的 IDA 和幽门螺杆菌感染患者在根除幽门螺杆菌后 IDA 完全消失。一项 Meta 分析指出,幽门螺杆菌根除治疗加铁治疗与单纯铁治疗比较,疗效更好^[9]。

2.2 幽门螺杆菌感染与特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 特发性血小板减少性紫癜是一种自身免疫性疾病,其特征是在没有其他原因的情况下出现孤立性血小板减少症。王旭萍等^[10]通过临床研究发现,ITP 患者根除幽门螺杆菌可使血小板计数增加,且根除成功率影响 ITP 患者血小板计数。而 Sheema 等^[11]也有相似的研究结果。研究发现^[12],ITP 患者幽门螺杆菌感染率为 62.5%,健康对照组幽门螺杆菌感染率为 38.3%,ITP 组幽门螺杆菌阳性率远高于对照组;而治疗组 25 例患者中治疗有效 22 例,对照组 25 例患者中治疗有效 16 例;且对照组复发率 52%,治疗组复发率 20%,表明幽门螺杆菌的根除对 ITP 的治疗和长期预后都有一定帮助。有关幽门螺杆菌感染导致 ITP 的致病机制尚未阐明,但根除幽门螺杆菌为 ITP 患者的治疗提供了一个全新的治疗方案。

3 幽门螺杆菌感染与皮肤疾病

3.1 幽门螺杆菌感染与酒渣鼻 酒渣鼻又称红斑痤疮,是与幽门螺杆菌感染最为相关的皮肤病之一。它是一种慢性面部皮炎,表现为红斑和皮肤病变,其特征是大量扩张的红色浅表毛细血管,称为毛细血管扩张,其病因尚不清楚。Gravina 等^[13]在 48.9% 的酒渣鼻患者中证实了幽门螺杆菌感染,而对照组中只有 26.7% 的患者感染幽门螺旋杆菌;且 96.9% 的患者在成功根除幽门螺杆菌后,红斑痤疮皮肤病变部分或完全消退。

3.2 幽门螺杆菌感染与慢性荨麻疹 慢性荨麻疹是指由各种因素致使皮肤、黏膜、血管发生暂时性炎性充血与组织内水肿,病程超过 6 周者称为慢性荨麻疹。病因常不确定。临床表现为不定时地在躯干、面部或四肢发生风团和斑块。发作从每日数次到数日一次不等。陈用军等^[14]证实,根除 HP 可提高慢性荨麻疹的治疗效果并减少复发。陈立勇等^[15]的研究结果表明,慢性荨麻疹患者的幽门螺杆菌感染率明显高于健康人群。杨静等^[16]的研究发现,慢性荨麻疹发病与 Hp 感染相关,幽门螺杆菌阳性患者联合抗 Hp 四联疗法有利于治疗慢性荨麻疹。但 Zhelezov 等^[17]提出由胃炎导致的慢性自发性荨麻疹,与 Hp 的存在无关。有关

幽门螺杆菌感染在慢性荨麻疹发病机制中的作用还不清楚,有研究者认为,幽门螺杆菌感染改变胃黏膜通透性,并使机体免疫应答失衡,从而显著增加了患者暴露于过敏原的风险。Hp 感染可加重 Th1/Th2 细胞的免疫反应失衡,使细胞免疫应答向 Th2 型漂移,Th1 细胞分泌的细胞因子抑制 IgE 分泌,而 Th2 细胞分泌的细胞因子可直接或间接促使 B 细胞合成 IgE 调节肥大细胞活性,加重或诱发荨麻疹,因此也有研究者认为^[18],Th1/Th2 功能失调和慢性荨麻疹存在很大关系,一旦机体的 Th1/Th2 平衡态遭到破坏,机体的免疫应答会产生偏离,从而导致过敏反应的产生。

