



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
国内外公开发行人
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

- 青老年急性心肌梗死患者临床危险因素及发病节律性的比较性研究
..... 牛文豪 伍锋 赵馨娜 王家美 贺治青 楚杨
王新 纪瑞圳 梁春 325
- 血清 YKL-40 预测呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的价值
..... 杨庆玲 白小燕 刘诗兰 李文娟 范筱艾 刘波 陈梅 包勇 330
- 腔内治疗急性 DVT 合并急性肺栓塞效果及对血栓清除情况观察
..... 刘琳 朱红江 张燕 杨志勇 刘明阳 335
- 拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学及安全性评价
..... 田文静 孙祖真 马倩倩 杨燕 339
- 慢性肾脏病患者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标水平变化
及其临床意义
..... 方纪林 蒋红利 李向东 李毅 赵明 沈海燕 344
- 老年终末期肾病患者腹膜透析对肾功能及心功能的影响
..... 热孜万古丽·阿布都拉 贾依娜西·阿扎提 姜鸿 赛福丁·木沙 349
- 沙格列汀联合缬沙坦对早期 2 型糖尿病肾病患者炎性指标
与肾功能的影响
..... 张彤 凌宏威 应长江 赵越 程雪 韩啸 郭凯
张闫 张梅 李伟 353
- 津力达颗粒对 2 型糖尿病患者胰岛功能及脂代谢的影响
..... 赵晓娟 权青云 张瑜 张贵云 张克举 王建国 358
- 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达及其与 Th17/Treg 的
相关性分析 周伟清 庄一心 沈卫星 沈育锋 章平 362
- 白血病患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化
及 mRNA 表达分析 韩松 侯志新 刘承祥 张雷 郑伟 367

瑞芬太尼调控 miR-148a 对骨肉瘤细胞生物行为的影响	孟杨 王绍伟 王宪峰 徐海伟	371
痛风合并糖调节受损男性患者氧化低密度脂蛋白、炎性因子水平与颈动脉粥样硬化的关系	李敏 郭毅飞 龚丽 李雪锋	376
血清肿瘤标记物检测在系统性红斑狼疮诊断中的价值	龙洁 魏萌	381
红花黄色素联合倍他司汀对突发性耳聋患者听阈水平、血液流变学及血脂指标的影响	文科 侯楠 陈嘉	385
SIX1 和 TGF-β 对原代人喉鳞癌细胞上皮—间质转化的影响	张继华 董凯峰 苏静 李丹 田君海	389
论著·基础		
人参多糖对脑出血模型大鼠的干预效果及对海马区细胞凋亡的影响	郑希院 翟洁敏 李会琪 赵龙斌 高章代	394
基于 16S rRNA 测序技术初步探讨多囊卵巢综合征大鼠肠道菌群多样性	肖慧 刘艳霞 征征 邢雅雯 邢玉	399
罕见病例		
以贫血为首发症状的显微镜下多血管炎 1 例	杨艳君 张东风	406
血小板增多合并假性高钾血症 1 例	高雄一 顾恪波 王秋风 高琳	407
综 述		
小檗碱在抗动脉粥样硬化中的作用机制研究进展	杨蒙香 张乐 刘聪	409
全膝关节置换术金属植入物并发症的研究进展	韩广弢 高冯 李皓桓	413
氧化应激作用在子痫前期发病机制中的研究进展	李嘉健 孙晓燕	417
肺表面活性蛋白 A 在肺外疾病免疫炎性反应中的作用研究进展	赵正 杨雪 赵敏	423
MYH9 相关疾病基因型与表型相关性治疗策略的研究进展	连晓强 刘小军 郝冀洪	428
作者·编者·读者		348

期刊基本参数: CN13-1316/R * 2002 * m * A4 * 112 * zh * P * ¥12.00 * 4 500 * 24 * 2020-04

本期责任编辑: 孙治安 英文编辑: 马晓海

CHINESE JOURNAL OF DIFFICULT AND COMPLICATED CASES

Monthly

Established in June 2002

Volume 19, Number 4

18 April, 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

A comparative study of clinical risk factors and rhythm of onset in young and old patients with acute myocardial infarction

..... Niu Wenhao, Wu Feng, Zhao Xinna, et al 325

The value of serum YKL-40 in predicting 28 day mortality of patients with ventilator-associated pneumonia

..... Yang Qingling, Bai Xiaoyan, Liu Shilan, et al 330

Endovascular treatment of acute DVT with acute pulmonary embolism and observation of thrombus clearance

..... Liu Lin, Zhu Hongjiang, Zhang Yan, et al 335

Pharmacokinetic and safety evaluation of laccase in the treatment of partial seizure

..... Tian Wenjing, Sun Zuzhen, Ma Qianqian, et al 339

Changes and clinical significance of serum 25 (OH) D, IGF-1 and osteoporosis in patients with chronic kidney disease

..... Fang Jilin, Jiang Hongli, Li Xiangdong, et al 344

Effect of peritoneal dialysis on renal function and cardiac function in elderly patients with end-stage renal disease

..... Gazvankuli Abdullah, Jiyinaxi Azhati, Jiang Hong, et al 349

The effect of combination of salaglipitin and valsartan on inflammatory index and renal function in patients with early type 2 diabetic nephropathy

..... Zhang Tong, Ling Hongwei, Ying Changjiang, et al 353

Effect of Jinlida granule on islet function and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus

..... Zhao Xiaojuan, Quan Qingyun, Zhang Yu, et al 358

The correlation between the expression of let-7e, miR-142 and Th17/Treg in patients with thyroid cancer

..... Zhou Weiqing, Zhuang Yixin, Shen Weixing, et al 362

Abnormal methylation and mRNA expression of promoter regions of ID4, hMLH1 and CDX2 genes in leukemia patients

..... Han Song, Hou Zhixin, Liu Chengxiang, et al 367

Effect of remifentanyl on the biological behavior of osteosarcoma cells by regulating miR-148a	Meng Yang, Wang Shaowei, Wang Xianfeng, et al	371
The relationship between oxidized LDL, inflammatory factors and carotid atherosclerosis in male patients with gout and impaired glucose regulation	Li Min, Guo Yifei, Gong Li, et al	376
The value of tumor marker detection in assisting diagnosis of systemic lupus erythematosus	Long Jie, Wei Meng	381
Effect of carthamin yellow combined with betahistine on hearing threshold, hemorheology and blood lipid in patients with sudden deafness	Wen Ke, Hou Nan, Chen Jia	385
Effect of SIX1 and TGF-β on epithelial-mesenchymal transition in the human laryngeal squamous cell of primary cultured	Zhang Jihua, Dong Kaifeng, Su Jing, et al	389
Original Article; Basic Research		
Effect of ginseng polysaccharide on apoptosis in the hippocampus of rats with cerebral hemorrhage	Zheng Xiyuan, Zhai Jiemin, Li Huiqi, et al	394
The preliminary study of gut microbiota in polycystic ovary syndrome rat model by 16S rRNA technique	Xiao Hui, Liu Yanxia, Zheng Zheng, et al	399
Rare Case Report		
Microscopic polyangiitis with initial symptom of anemia: a case report	Yang Yanjun, Zhang Dongfeng	406
Thrombocytosis complicated with pseudohyperkalemia: a case report	Gao Xiongyi, Gu Kebo, Wang Qiufeng, et al	407
Review		
Mechanism research progress of berberine in anti-atherosclerosis.	Yang Mengxiang, Zhang Le, Liu Cong	409
Research progress of complications of metal implants in total knee arthroplasty	Han Guangtao, Gao Feng, Li Haohuan	413
Research progress of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia	Li Jiajian, Sun Xiaoyan	417
Research progress of surfactant protein A-involved immune inflammatory responses in extrapulmonary diseases	Zhao Zheng, Yang Xue, Zhao Min	423
Researches progress on the correlation between genotype and phenotype of MYH9 related disorders and treatment strategies	Lian Xiaoqiang, Liu Xiaojun, Hao Jihong	428

青老年急性心肌梗死患者临床危险因素及发病节律性的比较性研究

牛文豪, 伍锋, 赵馨娜, 王家美, 贺治青, 楚杨, 王新, 纪瑞圳, 梁春

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(91539118, 81611130092)

作者单位: 200001 上海市第二军医大学长征医院心血管内科

通信作者: 梁春, E-mail: chunliang@smmu.edu.cn

【摘要】目的 观察青老年急性心肌梗死患者临床危险因素及发病节律性变化。方法 收集自 2016 年 9 月—2018 年 6 月上海 4 所三甲医院收治入院的急性心肌梗死患者 423 例作为研究对象, 最终纳入研究 380 例, 青年患者(年龄 ≤ 45 岁)143 例, 老年患者(年龄 ≥ 65 岁)237 例; 分析青老年急性心肌梗死患者的危险因素及发病节律模式。结果 与老年患者比较, 青年心肌梗死患者中男性和吸烟的比例及血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和三酰甘油浓度更高($t/\chi^2 = 28.500, 65.685, 92.084, 2.680, 3.720, 4.277, P$ 均 <0.001); 上午(06:01~12:00)青年患者较老年患者更易发生急性心肌梗死。Logistic 回归分析示, 男性、高血压病史、糖尿病病史、卒中病史、冠心病家族史和吸烟史是青老年急性心肌梗死患者的危险因素($P<0.05$)。结论 男性和吸烟是青年心肌梗死患者的主要危险因素, 青年患者容易在上午罹患急性心肌梗死。

【关键词】 心肌梗死; 急性; 临床特点; 危险因素; 昼夜节律; 青年人; 老年人

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.001

A comparative study of clinical risk factors and rhythm of onset in young and old patients with acute myocardial infarction

Niu Wenhao, Wu Feng, Zhao Xinna, Wang Jiamei, He Zhiqing, Chu Yang, Wang Xin, Ji Ruizhen, Liang Chun.