4 幽门螺杆菌感染与神经系统疾病

4.1 幽门螺杆菌感染与阿尔茨海默病 阿尔茨海默病 (AD) 是一种起病隐匿、进行性发展的神经系统退行性疾病,病因迄今未明。65 岁以前发病者称早老性痴呆;65 岁以后发病者称老年性痴呆。Huang 等^[19]发现,幽门螺杆菌感染者发生 AD 的风险比未感染者高 1.6 倍。还有一些研究报道表示,根除幽门螺杆菌感染对 AD 的改善有积极影响^[20]。Kountouras 等^[21]通过比较幽门螺杆菌感染与非感染患者,发现 AD 和幽门螺杆菌感染的载脂蛋白 E (ApoE) 4 多态性患病率增加,而 ApoE 4 多态性是 AD 最强的遗传风险因子^[22]。关于幽门螺杆菌感染与神经病变之间的联系,Doulberis 等^[23]提出假设,幽门螺杆菌可能通过胃肠道的快速逆行神经通路进入大脑,导致神经变性。Wang 等^[24]将 HP 滤液注入大鼠或孵化鼠的神经母细胞瘤 N2a 细胞中,对其 Tau 蛋白磷酸化水平进行测定,结果显示 Hp 滤液可导致与 AD 相关的 Tau 蛋白磷酸化位点出现显著的过度磷酸化,推测 HP 可诱导 AD 样 Tau 超磷酸化而参与 AD 的发生发展。

4.2 幽门螺杆菌感染与帕金森病 帕金森病 (PD) 是由基底神经节系统黑质致密部的多巴胺能神经元退化引起的。Shen 等^[25]证明幽门螺旋杆菌感染可能与 PD 的风险相关。Huang 等^[26]的一项研究表明,幽门螺旋杆菌感染与 ≥60 岁的个体患 PD 的风险增加显著相关,但与 <60 岁的患者无关。幽门螺杆菌感染可能通过破坏十二指肠黏膜影响左旋多巴生物利用度,从而影响其治疗效果^[27]。根除感染与左旋多巴的生物利用度更高有关,并且与更好的临床效果相关^[28-29]。Hashim 等^[30]研究发现,根除幽门螺杆菌与左旋多巴联合治疗比单纯左旋多巴疗效更好。PD 与幽门螺杆菌的关联在文献报道中已得到广泛的研究与论述,幽门螺杆菌的根除对于 PD 的治疗和预后均有积极影响,但是幽门螺杆菌感染与 PD 发病机制的相关性有

待进一步阐明。

5 幽门螺杆菌感染与其他胃外疾病

5.1 幽门螺杆菌感染与糖尿病 幽门螺杆菌感染也被认为与糖脂代谢有关。但幽门螺杆菌感染在糖尿病(DM)中的作用仍具争议。Yang 等^[31]提出幽门螺杆菌感染与 DM 之间存在相关性。Horikawa 等^[32]发现,存在幽门螺杆菌感染的 DM 患者血糖控制更差。Karyar 等^[33]表示糖尿病患者幽门螺杆菌感染率高于正常人群。而 Narges 等^[34]研究表明, Hp 感染率在糖尿病患者与非糖尿病人群中差异无统计学意义。有研究指出幽门螺杆菌感染影响胰岛素受体与胰岛素结合,影响胰岛素的生物学效应^[35]。而 Alzahrani 等^[36]发现幽门螺杆菌感染对胰岛素敏感性分泌无关。因此,幽门螺杆菌感染与 DM 的相关性还需大样本的临床实验来进一步研究和证实。

5.2 幽门螺杆菌感染与慢性阻塞性肺疾病 幽门螺杆菌感染与慢性阻塞性肺疾病(COPD)的关联已被部分学者认同。蔡树冰^[37]研究发现,COPD 患者幽门螺杆菌感染率高于正常人群,幽门螺杆菌感染可能是 COPD 的独立致病因素。何静江等^[38]也有相似的实验结论,并认为幽门螺杆菌感染能导致肺功能恶化使血氧饱和度降低。王慧敏等^[39]以大鼠为研究对象,发现幽门螺杆菌感染可加重慢性阻塞性肺疾病的炎症反应。Eisa 等^[40]证实慢性阻塞性肺疾病与幽门螺杆菌感染密切相关。