Department of Cardiology, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200001, China

Corresponding author: Liang Chun, E-mail: chunliang@smmu.edu.cn

【Abstract】Objective To observe the clinical risk factors and the rhythmic changes of the onset of acute myocardial infarction in young and old patients. Methods From September 2016 to June 2018, 423 patients with acute myocardial infarction admitted to four top three hospitals in Shanghai were collected as research objects, and 380 patients were finally included in the study, 143 young patients (age ≤ 45 years old) and 237 old patients (age ≥ 65 years old). To analyze the risk factors and rhythm pattern of young and old patients with acute myocardial infarction. Results Compared with the elderly patients, the proportion of men and smokers, the concentration of serum total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and triacylglycerol in the young patients with myocardial infarction were higher ($t/\chi^2 = 28.500, 65.685, 92.084, 2.680, 3.720, 4.277, P<0.001$); the young patients were more likely to have acute myocardial infarction in the morning (06:01-12:00). Logistic regression analysis showed that male, history of hypertension, history of diabetes, history of stroke, family history of coronary heart disease and history of swallowing were the risk factors of young and old patients with acute myocardial infarction ($P<0.05$). Conclusion Men and smoking are the main risk factors of young patients with myocardial infarction, young patients are prone to suffer from acute myocardial infarction in the morning.

【Key words】 Myocardial infarction, acute; Clinical characteristics; Risk factors; Circadian rhythm; Youth; Elderly

急性心肌梗死(AMI)是全世界导致死亡的主要疾病之一。近年来该病在青年人群,特别是发展中国家的青年人群中发病率迅速上升。研究数据显示,45岁以下的急性心肌梗死患者占有急性心肌梗死病例的10%以上^[1]。但目前针对我国青年心肌梗死患者的

临床数据、发病节律模式等信息仍匮乏。

据国外研究报道,青年心肌梗死患者的临床特征与老年心肌梗死患者不同。首先,男性、重度吸烟、饮酒、超重、高胆固醇血症、家族早发冠心病史是青年心肌梗死患者中常见危险因素。此外在该人群中常见冠

状动脉非阻塞性狭窄病变和单支血管病变,非 ST 段抬高型心肌梗死发病率也较高^[1-3]。同时有国外研究也显示,青年人群心肌梗死发作时间具有独特的发病模式,表现出晨起或夜间高峰等发病节律模式^[4-5]。但目前针对我国青年心肌梗死研究仍较少,并且缺乏对相关人群疾病发作昼夜节律模式的探讨。因此,本研究旨在揭示近年来青年心肌梗死患者临床特征和昼夜节律发病模式的改变情况,为该类患者的临床治疗提供理论依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2016 年 9 月—2017 年 9 月中国胸痛中心认证的 4 家上海三甲医院(上海长征医院、上海同济医院、上海胸科医院及上海东方医院)诊治的急性心肌梗死患者 423 例临床资料,患者均接受经皮冠状动脉介入治疗(PCI)。根据世界卫生组织指南,患者按年龄分为 2 组,≤45 岁为年轻心肌梗死患者,≥65 岁为老年心肌梗死患者。本研究经医院伦理委员会审查,符合 1964 年《赫尔辛基宣言》伦理标准,患者或家属知情同意并签署同意书。

1.2 诊断/排除标准 AMI 的诊断标准:(1)心肌坏死标志物如肌钙蛋白或肌酸激酶等存在动态变化;(2)心肌缺血性症状(主要为压榨性胸痛持续>30 min);(3)心电图呈明显心肌缺血改变(ST 段抬高或至少有 2 个导联压低)。排除标准:(1)伴有严重的心肌病、风湿性心脏病;(2)陈旧性心肌梗死、住院信息不完整患者;(3)罹患严重的先天性心脏病、线粒体脑肌病;(4)目前罹患肿瘤或存在恶性肿瘤病史;(5)正在服用避孕药的女性或妊娠妇女;(6)非冠状动脉斑块破裂阻塞所引起的急性心肌梗死或其他部位疾病直接导致冠状动脉血流中断所致的心肌梗死;(7)患者存在精神问题不能配合治疗及检查;(9)主管医生认为其不适于参加该项研究。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 临床特征:收集患者基本信息、临床资料及 AMI 发作时间等。将青老年心肌梗死患者按 24 小时分 4 组(00:01~06:00, 06:01~12:00, 12:01~18:00, 18:01~24:00)。

1.3.2 影像学检查:收集患者经皮冠状动脉造影信息,包括病变血管类型、病变血管支数及植入支架数目等,并计算青老年心肌梗死患者 Gensini 评分。

1.3.3 血液生化检查:收集患者急诊入院或术后 24 小时内的血常规、肝肾功能及电解质等信息,以评估患者疾病转归及进展。

1.4 指标判定标准 吸烟史定义为存在吸烟>1 年,

戒烟>10 年被认为未吸烟;吸烟者又分为目前吸烟者(定义为持续>1 个月)和既往吸烟者。根据 2016 年 ESC/EAS 血脂异常处理指南,高胆固醇血症为总胆固醇(TC)>5.72 mmol/L 或低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)>3.37 mmol/L 或目前服用降脂药物。高血压定义为肱动脉收缩压≥140 mmHg 和/或舒张压≥90 mmHg 或目前服用降压药物。糖尿病定义为存在糖尿病症状(多饮、多食、多尿)伴随机血糖≥11.1 mmol/L 或空腹血糖≥7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖≥11.1 mmol/L。根据 2012 年 ESC 指南,冠心病家族史定义为父母一方或双方罹患冠心病。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;偏态分布变量以中位数(四分位数)表示,采用非参数检验比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青老年患者临床特征比较 本研究共收集确诊为急性心肌梗死患者 423 例的临床信息。43 例患者因基本信息不完善、非冠状动脉闭塞性心肌梗死而被排除研究。最终 143 例(37.63%)青年心肌梗死患者、237 例(62.37%)老年心肌梗死患者被纳入研究。

青年心肌梗死患者多为男性,其中既往吸烟者和目前吸烟者所占比例、入院 Killip1 级比例均高于老年组。青年患者 β 受体阻滞剂、ACEI/ARB 和他汀类应用率较老年患者高。而入院 Killip 分级中 2、3、4 级例数和出院 Killip 分级中 2、4 级例数等指标在老年组中较高,且老年患者住院病死率较高,住院时间较长,见表 1。

2.2 青老年患者影像学检查特点比较 冠状动脉造影显示,单支冠状动脉病变/支架植入支数及较低的 Gensini 评分在青年组更常见。2 组患者以左前降支为罪犯血管比较差异无统计学意义($P > 0.05$),老年患者以 LM、LCX、RCA 为罪犯血管更为常见($P < 0.05$),见表 2。心脏超声显示青年患者左室舒张末期内径(LVEDD)较高,而老年组则室壁瘤患病率较高($P < 0.01$),见表 3。

2.3 青老年患者血液生化指标比较 青年患者 TC、TG 和 LDL-C 浓度均高于老年患者($P < 0.01$),青年患者 SCr 水平较老年患者高,但 2 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

2.4 青老年患者发病节律性比较 在清晨 00:01~06:00 起病青年患者 18 例,老年患者 34 例;06:01~12:00 青年患者 74 例,老年患者 28 例;12:01~18:00

表 1 青老年心肌梗死患者临床特点比较 [例(%)]

临床特点	青年患者(<i>n</i> = 143)	老年患者(<i>n</i> = 237)	t/χ^2 值	<i>P</i> 值
男性	137(95.80)	176(74.26)	28.500	<0.001
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	39.45 ± 4.89	76.34 ± 7.37	-53.202	<0.001
心血管危险因素				
吸烟	98(68.53)	62(26.16)	65.685	<0.001
目前吸烟者	96(63.64)	36(15.61)	92.084	<0.001
既往吸烟者	2(4.90)	26(10.55)	3.696	0.058
脑卒中病史	1(0.70)	47(19.83)	29.581	<0.001
心律失常病史	10(6.99)	30(12.66)	3.039	0.087
高血压病史	52(36.36)	169(71.31)	44.754	<0.001
高脂血症病史	15(10.49)	40(16.88)	2.940	0.099
糖尿病史	18(12.59)	92(38.82)	29.836	<0.001
冠心病家族史	5(3.50)	20(8.44)	3.545	0.086
目前用药				
阿司匹林	135(94.41)	218(91.98)	0.793	0.417
氯吡格雷	115(80.42)	182(76.79)	0.687	0.444
β受体阻滞剂	113(79.02)	164(69.20)	4.355	0.043
ACEI/ARB 类药物	108(75.52)	141(59.49)	10.146	0.002
他汀类	129(90.21)	171(72.15)	17.498	<0.001
利尿剂	2(1.40)	77(32.49)	52.353	<0.001
Killip 分级(入院)				
1 级	129(90.21)	78(32.91)	118.069	<0.001
2 级	8(5.59)	73(30.80)	33.788	<0.001
3 级	2(1.40)	43(18.14)	23.954	<0.001
4 级	4(2.80)	43(18.14)	19.379	<0.001
Killip 分级(出院)				
1 级	137(95.80)	193(81.43)	16.117	<0.001
2 级	1(0.70)	18(7.59)	8.928	0.002
3 级	1(0.70)	4(1.69)	0.671	0.654
4 级	4(2.80)	22(9.28)	5.885	0.010
病死	4(2.80)	22(9.28)	5.885	0.019
住院天数($\bar{x} \pm s$, d)	6.76 ± 2.80	9.81 ± 4.59	-7.114	<0.001

表 2 青老年心肌梗死患者冠脉造影特点比较 [例(%)]