综上所述,许多胃外疾病与幽门螺杆菌感染有关。然而,大多数临床研究样本量较小,其中有许多混杂及偏倚,因此无法确定因果关系;幽门螺杆菌感染导致胃外疾病的具体发病机制也仍不十分清楚。未来的研究可进一步深入研究幽门螺杆菌感染与胃外疾病的关系,阐明幽门螺杆菌诱发或促进胃外疾病的机制,为一些疾病的预防、治疗和预后提供更有效的方案和新的手段。

参考文献

- [1] 黄勇,李蔚华,尹虹,等. 冠心病患者幽门螺杆菌感染与斑块特征、脂代谢、炎症反应的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志,2019,27(8):713-717. DOI:10.3969/j. issn. 1007-3949. 2019. 08. 013.
- [2] Chmiela M, Gajewski A, Rudnicka K. Helicobacter pylori vs coronary heart disease - searching for connections[J]. World J Cardiol, 2015,7(4):187-203. DOI: 10.4330/wjc. v7. i4. 187.
- [3] Rozankovic PB, Huzjan AL, Cupic H, et al. Influence of CagA-positive Helicobacter pylori strains on atherosclerotic carotid disease[J]. J Neurol, 2011, 258(5):753-761. DOI: 10.1007/s00415-010-5824-9.
- [4] 于伟,赵娜. 冠心病患者血清中 Hp 特异性抗体、抗 Hp-CagA 抗体与冠脉病变的相关性[J]. 海南医学院学报,2018,24(17):

- 1543-1546. DOI:10.13210/j. cnki. jhmu. 20180829. 002.
- [5] 钟巧玲. 幽门螺杆菌感染类型与冠心病发生、冠脉斑块类型及临床预后的关系研究[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(23):3328-3329. DOI:10.3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 23. 041.
- [6] Malfertheiner P, Megraud F, O' Morain CA, et al. Management of helicobacter pylori infection-the maastricht v/florence consensus report[J]. Gut, 2017,66(1):6-30. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
- [7] Xu MY, Cao B, Yuan BS, et al. Association of anaemia with Helicobacter pylori infection: A retrospective study[J]. Sci Rep, 2017,7(1):13434. DOI: 10.1038/s41598-017-13955-3.
- [8] Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia[J]. Blood, 2014,123(3):326-333. DOI: 10.1182/blood-2013-10-512624.
- [9] Hudak L, Jaraisy A, Haj S, et al. An updated systematic review and meta-analysis on the association between Helicobacter pylori infection and iron deficiency anemia[J]. Helicobacter, 2017,22(1):32-43. DOI: 10.1111/hel. 12330.
- [10] 王旭萍,孙晓红,冀清香. 幽门螺杆菌根除治疗对特发性血小板减少性紫癜患者血小板计数的影响[J]. 山西医药杂志,2019,48(6):711-713. DOI:10.3969/j. issn. 0253-9926. 2019. 06. 031.
- [11] Sheema K, Ikramdin U, Aishi N, et al. Role of Helicobacter pylori eradication therapy on platelet recovery in chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. Gastroenterol Res Pract, 2017,2017:9529752. DOI: 10.1155/2017/9529752.
- [12] 李桂水,杨敏敏,边连朵,等. 抗幽门螺杆菌治疗在特发性血小板减少性紫癜治疗中的临床意义[J]. 医药导报,2016,35(21):15-16. DOI:10.3870/j. issn. 1004-0781. 2016. z1. 007.
- [13] Gravina A, Federico A, Ruocco E, et al. Helicobacter pylori infection but not small intestinal bacterial overgrowth may play a pathogenic role in rosacea[J]. United European Gastroenterol J, 2015,3(1):17-24. DOI: 10.1177/2050640614559262.
- [14] 陈用军,石年,王建. 幽门螺杆菌感染与慢性荨麻疹的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志,2016,30(3):257-258. DOI: 10.13735/j. ejdv. 1001-7089. 201508111.
- [15] 陈立勇,张静,陈尊义,等. 慢性荨麻疹与幽门螺杆菌感染相关性探究[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(4):146-148. DOI:10.3969/j. issn. 1671-7414. 2018. 04. 041.
- [16] 杨静,孙兆伟,石钢. 幽门螺杆菌感染与慢性荨麻疹发病的关系分析[J]. 医学临床研究,2016,33(6):1138-1140,1143. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-7171. 2016. 06. 031.
- [17] Zheleznev S, Urzhumtseva G, Petrova N, et al. Gastritis can cause and trigger chronic spontaneous urticaria independent of the presence of helicobacter pylori[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018,175(4):246-251. DOI: 10.1159/000487669.
- [18] Varghese R, Rajappa M, Chandrashekar L, et al. Association among stress, hypocortisolism, systemic inflammation, and disease severity in chronic urticaria[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2016,116(4):344-348. DOI: 10.1016/j. anai. 2016. 01. 016.
- [19] Huang WS, Yang TY, Shen WC, et al. Association between Helicobacter pylori infection and dementia[J]. J Clin Neurosci, 2014,21(8):1355-1358. DOI: 10.1016/j. jocn. 2013. 11. 018.