项 目	青年患者 (<i>n</i> = 143)	老年患者 (<i>n</i> = 237)	t/χ^2 值	<i>P</i> 值
病变血管				
LM	4(2.80)	21(8.86)	5.335	0.031
LAD	102(71.33)	171(72.15)	0.030	0.906
LCX	51(35.66)	159(67.09)	35.623	<0.001
RCA	56(39.16)	164(69.20)	33.011	<0.001
病变血管支数				
0	16(11.19)	38(16.03)	1.717	0.226
1	69(48.25)	25(10.55)	68.097	<0.001
2	30(20.98)	54(22.78)	0.169	0.704
3	28(19.58)	120(50.63)	36.167	<0.001
支架植入支数				
0	24(16.78)	74(31.22)	9.717	0.002
1	96(67.13)	100(42.19)	22.210	<0.001
2	19(13.29)	45(18.99)	2.069	0.160
3	4(2.80)	14(5.91)	1.912	0.216
4	0	4(1.69)	2.439	0.302
Gensini($\bar{x} \pm s$, 分)	47.5 ± 32.4	64.3 ± 39.1	-3.540	<0.001

注:LM. 左主干;LAD. 左冠状动脉;LCX. 左前降支;RCA. 右冠状动脉

青年患者 14 例,老年患者 105 例;18:01 ~ 24:00 青年患者 37 例,老年患者 70 例。上述结果显示,在 06:01 ~ 12:00 为青年患者发作高峰,老年患者则在 12:01 ~ 18:00 存在心肌梗死发病高峰,见图 1。

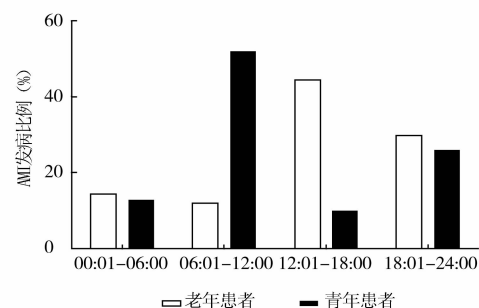


图 1 青老年心肌梗死患者发病节律性模式比较

2.5 青老年心肌梗死危险因素 Logistic 回归分析 对青老年心肌梗死患者的危险因素 Logistic 回归分析显示,性别、高血压病史、糖尿病病史、脑卒中病史、冠心病家族史是心肌梗死患者的危险因素,见表 5。

表 3 青老年心肌梗死患者心脏超声特点比较 [例(%)]

项 目	青年患者(<i>n</i> = 100)	老年患者(<i>n</i> = 213)	<i>t</i> / <i>χ</i> ² 值	<i>P</i> 值
LVEDD (mm)	51.87 ± 5.41	48.68 ± 5.97	4.318	<0.001
LVEF (%)	61.47 ± 10.44	59.04 ± 11.54	1.713	0.088
RVMA	61 (61.00)	104 (48.83)	4.046	0.052
二尖瓣反流	45 (45.00)	99 (46.48)	0.060	0.903
心室壁瘤	2 (2.00)	32 (15.02)	11.921	<0.001

注:LVEDD.左心室舒张末期径;LVEF.左室射血分数;RVMA.左室壁节段性运动异常

表 4 青老年心肌梗死患者实验室指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

实验室指标	青年患者(<i>n</i> = 143)	老年患者(<i>n</i> = 237)	<i>t</i> / <i>χ</i> ² 值	<i>P</i> 值
TC (mmol/L)	4.69 ± 1.01	4.33 ± 1.24	2.680	0.008
TG (mmol/L)	2.15 ± 1.25	1.54 ± 1.19	4.277	<0.001
LDL-C (mmol/L)	3.14 ± 0.85	2.71 ± 1.04	3.720	<0.001
HDL-C (mmol/L)	0.98 ± 0.28	1.03 ± 0.35	-1.828	0.068
BNP (pg/ml) *	312.00 (12.00, 891.55)	1 980.00 (547.00, 5 664.00)	-7.780	<0.001
cTNI (ng/ml) *	1.85 (0.92, 10.04)	3.39 (1.09, 11.22)	-0.639	0.523
SCr (μmol/L)	82.31 ± 60.75	80.69 ± 87.68	-0.940	0.366

注:*非正态分布采用中位数(四分位数)表示

表 5 青老年心肌梗死患者危险因素 Logistic 回归分析

变 量	<i>β</i> 值	<i>SE</i> 值	<i>Wald</i> 值	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值(95% <i>CI</i>)
性别	-1.246	0.479	6.776	0.009	0.288 (0.112 ~ 0.735)
高血压史	0.997	0.272	13.446	0.000	2.711 (1.591 ~ 4.619)
糖尿病史	1.100	0.334	10.850	0.001	3.003 (1.561 ~ 5.777)
脑卒中史	3.142	1.036	9.195	0.002	23.148 (3.038 ~ 176.386)
冠心病家族史	1.346	0.583	5.326	0.021	3.841 (1.225 ~ 12.045)

3 讨 论

3.1 吸烟对青年急性心肌梗死发病的影响 大量研究表明,吸烟可能是急性心肌梗死最危险因素,同时也是各年龄组急性心肌梗死发作的独立危险因素。国外研究也发现,吸烟是 40 岁以下年轻急性冠状动脉综合征主要危险因素^[5]。青年心肌梗死患者吸烟率波动于 51% ~ 89%^[6]。本研究与国外研究结果相似,也显示吸烟在青年罹患心肌梗死者中更普遍。

烟草烟雾的成分通过多种机制如血流动力学障碍、内皮功能障碍、血栓形成、炎症反应、脂质代谢异常和心律失常等影响急性心肌梗死发生^[7]。烟草诱导动脉粥样硬化和其后的局部缺血确切机制尚不完全清楚。现认为氧化应激和血管内皮功能障碍是潜在共同机制^[8]。烟草主要通过尼古丁和一氧化碳对心血管系统产生有害影响。尼古丁可以加速儿茶酚胺释放,导致冠状动脉内膜损伤、血管痉挛和血小板聚集性升高而最终导致冠状动脉血流减少,发生急性心肌梗死^[9]。另一方面,一氧化碳使细胞氧代谢受阻,动脉内膜损伤,同时也会使血小板聚集性增加^[10-11]。而且与非吸烟者相比,吸烟者血管舒张功能明显受损,表明

烟源性毒素参与了内皮功能障碍^[12],卷制香烟和水烟中多环芳族烃和挥发性醛苯含量均较高,后者尤其甚^[13]。

研究显示,戒烟可使全因死亡率降低 36%,非致死性心肌梗死的相对风险降低 32%。而同时戒烟对降低 CVD 风险有益,戒烟 24 h 内血压和心率明显下降,戒烟 1 年者心血管事件的风险比继续吸烟者降低 50%^[14]。

3.2 血脂对青年急性心肌梗死发病的影响 国外对 5 000 多例志愿者遗传风险预测研究显示,LDL-C 浓度偏高是 45 岁以下青年男性心肌梗死重要危险因素^[15]。其他研究也表明,青年心肌梗死患者的内源性胆固醇合成能力更强。即使调整性别、年龄和其他传统心血管危险因素后,40 岁患者的非高密度脂蛋白胆固醇与心肌梗死之间的 *OR* 为 5.02 (95% *CI* 2.75 ~ 9.15),提示强化降脂治疗对降低青年心肌梗死发病的重要性。本研究中青年心肌梗死患者 TC、TG、LDL-C 水平均高于老年心肌梗死患者,提示青年患者脂质异常或是导致其心血管事件发生的重要原因,因此应加强对青年患者的降脂治疗。国外数据显示,与老年

急性心肌梗死患者比较,青年急性心肌梗死患者的梗死病变范围较小^[5,16]。本研究显示,青年心肌梗死患者的单支冠状动脉病变率较老年患者高,提示该人群的冠状动脉病变较轻。鉴于青年患者吸烟率较高和单一冠状动脉病变的高发病率,提示年轻患者冠状动脉阻塞可能更倾向于血栓性栓塞,且更易发生冠状动脉痉挛,而不易发生动脉粥样硬化,因此溶栓治疗和远端保护等干预措施的疗效在青年心肌梗死患者中可能更佳^[5]。

3.3 青老年心肌梗死患者发病的昼夜节律模式 本结果显示,青年心肌梗死患者在 06:01~12:00 高发,与国外研究结果一致^[17]。然而,中国台湾地区研究人员发现,青年心肌梗死在午夜高发^[18],这可能与地区差异有关。

急性心肌梗死发病体现出明显的昼夜节律性,其好发于在睡眠—觉醒过渡期^[19]。对急性心肌梗死发作时间 Meta 分析后发现,急性心肌梗死的发病率在 06:00~12:00 持续升高,发病人数占整个研究人群的 32%,并于 18:00~24:00 出现第 2 次高峰^[12]。目前国外多项研究阐述了其发作模式机制。首先,清晨血清皮质醇浓度迅速升高导致交感神经活动增强,其与血小板聚集性升高、血浆纤溶活性降低、心肌氧需求量增加共同作用导致心肌梗死节律性现象的发生^[20-21]。而觉醒期的直立姿势则会导致交感神经张力、心率、肾素活性、血管紧张素、肾上腺素和去甲肾上腺素水平升高,导致心肌梗死发作的节律性^[21]。

研究发现心肌梗死发作节律性与节律基因密切相关。人类心脏组织中存在节律基因的表达,其转录活性的改变与心血管事件发生显示出明显的一致性^[22]。与血小板的激活和聚集相关的表面标志物的表达也遵循昼夜节律,后者在早晨 6 点到中午达到表达高峰,上述现象与急性心血管疾病发作节律性相关。同时也有报道,睡前服用阿司匹林较早晨服用可更好地抑制血小板活性,避免心肌梗死发生,体现出节律干预治疗对预防心肌梗死发生的作用^[23]。

本结果显示,与老年心肌梗死患者比较,青年心肌梗死患者有更高的男性、吸烟比例,更高浓度的 TC、TG 和 LDL-C 水平,更高的单支冠状动脉血管病变发生率。此外,中国青年心肌梗死患者在 06:01~12:00 时间存在心肌梗死发作高峰。上述研究可为青年心肌梗死患者的临床治疗提供理论依据。然而本研究也存在局限性。首先本研究患者数量相对较少;其次仅包括就诊的心肌梗死患者,未及时就诊的患者数据无法统计;本文是回顾性研究,未对青年患者进行随访,无法知晓该类患者预后情况。因此上述局限性需进一步

研究加以证实。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

牛文豪、伍锋:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;赵馨娜、王家美、贺治青、楚杨、王新、纪瑞圳:资料收集,分析实验数据,统计分析;梁春:论文审核

参考文献

- [1] Fach A, Osteresch R, Erdmann J, et al. Long-term prevention after myocardial infarction in young patients ≤ 45 years: the Intensive Prevention Program in the Young (IPP-Y) study [J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2019. DOI: 10.1177/2047487319883960.
- [2] Michos ED, Choi AD. Coronary artery disease in young adults: A hard lesson but a good teacher [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2019, 74 (15): 1879-1882. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.08.1023.
- [3] Collet JP, Zeitouni M, Procopi N, et al. Long-term evolution of premature coronary artery disease [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2019, 74 (15): 1868-1878. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.08.1002.
- [4] Seaman SA, Cao Y, Campbell CA, et al. Macrophage recruitment and polarization during collateral vessel remodeling in murine adipose tissue [J]. *Microcirculation*, 2016, 23 (1): 75-87. DOI: 10.1111/micc.12261.
- [5] Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, et al. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 491497. DOI: 10.1155/2013/491497.
- [6] Eda Hiro R, Sakata Y, Nakatani D, et al. Association of lifestyle-related factors with circadian onset patterns of acute myocardial infarction: a prospective observational study in Japan [J]. *BMJ open*, 2014, 4 (6): e005067. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-005067.
- [7] Kalkhoran S, Benowitz NL, Rigotti NA. Reprint of: Prevention and treatment of tobacco use: JACC health promotion series [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 72 (23): 2964-2979. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.10.020.
- [8] Salman S, Dorairaj P, Ambuj R. Pathophysiological mechanisms of tobacco-related CVD [J]. *Global Heart*, 2012, 7 (2): 113-120. DOI: 10.1016/j.ghheart.2012.05.003.
- [9] Al Rifai M, DeFilippis AP, McEuoy JW. The relationship between smoking intensity and subclinical cardiovascular injury: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 258: 119-130. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.021.
- [10] Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2011, 18: 30. DOI: 10.1186/1423-0127-18-30.
- [11] Li Y, Li J, Hou ZW, et al. KLF5 overexpression attenuates cardiomyocyte inflammation induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion through the PPAR γ /PGC-1 α /TNF- α signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 940-946. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.100.

血清 YKL-40 预测呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的价值

杨庆玲, 白小燕, 刘诗兰, 李文娟, 范筱艾, 刘波, 陈梅, 包勇

基金项目: 四川省科学技术计划项目(2014JY0136)

作者单位: 610000 成都市第五人民医院呼吸科(杨庆玲、白小燕、刘诗兰、李文娟、范筱艾、刘波、陈梅); 成都市第三人民医院呼吸科(包勇)

通信作者: 杨庆玲, E-mail: renzhen9988@sina.com

【摘要】目的 分析血清 YKL-40 对呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的预测价值。**方法** 收集 2018 年 1 月—2019 年 4 月成都市第五人民医院呼吸科诊治呼吸机相关性肺炎患者 134 例, 以 28 d 生存情况分为死亡组($n=45$)和生存组($n=89$), 入院当天和第 7 天对患者进行 CPIS、APACHE II、SOFA 评分, 并检测血清 CRP、YKL-40 含量; ROC 曲线分析 YKL-40 对呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的预测价值。**结果** 死亡组第 1 天 APACHE II、CPIS、SOFA 评分、CRP、YKL-40 含量高于生存组($t/P=17.167/ <0.001$ 、 $2.006/0.047$ 、 $7.649/ <0.001$ 、 $13.093/ <0.001$ 、 $15.127/ <0.001$), 第 7 天 APACHE II、CPIS、SOFA 评分、CRP、YKL-40 含量高于生存组($t/P=17.037/ <0.001$ 、 $3.465/ <0.001$ 、 $18.294/ <0.001$ 、 $8.281/ <0.001$ 、 $15.761/ <0.001$)。呼吸机相关性肺炎近期死亡与第 7 天 APACHE II 评分、SOFA 评分、YKL-40 呈正相关($P < 0.05$), 与第 1 天 APACHE II 评分、SOFA 评分、YKL-40、BMI、年龄、CRP、细菌感染比率、CPIS 不相关($P > 0.05$); ROC 曲线分析显示, YKL-40 的 ROC 曲线下面积为 0.934, OR 为 1.32, 95% CI 0.889~0.979, 敏感度 0.738, 特异度 0.813, Youden 指数 0.551。**结论** YKL-40 蛋白可作为评估呼吸机相关性肺炎患者预后的参考指标, 具有一定的临床研究价值。

【关键词】 YKL-40; 呼吸机相关性肺炎; 28 d 病死率; 预测价值

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.002

The value of serum YKL-40 in predicting 28 day mortality of patients with ventilator-associated pneumonia Yang Qingling*, Bai Xiaoyan, Liu Shilan, Li Wenjuan, Fan Xiaoli, Liu Bo, Chen Mei, Bao Yong. * Department of Respiration, Chengdu Fifth People's Hospital, Sichuan Province, Chengdu 610000, China
Corresponding author: Yang Qingling, E-mail: renzhen9988@sina.com
Funding program: Sichuan Science and Technology Plan Project (2014JY0136)

【Abstract】Objective To analyze the predictive value of serum YKL-40 on 28 day mortality of patients with ventilator-associated pneumonia. **Methods** From January 2018 to April 2019, 134 patients with ventilator-associated pneumonia were diagnosed and treated in the respiratory department of Chengdu Fifth People's hospital. They were divided into death group ($n=45$) and survival group ($n=89$) based on 28-day survival. On the day of admission and the 7th day, the patients were assessed with CPIS, APACHE II and SOFA, and the levels of CRP and YKL-40 in serum were measured. ROC curve was used to analyze the predictive value of YKL-40 on 28 day mortality of patients with ventilator-associated pneumonia. **Results** On the first day, APACHE II, CPIS, SOFA score and CRP, YKL-40 content in the death group were higher than those in the survival group ($t/P=17.167/ <0.001$ 、 $2.006/0.047$ 、 $7.649/ <0.001$ 、 $13.093/ <0.001$ 、 $15.127/ <0.001$). On the 7th day, the scores of APACHE II, CPIS and SOFA, CRP and YKL-40 were higher than those of the survival group ($t/P=17.037/ <0.001$ 、 $3.465/ <0.001$ 、 $18.294/ <0.001$ 、 $8.281/ <0.001$ 、 $15.761/ <0.001$). The recent death of ventilator-associated pneumonia was positively correlated with APACHE II, SOFA and YKL-40 on the 7th day ($P < 0.05$). There was no correlation with APACHE II score, SOFA score, YKL-40, BMI, age, CRP, bacterial infection rate and CPIS ($P > 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the ROC curve of YKL-40 was 0.934, OR = 1.32, 95% CI 0.889-0.979, sensitivity 0.738, specificity 0.813, Youden index 0.551. **Conclusion** YKL-40 protein can be used as a reference index to evaluate the prognosis of patients with ventilator-associated pneumonia, and has a certain clinical research value.

【Key words】 YKL-40; Ventilator associated pneumonia; 28 day mortality; Predictive value

呼吸机相关性肺炎是指患者经呼吸机治疗后,导致患者肺部新发的肺实质性炎性反应,是使用呼吸机的常见并发症,主要临床症状为咳嗽、咯痰、发热等,致病菌主要为革兰阴性杆菌,主要治疗方式为抗感染及对症支持治疗,呼吸机相关性肺炎可导致患者多器官功能不全,进展快,预后差,发病率和病死率高^[1-2]。因此预测呼吸机相关性肺炎的预后对临床治疗有指导意义,也对降低患者病死率有重要意义,目前评价预后的指标主要有血清学指标、影像学指标、病原菌检测等,但特异度和敏感度较差^[3-4]。YKL-40 是一种分泌性蛋白,研究发现,YKL-40 在肺部感染性疾病中表达增加,与中性粒细胞的吞噬作用密切相关,在一定程度上可反映细菌感染的严重程度^[4-6]。现分析 YKL-40 与呼吸机相关性肺炎 28 d 病死率之间的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2018 年 1 月—2019 年 4 月成都市第五人民医院呼吸科诊治呼吸机相关性肺炎患者 134 例,以 28 d 生存情况分为死亡组($n=45$)和生存组($n=89$),2 组患者性别、血红蛋白、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、氧合指数、基础疾病、合并症等比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经医院伦理委员会批准,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符合呼吸机相关肺炎的诊断标准^[1]:撤掉呼吸机 ≥ 48 h,胸部 CT 显示新的浸润性病灶,加上②~④中至少 2 项;②支气管内出现脓性分泌物;③外周血白细胞计数 $<4 \times 10^9/L$ 或 $>10 \times 10^9/L$;④体温 $<36^\circ\text{C}$ 或 $>38^\circ\text{C}$ 。(2)排除标准:①患者合并肺部肿瘤等;②患者合并医源性感染;③临