- [20] Goni E, Franceschi F. Helicobacter pylori and extragastric diseases [J]. Helicobacter, 2016, 21 (Suppl 1) : 45-48. DOI: 10.1111/hel.12340.
- [21] Kountouras J, Tsolaki F, Tsolaki M, et al. Helicobacter pylori-related ApoE 4 polymorphism may be associated with dysphagic symptoms in older adults [J]. Dis Esophagus, 2016, 29 (7) : 842. DOI: 10.1111/dote.12364.
- [22] Santos CY, Snyder PJ, Wu WC, et al. Relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis [J]. Alzheimers Dement (Amst), 2017, 7: 69-87. DOI: 10.1016/j.dadm.2017.01.005.
- [23] Douberis M, Kotronis G, Thomann R, et al. Review: Impact of Helicobacter pylori on Alzheimer's disease: What do we know so far [J]. Helicobacter, 2018, 23 (1) : e12454. DOI: 10.1111/hel.12454.
- [24] Wang XL, Zeng J, Yang Y, et al. Helicobacter pylori filtrate induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating glycogen synthase kinase-3 β [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 43 (1) : 153-165. DOI: 10.3233/JAD-140198.
- [25] Shen X, Yang H, Wu Y, et al. Meta-analysis: Association of Helicobacter pylori infection with Parkinson's diseases [J]. Helicobacter, 2017, 22 (5) : e12398. DOI: 10.1111/hel.12398.
- [26] Huang HK, Wang JH, Lei WY, et al. Helicobacter pylori infection is associated with an increased risk of Parkinson's disease: A population-based retrospective cohort study [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2018, 47: 26-31. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.11.331.
- [27] Fasano A, Bove F, Gabrielli M, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2013, 28 (9) : 1241-1249. DOI: 10.1002/mds.25522.
- [28] Tan AH, Mahadeva S, Marras C, et al. Helicobacter pylori infection is associated with worse severity of Parkinson's disease [J]. Parkinsonism Relat Disord, 2015, 21 (3) : 221-225. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2014.12.009.
- [29] Mridula KR, Borgohain R, Chandrasekhar Reddy V, et al. Association of Helicobacter pylori with Parkinson's Disease [J]. J Clin Neurol, 2017, 13 (2) : 181-186. DOI: 10.3988/jcn.2017.13.2.181.
- [30] Hashim H, Azmin S, Razlan H, et al. Eradication of Helicobacter pylori infection improves levodopa action, clinical symptoms and quality of life in patients with Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2014, 9 (11) : e112330. DOI: 10.1371/journal.pone.0112330.
- [31] Yang GH, Wu JS, Yang YC, et al. Gastric Helicobacter pylori infection associated with risk of diabetes mellitus, but not prediabetes [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29 (10) : 1794-1799. DOI: 10.1111/jgh.12617.
- [32] Horikawa C, Kodama S, Fujihara K, et al. High risk of failing eradication of Helicobacter pylori in patients with diabetes: A meta-analysis [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 106 (1) : 81-87. DOI: 10.1016/j.diabres.2014.07.009.
- [33] Kayar Y, Pamukcu O, Eroglu H, et al. Relationship between helicobacter pylori infections in diabetic patients and inflammations, metabolic syndrome, and complications [J]. Int J Chronic Dis, 2015, 26 (8) : 290128. DOI: 10.1155/2015/290128.
- [34] Narges S, Seyed H, Javad S, et al. Helicobacter pylori infection and metabolic parameters: is there an association in elderly population [J]. International journal of preventive medicine, 2014, 5 (12) : 1537-1542.
- [35] Upala S, Sanguankee A. Association between Helicobacter pylori infection and insulin resistance: A meta-analysis [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2016, 32 (2) : 176-177. DOI: 10.1002/dmrr.2733.
- [36] Alzahrani S, Nelson J, Moss SF, et al. H. pylori seroprevalence and risk of diabetes: An ancillary case-control study nested in the diabetes prevention program [J]. J Diabetes Complications, 2017, 31 (10) : 1515-1520. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2017.05.015.
- [37] 蔡树冰. 幽门螺杆菌感染与慢性阻塞性肺疾病的相关性 [J]. 广东医学, 2016, 37 (22) : 117-118.
- [38] 何静江, 王晓莉, 杨伟等. 慢性阻塞性肺疾病与幽门螺杆菌感染关系探讨 [J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39 (10) : 920-921. DOI: 10.13621/j.1001-5949.2017.09.0920.
- [39] 王慧敏, 戈改真, 贺丽琼. 幽门螺杆菌感染对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症因子的影响 [J]. 中国医药科学, 2017, 7 (21) : 31-33. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0616.2017.21.007.
- [40] Eisa SA, Almehy GF, Eisa HA, et al. Study of the Helicobacter pylori infection in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Egypt J Chest Dis Tuberc, 2016, 65 (3) : 567-571. DOI: 10.1016/j.ejcdt.2016.04.004.