床资料不完整者;④患者或家属拒绝签署知情同意书。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 CPIS 评分、APACHE II 评分和 SOFA 评分^[7-9]:入院当天和第 7 天由专业人员评估患者病情。APACHE II 评分主要 3 部分组成:(1)急性生理改变,主要包括心率、呼吸、动脉压、体温、氧分压、意识障碍、白细胞计数、肌酐、红细胞压积、电解质等,分值越高,代表病情越严重;(2)年龄 60~64 岁为 3 分,65~74 岁为 5 分, ≥ 75 岁为 6 分;(3)重要器官功能不全共 5 分。CPIS 评分由气体交换指数、体温、白细胞计数、气道分泌物、分泌物细菌培养、X 线表现组成,分值越高,愈合越差。SOFA 得分 1~2 分为器官障碍, ≥ 3 分为器官衰竭。

1.3.2 CRP、YKL-40 检测:入院当天和第 7 天清晨空腹抽取患者肘静脉血 10 ml,离心取上清液,用酶联免疫吸附法检测血清 CRP、YKL-40 水平,试剂盒购自上海西塘生物科技有限公司。

1.3.3 血及气管分泌物细菌培养:抽取患者外周静脉血及气管分泌物进行细菌培养。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验;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 t 检验;相关性分析采用单因素和 Logistic 多因素回归分析。利用 ROC 曲线分析 YKL-40 对呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的预测价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 APACHE II、CPIS、SOFA 评分比较 死亡组第 1、7 天 APACHE II 评分、SOFA 评分、CPIS 评分均

表 1 2 组患者基线资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	生存组($n=89$)	死亡组($n=45$)	χ^2/t 值	P 值
男/女[例(%)]	31(34.83)/58(65.17)	13(28.89)/32(71.11)	4.251	0.373
年龄(岁)	59.75 $\pm$ 3.72	57.11 $\pm$ 2.28	6.892	0.000
体质量指数(kg/m^2)	22.15 $\pm$ 1.83	24.68 $\pm$ 1.17	0.490	0.030
血红蛋白(g/L)	127.65 $\pm$ 5.15	128.84 $\pm$ 4.36	1.057	0.071
总胆固醇(mmol/L)	4.09 $\pm$ 0.73	4.16 $\pm$ 0.68	1.683	0.054
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.13 $\pm$ 0.24	1.16 $\pm$ 0.17	1.018	0.062
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.82 $\pm$ 0.51	2.71 $\pm$ 0.72	0.957	0.091
氧合指数(mmHg)	227.34 $\pm$ 13.15	230.13 $\pm$ 10.26	1.046	0.180
高血压[例(%)]	35(39.33)	25(55.56)	0.853	0.142
糖尿病[例(%)]	32(36.00)	13(28.89)	0.362	0.086
肾功能不全[例(%)]	17(19.10)	24(53.33)	0.715	0.073
COPD[例(%)]	22(24.72)	9(20.00)	0.624	0.068
脑血管意外[例(%)]	15(16.85)	16(35.56)	0.726	0.085
手术后呼吸衰竭[例(%)]	41(46.07)	14(31.11)	0.957	0.094
其他[例(%)]	11(12.36)	13(28.89)	0.835	0.142

高于生存组($P < 0.05$),见表 2。

2.2 2 组 CRP、YKL-40 水平比较 死亡组第 1、7 天 CRP、YKL-40 水平均高于生存组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

表 3 2 组患者 CRP、YKL-40 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	CRP(mg/L)	YKL-40(ug/L)
生存组 ($n = 89$)	第 1 天	110.47 $\pm$ 9.47	18.56 $\pm$ 2.14
	第 7 天	92.11 $\pm$ 8.62	15.53 $\pm$ 1.61
死亡组 ($n = 45$)	第 1 天	132.14 $\pm$ 8.14	24.21 $\pm$ 1.83
	第 7 天	104.46 $\pm$ 7.13	20.31 $\pm$ 1.75
t/P 生存组内值		13.526/ <0.001	10.674/ <0.001
t/P 死亡组内值		17.159/ <0.001	10.332/ <0.001
t/P 疗后第 1 天组间值		13.093/ <0.001	15.127/ <0.001
t/P 疗后第 7 天组间值		8.281/ <0.001	15.761/ <0.001

2.3 2 组病原菌谱感染率比较 血及气管分泌物细菌培养发现 7 种病原菌,2 组各种细菌感染比率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

2.4 呼吸机相关性肺炎近期死亡危险因素分析

2.4.1 单因素分析:呼吸机相关性肺炎近期死亡与第 7 天 APACHE II 评分、SOFA 评分、YKL-40 呈正相关,与年龄、BMI、第 1 天 YKL-40、APACHE II 评分、SOFA 评分、CRP、细菌感染比率、CPIS 评分不相关,见表 5。

2.4.2 各因素对呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的预测价值分析:ROC 曲线显示,YKL-40(第 7 天)预测呼吸机相关性肺炎短期病死率的临界值为 18.78 ng/ml,ROC 曲线下面积为 0.934,95% CI 0.889 ~ 0.979, $P = 0.000$,APACHE II 评分(第 7 天)预测呼吸机相关性肺炎短期病死率的临界值为 19.69 分,ROC

曲线下面积为 0.892,95% CI 0.830 ~ 0.954, $P = 0.004$;SOFA 评分(第 7 天)预测呼吸机相关性肺炎短期病死率的临界值为 18.76 分,ROC 曲线下面积为 0.812,95% CI 0.737 ~ 0.886, $P = 0.004$,见表 6、图 1。

表 5 呼吸机相关性肺炎近期死亡单因素相关性分析

变 量	r 值	P 值
年龄	0.120	0.167
BMI	0.150	0.084
YKL-40(第 1 天)	0.040	0.647
YKL-40(第 7 天)	0.870	0.000
APACHE II 评分(第 1 天)	0.050	0.566
APACHE II 评分(第 7 天)	0.880	0.000
SOFA 评分(第 1 天)	0.070	0.422
SOFA 评分(第 7 天)	0.820	0.000
CRP	0.120	0.167
细菌感染比率	0.150	0.084
CPIS	0.120	0.167

表 6 各因素对呼吸机相关性肺炎患者 28 d 病死率的预测价值分析

变 量	Cut-off 值	AUC	敏感度	特异度	Youden 指数
YKL-40(ng/ml)	18.78	0.934	0.738	0.813	0.551
APACHE II 评分	19.69	0.892	0.694	0.785	0.479
SOFA 评分	18.76	0.812	0.730	0.791	0.521

3 讨 论

呼吸机相关性肺炎是呼吸机治疗的常见并发症之一,主要危险因素包括宿主因素和医疗环境因素,其中宿主因素有性别、高龄等,医疗环境因素有医源性损伤、长期胃肠外营养等,主要发病机制为口咽部和外界环境中的致病微生物通过呼吸机的侵入性装置进入肺

表 2 2 组患者 APACHE II、CPIS、SOFA 评分比较 ($\bar{x} \pm s$,分)

组 别	时间	APACHE II 评分	CPIS 评分	SOFA 评分
生存组 ($n = 89$)	第 1 天	17.35 $\pm$ 2.75	5.91 $\pm$ 0.43	8.31 $\pm$ 0.74
	第 7 天	14.54 $\pm$ 1.63	5.37 $\pm$ 0.27	11.75 $\pm$ 1.27
死亡组 ($n = 45$)	第 1 天	26.86 $\pm$ 3.52	6.03 $\pm$ 0.26	7.38 $\pm$ 0.48
	第 7 天	20.45 $\pm$ 2.34	5.55 $\pm$ 0.31	15.75 $\pm$ 1.03
t/P 生存组内值		8.293/ <0.001	10.033/ <0.001	22.079/ <0.001
t/P 死亡组内值		10.173/ <0.001	7.985/ <0.001	49.410/ <0.001
t/P 治疗后第 1 天组间值		17.167/ <0.001	2.006/0.047	7.649/ <0.001
t/P 治疗后第 7 天组间值		17.037/ <0.001	3.465/ <0.001	18.294/ <0.001

表 4 2 组患者病原菌谱感染率比较 [例(%)]

组 别	例数	铜绿假单胞菌	鲍曼不动杆菌	大肠杆菌	肺炎克雷伯杆菌	阴沟肠杆菌	表皮葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	粪肠球菌
生存组	89	14(15.73)	8(8.99)	15(16.85)	16(17.98)	8(8.99)	17(19.10)	19(21.35)	13(14.61)
死亡组	45	5(11.11)	3(6.67)	11(24.44)	10(22.22)	3(6.67)	11(24.44)	9(20.00)	7(15.56)
χ^2 值		1.046	1.174	0.795	0.815	0.527	0.673	0.681	1.1173
P 值		0.094	0.076	0.251	0.152	0.126	0.163	0.072	0.057

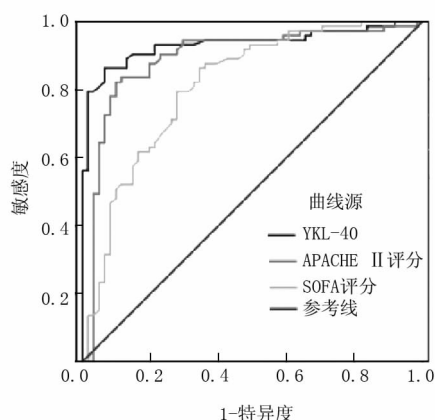


图 1 呼吸机相关性肺炎近期死亡的 ROC 曲线

部,并且侵入装置损伤患者的黏膜及气道纤毛,使肺部感染的机会增大,感染程度加重,易并发感染性休克、脓毒血症、多器官功能衰竭等,病死率高达 15% ~ 40%,对患者的健康造成威胁^[10-12]。所以早期对患者病情进行评估在呼吸机相关性肺炎的治疗中发挥重要作用,本研究探讨了相关指标对呼吸机相关性肺炎结局的预测价值,为临床治疗提供参考。

YKL-40 又称人软骨蛋白 39,主要在软骨细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、成纤维细胞中表达,研究发现,YKL-40 在免疫防御、抗感染、促进组织修复过程中发挥重要作用,不仅在肺炎患者中表达增加,还与肺炎的严重程度有关,YKL-40 的高表达预示肺部感染严重,且易反复发作^[13-15]。APACHE II 评分、SOFA 评分、CPIS 评分是目前用于评价疾病严重程度的重要指标,APACHE II 评分兼顾了既往身体状况和生理学指标等,评分越高,预后越差,CPIS 评分结合临床症状和实验室检查,是多用于反映疾病严重程度的实验室指标之一。SOFA 评分可反映机体多系统的功能状况和疾病严重程度,对肺炎的严重程度有评估价值^[16]。研究结果显示,呼吸机相关性肺炎近期死亡与第 7 天 YKL-40、APACHE II 评分、SOFA 评分呈正相关,与年龄、BMI、第 1 天 APACHE II 评分、SOFA 评分、YKL-40、CRP、细菌感染率、CPIS 不相关。研究发现 YKL-40 在人体免疫中起着重要的作用,具有诱导免疫球蛋白、激活树突状细胞和巨噬细胞、提高抗原敏感性的作用,还可通过多种细胞因子通路抑制炎症细胞的凋亡,与肺炎发生具有明显相关性。YKL-40 通过 MAPK、NF- κ B 途径诱导支气管上皮产生 IL-8,而 IL-8 能够作用于支气管平滑肌,使平滑肌细胞出现增殖和迁移,参与肺部反复感染过程。田梅等^[17]研究发现,YKL-40 蛋白高表达提示全身炎症反应和重症肺炎,对肺炎的预后和

复发有预测价值。张永芳等^[18]通过对复发性肺炎患儿的研究发现,YKL-40 蛋白与复发性肺炎体内免疫反应和炎症反应异常激活有关。

YKL-40 蛋白主要通过细胞因子途径和 MAPK 调节免疫,促使免疫因子释放,抑制免疫细胞凋亡,增强机体对炎症反应的抵抗能力,炎症反应越重,其表达水平越高,呼吸机相关性肺炎患者体内 YKL-40 蛋白高表达的相关机制尚不明确,目前认为可能与肺炎患者感染的严重程度有关,YKL-40 蛋白高表达提示呼吸机相关性肺炎预后不佳^[13,19]。进一步研究发现,YKL-40 蛋白的表达水平对呼吸机相关性肺炎 28 d 的生存情况有较好的预测价值,特异度和敏感度较高。

综上,YKL-40 蛋白是呼吸机相关性肺炎患者预后的危险因素,可作为评估预后的参考指标,当血清中 YKL-40 蛋白水平 > 18.78 ng/ml 时,提示患者预后不佳,应该采取积极的治疗措施。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

杨庆玲、白小燕:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;刘诗兰、李文娟:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;范筱艾、刘波:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;陈梅:进行统计学分析;包勇:课题设计,论文撰写

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-0939. 2018. 04. 006.
- [2] 高海燕, 陈希胜, 张文艳, 等. 呼吸机相关性肺炎的病原菌分布和耐药性分析[J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(1): 79-82. DOI: 10. 13596/j. cnki. 51-1501/r. 2018. 01. 079.
- [3] Eliakimraz N, Hellerman M, Yahav D, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole versus vancomycin in the treatment of healthcare/ventilator-associated MRSA pneumonia: A case-control study[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(3): 882-887. DOI: 10. 1093/jac/dkx153.
- [4] Erb CT, Patel B, Orr JE, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia[J]. Annals of the American Thoracic Society, 2017, 13(12): 2258-2260. DOI: 10. 1513/AnnalsATS. 201608-641CME.
- [5] Deconinck L, Meybeck A, Patoz P, et al. Impact of combination therapy and early de-escalation on outcome of ventilator-associated pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2017, 49(5): 396-404. DOI: 10. 1080/23744235. 2016. 1277035.
- [6] Furukawa T, Matsui K, Kitano M, et al. AB0674 YKL-40 is the biomarker for the presence of interstitial pneumonia and pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis[C]. European Congress of Rheumatology, 2017, 35(12): 84-87. DOI: 10. 1136/annrheumdis-2017-eular. 5684.

- [7] 张玉景, 李鹏, 张君利, 等. 血清 PCT 及 CPIS 评分对慢性阻塞性肺病患者呼吸机相关性肺炎的诊断及预后评估[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(3):470-473. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2017.03.023.
- [8] 陈凯立. 血清 PCT、IL-18 及 APACHE II 评分对老年重症肺炎患者预后的评估价值[J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(6):519-523. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2017.06.008.
- [9] 林妍丽, 邢柏, 陈太碧. qSOFA 评分与 CURB-65 评分对急诊社区获得性肺炎的评估价值[J]. 海南医学, 2017, 28(20):3293-3296. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2017.20.009.
- [10] Hurley JC. Paradoxical Acinetobacter-associated ventilator-associated pneumonia incidences within prevention studies using respiratory tract applications of topical polymyxin: benchmarking the evidence base [J]. J Hosp Infect, 2018, 100(1):105-107. DOI:10.1016/j.jhin.2018.04.005.
- [11] Walaszek M, Różańska A, Walaszek MZ, et al. Epidemiology of ventilator-associated pneumonia, microbiological diagnostics and the length of antimicrobial treatment in the Polish Intensive Care Units in the years 2013—2015[J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18(1):308. DOI:10.1186/s12879-018-3212-8.
- [12] Qi X, Qu H, Yang D, et al. Lower respiratory tract microbial composition was diversified in Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia patients[J]. Respiratory Research, 2018, 19(1):139. DOI:10.1186/s12931-018-0847-3.
- [13] Spoorenberg SMC, Vestjens SMT, Voorn GP, et al. Course of SP-D, YKL-40, CCL18 and CA 15-3 in adult patients hospitalised with community-acquired pneumonia and their association with disease severity and aetiology: A post-hoc analysis[J]. PLoS One, 2018, 13(1):575-577. DOI:10.1371/journal.pone.0190575.
- [14] 刘振坤, 乔明涛, 安瑞肖, 等. PCT、YKL-40、sICAM-1、TRAIL 和 IP-10 联合检测在慢性阻塞性肺疾病气道炎症反应中的诊断意义[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(1):176-180. DOI:10.3969/j.issn.1672-6170.2019.01.057.
- [15] 陈绵军, 陈军, 谭德敏, 等. 老年重症肺炎患者病原学分布及死亡危险因素分析[J]. 中国热带医学, 2017, 17(9):915-920. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2017.09.16.
- [16] 王力鹏, 陈军, 罗穆玲, 等. MEWS 评分、APACHE II 评分及 SOFA 评分对急诊重症患者死亡风险的评价[J]. 广东医学, 2018, 39(6):893-896. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2018.06.021.
- [17] 田梅, 陈启斌, 李雪梅, 等. C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 和 YKL-40 在小儿复发性肺炎中的联合检测作用[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 77(1):69-72. DOI:10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2018.01.018.
- [18] 张永芳, 廖建华, 蒲元林. 反复肺炎患儿体内免疫应答、炎症反应与 YKL-40 含量的相关性分析[J]. 海南医学院学报, 2018, 210(11):40-43, 47. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20180425.004.
- [19] 马卫银, 彭韶, 张婷. 反复肺炎患儿血清 YKL-40 与体液免疫功能的变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(4):425-429. DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2017.04.013.

(收稿日期:2019-09-17)

(上接 329 页)

- [12] Cobb CO, Shihadeh A, Weaver MF, et al. Waterpipe tobacco smoking and cigarette smoking: a direct comparison of toxicant exposure and subjective effects[J]. Nicotine & Tobacco Research, 2011, 13(2):78-87. DOI:10.1093/ntn/ntq212.
- [13] Al-Amri A, Ghalilah K, Al-Harbi A, et al. Waterpipe smoking and the risk of myocardial infarction: A hospital-based case-control study [J]. Tobacco Induced Diseases, 2019, 17:87. DOI: 10.18332/tid/114074.
- [14] Xin B, He XD, Wang J, et al. Nerve growth factor regulates CD133 function to promote tumor cell migration and invasion via activating ERK1/2 signaling in pancreatic cancer[J]. Pancreatolgy, 2016, 16(6):1005-1014. DOI:10.1016/j.pan.2016.09.005.
- [15] McCormack MC, Kwon E, Eberlin KR, et al. Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury[J]. Surgery, 2008, 143(1):126-133. DOI:10.1016/j.surg.2007.06.005.
- [16] Rigamonti E, Zordan P, Sciorati C, et al. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair[J]. BioMed Research International, 2014, 2014:560629. DOI:10.1155/2014/560629.
- [17] Zhou D, Huang C, Lin Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways[J]. Cellular Signalling, 2014, 26(2):192-197. DOI:10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
- [18] Abdullah AT, Jayden L, Emma T, et al. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages[J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2015, 53(5):676-688. DOI: 10.1165/rcmb.2015-00120C.
- [19] Winter C, Silvestre-Roig C, Ortega-Gomez A, et al. Chrono-pharmacological targeting of the CCL2-CCR2 axis ameliorates atherosclerosis [J]. Cell metabolism, 2018, 28(1):175-182. DOI:10.1016/j.cmet.2018.05.002.
- [20] Adamovich Y, Rousso-Noori L, Zwihaft Z, et al. Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides[J]. Cell Metabolism, 2014, 19(2):319-330. DOI:10.1016/j.cmet.2013.12.016.
- [21] Fournier S, Muller O, Benedetto U, et al. Time-of-day at symptom onset was not associated with infarct size and long-term prognosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Journal of Translational Medicine, 2019, 17(1):180. DOI:10.1007/s00392-017-1189-8.
- [22] Lunde LK, Skare O, Mamen A, et al. Cardiovascular health effects of shift work with long working hours and night shifts: Study protocol for a three-year prospective follow-up study on industrial workers [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(2):E589. DOI:10.3390/ijerph17020589.
- [23] 牛文豪, 梁春. 昼夜节律参与急性心肌梗死发生的机制及相关治疗进展[J]. 疑难病杂志, 2017, 16(2):195-198. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2017.02.024.