(收稿日期: 2019-11-04)

(上接 320 页)

- [31] Rudzitis Auth J, Nenicu A, Nickels RM, et al. Estrogen stimulates homing of endothelial progenitor cells to endometriotic lesions [J]. Am J Pathol, 2016, 186 (8) : 2129-2142. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.04.004.
- [32] Symons LK, Miller JE, Kay VR, et al. The immunopathophysiology of endometriosis [J]. Trends Mol Med, 2018, 24 (9) : 748-762. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.07.004.
- [33] Greaves E, Temp J, Ensal-Zufiurre A, et al. Estradiol is a critical mediator of macrophage-nerve cross talk in peritoneal endometriosis [J]. Am J Pathol, 2015, 185 (8) : 2286-2297. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.04.012.
- [34] Maia Jr H, Haddad C, Coelho G, et al. Role of inflammation and aromatase expression in the eutopic endometrium and its relationship with the development of endometriosis [J]. Womens Health (Lond Engl), 2012, 8 (6) : 647-658. DOI: 10.2217/whe.12.52.
- [35] Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, et al. Role of estrogen receptor- β in endometriosis [J]. Semin Reprod Med, 2012, 30 (1) : 39-45. DOI: 10.1055/s-0031-1299596.
- [36] Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, et al. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 795976. DOI: 10.1155/2015/795976.

(收稿日期: 2019-10-24)