(收稿日期:2019-11-17)

腔内治疗急性 DVT 合并急性肺栓塞效果及对血栓清除情况观察

刘琳, 朱红江, 张燕, 杨志勇, 刘明阳

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20191718)

作者单位: 075000 张家口市第一医院血管外科(刘琳、朱红江、杨志勇、刘明阳), 康复科(张燕)

通信作者: 朱红江, E-mail: luzvt2@163.com

【摘要】目的 观察腔内治疗急性下肢深静脉血栓(DVT)合并急性肺栓塞患者的效果及对血栓清除情况。**方法** 选取2016年2月—2018年6月张家口市第一医院血管外科治疗急性DVT合并急性肺栓塞患者90例作为研究对象,按照随机数字表法分为常规组和观察组各45例。常规组患者使用低分子肝素钙联合华法林治疗,观察组患者使用Seldinger技术治疗,对2组患者临床症状消失时间、肺功能指标及C反应蛋白(CRP)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、蛋白S(PS)、蛋白C(PC)、D-二聚体(D-D)水平进行检测,并统计2组患者血栓清除率、病死率、治疗效果和不良反应发生情况。**结果** 观察组治疗总有效率高于常规组($\chi^2=8.400, P=0.004$),观察组患者呼吸困难、胸痛、紫绀等消失时间短于常规组($t/P=8.874/0.001, 10.030/0.001, 8.337/0.001$);FEV₁、PEF、FVC均高于常规组,且血清CRP、IL-10、TNF- α 、PS、PC、D-D水平低于常规组($t/P=3.698/0.001, 9.109/0.001, 3.145/0.001, 9.961/0.001, 6.239/0.001, 6.608/0.001, 8.708/0.001, 40.970/0.001, 28.641/0.001$);观察组血栓清除率高于常规组,病死率低于常规组($\chi^2/P=13.663/0.001, 6.976/0.008$)。不良反应发生率高于常规组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 血管腔内治疗急性DVT合并急性肺栓塞是一种安全有效的治疗方法,能够有效清除血栓,效果显著。

【关键词】 腔内治疗;下肢深静脉血栓,急性;肺栓塞,急性;血栓清除

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.003

Endovascular treatment of acute DVT with acute pulmonary embolism and observation of thrombus clearance Liu Lin*, Zhu Hongjiang, Zhang Yan, Yang Zhiyong, Liu Mingyang. *Department of Vascular Surgery, Zhangjiakou First Hospital, Hebei Province, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: Zhu Hongjiang, E-mail: luzvt2@163.com

Funding program: Key Research Project of Medical Science in Hebei Province (20191718)

【Abstract】Objective To observe the effect of endovascular treatment of acute deep vein thrombosis (DVT) of lower extremities with acute pulmonary embolism and the clearance of thrombus. **Methods** From February 2016 to June 2018, 90 patients with DVT and acute pulmonary embolism treated by Vascular Surgery of the First hospital of Zhangjiakou were selected as the study objects, and divided into the conventional group and the observation group with 45 cases each according to the random number table method. The routine group was treated with low molecular weight heparin calcium combined with warfarin, and the observation group was treated with Seldinger technology. The clinical symptom disappearance time, lung function index, C-reactive protein (CRP), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), protein S (PS), protein C (PC), D-Dimer (D-D) were observed in the two groups. The thrombus clearance rate, mortality rate, therapeutic effect and adverse reactions were measured. **Results** The total effective rate of treatment in the observation group was higher than that in the conventional group ($\chi^2=8.400, P=0.004$). The disappearance time of dyspnea, chest pain and cyanosis in the observation group was shorter than that in the conventional group ($t/P=8.874/0.001, 10.030/0.001, 8.337/0.001$). FEV₁, PEF and FVC were higher than those in the conventional group, and the serum CRP, IL-10, TNF- α , PS, PC, D-D level were lower than that of the routine group ($t/P=3.698/0.001, 9.109/0.001, 3.145/0.001, 9.961/0.001, 6.239/0.001, 6.608/0.001, 8.708/0.001, 40.970/0.001, 28.641/0.001$); thrombus clearance rate of the observation group was higher than that of the routine group, and mortality rate was lower than that of the routine group ($\chi^2/P=13.663/0.001,$

6.976/0.008). The incidence of adverse reactions was higher than that of routine group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Endovascular treatment of acute DVT combined with acute pulmonary embolism is a safe and effective treatment method, which can effectively remove thrombus, with significant effect.

[Key words] Endoluminal therapy; Deep vein thrombosis, acute; Pulmonary embolism, acute; Thrombus clearance

急性肺栓塞是一种常见的心肺血管疾病,其具有较高的发病率,位居世界前列,病死率仅次于肿瘤和心肌梗死。下肢深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT)是指深静脉血液在下肢深静脉内凝结,造成严重的血液回流障碍,血管堵塞^[1-2]。影响 DVT 的三大重要因素:血液高凝状态、静脉血流缓慢、静脉血管壁损伤。下肢静脉血栓严重的并发症可导致致死性的肺栓塞,发病急、病情发展迅速,病死率较高,因此对于 DVT 的治疗越来越重视^[3]。血管腔内治疗是治疗下肢深静脉血栓的主要治疗方式之一,能够有效清除血栓,达到治疗的目的。但目前临床上尚未有报道血管腔内对下肢深静脉血栓合并肺栓塞的治疗^[4]。因此,观察腔内治疗急性 DVT 合并急性肺栓塞效果,为临床上治疗急性 DVT 合并急性肺栓塞提供新的循证,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2016 年 2 月—2018 年 6 月张家口市第一医院血管外科治疗 DVT 合并急性肺栓塞患者 90 例作为研究对象,按照随机数字表法分为常规组和观察组各 45 例。常规组男 27 例,女 18 例,年龄 45~75(52.1 ± 2.1)岁;DVT 病程 1~3(1.5 ± 0.2)年;MRC 呼吸困难分级:<2 级 15 例,>2 级 30 例;胸闷、咯血及呼吸困难者 26 例。观察组男 25 例,女 20 例,年龄 41~80(55.6 ± 2.2)岁;DVT 病程 1~4(1.8 ± 0.2)年;MRC 呼吸困难分级:<2 级 22 例,>2 级 23 例;胸闷、咯血及呼吸困难者 25 例。2 组患者的性别、年龄、平均病程、MRC 分级比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本次研究经医院伦理委员会批准,所有患者及其家属均知情并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1)诊断标准:2 组患者均符合“2014 版欧洲心脏学会急性肺血栓栓塞症诊断治疗指南解读”诊断标准^[5]。(2)纳入标准:符合上述诊断标准患者,并且近期末服用其他药物和其他方法进行治疗。(3)排除标准:合并感染者;重大器官损伤者;合并肺源性心脏病者;妊娠期或哺乳期妇女;合并肿瘤者;存在精神障碍、沟通障碍者。

1.3 治疗方法 2 组患者均进行常规治疗,吸氧、心电监测。常规组患者使用低分子肝素钙(法国 Laboratoire GlaxoSmithKline 有限公司生产)5 000 U 肌肉注

射,1 次/d,2 d 后联合华法林 3 mg,1 次/d,连续治疗 5~7 d 后停用低分子肝素钙,仅华法林治疗 3~6 个月;观察组患者使用 Seldinger 技术治疗,对健侧股静脉进行穿刺,将 6 F 血管鞘置入,使用 5 F 猪尾导管在主肺动脉及左右肺处进行动脉造影,进而明确栓塞的位置等,并进行肺动脉压测量,将 5 F 猪尾导管置于大块血栓近端处,进行反复推拉,经猪尾导管进行局部灌注溶栓(使用尿激酶 50 万 U 溶于生理盐水 20 ml 中,45 min 内注射完毕),术中使用肝素 5 000 U 抗凝;再次肺部造影,术后低分子肝素钙 0.6 ml 注射,每 12 h 注射 1 次,共 7~10 d;第 4 天开始服用华法林钠、低分子肝素钙共同服用 3~5 d 后,其剂量使凝血酶原时间比正常值延长 1.25 倍,使用华法林抗凝 1 年。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 治疗效果评价:将治疗效果分为显效、有效、无效 3 个评价等级。显效,呼吸困难等症状消失,肺动脉造影显示肺血管完全开通;有效,呼吸困难症状明显减轻,肺血管部分开通;无效,呼吸困难等临床症状无明显改善或加重,肺血管阻塞增多。

1.4.2 记录临床症状消失时间:对 2 组患者呼吸困难消失时间、胸痛消失时间、发绀消失时间等临床症状进行统计。

1.4.3 肺功能指标检测:采用 IOS 肺功能检测仪(济南鑫贝西生物技术有限公司)检测患者第一秒呼气容积(FEV_1)、呼气峰流速(PEF)、用力肺活量(FVC)。

1.4.4 CRP、IL-10、TNF- α 、蛋白 S(PS)、蛋白 C(PC)、D-二聚体(D-D)水平检测:清晨空腹采取患者静脉血 5 ml,离心获得血清,在 -80°C 环境中保存。采用免疫透射比浊法检测 CRP 水平,使用酶联免疫法检测 IL-10、TNF- α 、PS、PC、D-D 水平,ELISA 试剂盒为欣博盛生物科技有限公司产品。

1.4.5 血栓清除率、病死率:记录 2 组患者血栓清除率和病死率情况。

1.4.6 不良反应:治疗过程中患者出现的皮肤黏膜出血、牙龈出血、消化道出血、过敏反应等。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;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 组治疗效果比较 观察组患者治疗总有效率为 97.87%, 高于常规组的 80.00%, 差异有统计学意义($\chi^2=8.400, P=0.004$), 见表 1。

表 1 2 组患者治疗效果比较 [例(%)]

组别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)
常规组	45	21(46.67)	15(33.33)	9(20.00)	80.00
观察组	45	31(68.89)	13(28.89)	1(2.22)	97.78

2.2 2 组临床症状消失时间比较 观察组患者呼吸困难消失时间、胸痛消失时间、紫绀消失时间均短于常规组, 具有统计学差异($P<0.01$), 见表 2。

表 2 2 组患者临床症状消失时间比较 ($\bar{x} \pm s, d$)

组别	例数	呼吸困难消失时间	胸痛消失时间	紫绀消失时间
常规组	45	13.25 $\pm$ 3.15	12.11 $\pm$ 2.56	9.89 $\pm$ 2.16
观察组	45	8.22 $\pm$ 2.13	7.15 $\pm$ 2.11	6.12 $\pm$ 2.13
<i>t</i> 值		8.874	10.030	8.337
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

2.3 2 组治疗前后 FEV₁、PEF、FVC 指标比较 治疗前 2 组 FEV₁、PEF、FVC 指标比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗后 2 组患者 FEV₁、PEF、FVC 指标均高于治疗前($P<0.01$), 且观察组均高于常规组($P<0.01$), 见表 3。

表 3 2 组患者治疗前后肺功能指标比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	时间	FEV ₁	PEF	FVC
常规组	治疗前	76.13 $\pm$ 14.12	64.33 $\pm$ 14.22	59.12 $\pm$ 10.11
(<i>n</i> =45)	治疗后	82.68 $\pm$ 14.02	79.88 $\pm$ 5.28	67.88 $\pm$ 11.25
观察组	治疗前	76.11 $\pm$ 14.25	64.52 $\pm$ 14.18	59.11 $\pm$ 10.03
(<i>n</i> =45)	治疗后	93.26 $\pm$ 13.11	90.99 $\pm$ 6.25	75.35 $\pm$ 11.28
<i>t/P</i> 常规组内值		2.208/0.001	6.877/0.001	3.885/0.001
<i>t/P</i> 观察组内值		5.941/0.001	11.460/0.001	7.217/0.001
<i>t/P</i> 治疗后组间值		3.968/0.001	9.109/0.001	3.145/0.001

2.4 2 组治疗前后炎症因子水平比较 治疗前 2 组患者炎症因子水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗后 2 组患者炎症因子水平低于治疗前($P<0.01$), 且观察组均低于常规组($P<0.01$), 见表 4。

2.5 2 组治疗前后 PS、PC、D-D 水平比较 治疗前 2 组患者 PS、PC、D-D 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗后 2 组患者 PS、PC、D-D 水平低于治疗前($P<0.01$), 且观察组均低于常规组($P<0.01$), 见

表 5。

表 4 2 组患者治疗前后炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	CRP (mg/L)	IL-10 (mg/L)	TNF- α (μ g/L)
常规组	治疗前	6.89 $\pm$ 1.51	1.89 $\pm$ 0.21	1.65 $\pm$ 0.22
(<i>n</i> =45)	治疗后	4.99 $\pm$ 1.23	1.43 $\pm$ 0.21	1.29 $\pm$ 0.11
观察组	治疗前	6.92 $\pm$ 1.26	1.87 $\pm$ 0.22	1.63 $\pm$ 0.21
(<i>n</i> =45)	治疗后	3.15 $\pm$ 0.15	1.19 $\pm$ 0.15	1.15 $\pm$ 0.09
<i>t/P</i> 常规组内值		6.544/0.001	10.390/0.001	9.818/0.001
<i>t/P</i> 观察组内值		19.930/0.001	17.130/0.001	14.090/0.001
<i>t/P</i> 治疗后组间值		9.961/0.001	6.239/0.001	6.608/0.001

表 5 2 组患者治疗前后 PS、PC、D-D 水平比较 ($\bar{x} \pm s, mg/L$)

组别	时间	PS	PC	D-D
常规组	治疗前	24.15 $\pm$ 7.11	4.33 $\pm$ 0.18	1.25 $\pm$ 0.15
(<i>n</i> =45)	治疗后	19.88 $\pm$ 4.11	3.15 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.02
观察组	治疗前	24.23 $\pm$ 7.26	4.31 $\pm$ 0.21	1.24 $\pm$ 0.16
(<i>n</i> =45)	治疗后	13.15 $\pm$ 3.16	2.11 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.06
<i>t/P</i> 常规组内值		3.488/0.001	37.520/0.001	11.970/0.001
<i>t/P</i> 观察组内值		9.387/0.001	59.750/0.001	20.810/0.001
<i>t/P</i> 治疗后组间值		8.708/0.001	40.970/0.001	28.641/0.001

2.6 2 组血栓清除率、病死率比较 观察组血栓清除率为 86.67% (39/45), 高于常规组的 55.56% (25/45) ($\chi^2/P=13.663/0.001$)。观察组患者病死 1 例 (2.22%), 低于常规组 8 例 (17.78%), 差异有统计学意义($\chi^2/P=6.976/0.008$)。

2.7 2 组不良反应发生率比较 观察组患者不良反应 (皮肤黏膜出血、牙龈出血、消化道出血各 1 例) 发生率为 6.67% (3/45 例), 高于常规组的 4.44% (2/45 例, 牙龈出血、消化道出血各 1 例), 但差异无统计学意义($\chi^2/P=0.231/0.631$)。

3 讨论

下肢深静脉血栓的形成主要是由于久坐、长时间制动及下肢静脉曲张而导致的血流流动缓慢, 以及感染性的血管壁损伤等导致下肢静脉血栓^[5-6]。急性肺栓塞是一种常见的致命性肺血管疾病, 其主要能够使肺动脉血流阻断, 导致肺动脉压升高, 引起肺功能不全等^[7]。

随着介入器材的发展和技术的进步, 目前临床上血管腔内技术已广泛应用于静脉疾病的治疗, 导管接触性溶栓相对于传统溶栓具有更高的效率, 能够较好地清除血栓, 球囊扩张联合支架成形术可以在创伤极小的情况下解决髂静脉狭窄病变, 又可以保持管腔长期通畅^[8-9]。经导管破栓剂导管局部溶栓治疗, 操作简便、治疗效果较好, 现已发展成为常规的技术。肺动脉主要分支内的血栓经导管破碎后, 能够有效改善

患者的肺功能,在血栓破裂后能够增加与溶栓药的接触,进而能够有效治疗^[10]。在本研究中发现,观察组患者临床症状消失时间、肺功能指标与常规组相比,均差异具有统计学意义,症状消失时间明显短于常规组,肺功能有所改善,因此,腔内治疗能够有效改善患者的临床指标,提高患者的肺功能,效果显著。与艾文佳等^[11]研究结果一致。

CRP 属于一种细胞膜糖蛋白,其水平的过度表达能够导致 PE 发生的风险。有研究表明^[12-13],其水平的升高会增加患者的病死率;IL-10 能够对免疫细胞和免疫分子产生调节作用,有效控制机体对其他物质的免疫和炎症反应^[14-15]。TNF- α 是肺损伤早期释放的重要细胞因子,其主要能够增加血管细胞通透性,诱导血小板的聚集,能够促使炎症细胞释放,加速血栓的形成^[16]。本研究发现,治疗后观察组患者 CRP、IL-10、TNF- α 水平均低于常规组患者,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),此结果说明,腔内治疗能够有效减轻患者的炎症反应,有效清除血栓。柴海强^[17]研究表明,丹红注射液联合利伐沙班并不能有效提高急性肺栓塞临床疗效,但能改善患者症状、凝血功能等,减轻炎症反应,安全性较高,与本文研究结果一致。

PS 和 PC 均是肝细胞合成的蛋白质,其能够激活 PC 并灭活凝血因子。D-D 是纤溶蛋白降解的产物,在血栓形成过程中会伴有不同程度的纤溶,血栓的形成也会导致 D-D 水平升高^[18]。本研究发现,治疗后观察组患者 PS、PC、D-D 水平显著降低,与常规组相比,差异具有统计学意义,此结果说明,腔内治疗能够有效降低 PS、PC、D-D 水平,效果显著。赵燕霞等^[19]研究表明,D-二聚体与凝血因子Ⅷ联合检测可提高肺栓塞合并肺栓塞的诊断效能,具有诊断肺栓塞合并肺栓塞的重要价值。在本研究中还发现,观察组患者病死率较低,血栓清除率较高,与常规组相比,差异具有统计学意义,此结果说明,腔内治疗能够有效清除血栓,效果显著,与卞路等^[20]研究结果一致。

综上所述,血管腔内治疗急性 DVT 合并急性肺栓塞是一种安全有效的治疗方法,能够有效清除血栓,效果显著。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘琳:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;朱红江:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;张燕:进行统计学分析;杨志勇:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;刘明阳:课题设计,论文撰写

参考文献

[1] Heafner T, Nissen AP, Schechtman D, et al. Venovenous bypass u-

sing continuous renal replacement therapy and endovascular inferior vena cava reconstruction to treat bilateral massive ilioacaval deep venous thrombosis[J]. J Vasc Surg Cases Innov Tech, 2019, 5(4): 438-442. DOI: 10.1016/j.jvscit.2019.04.004.

[2] Ohmori H, Kada A, Nakamura M, et al. Deep vein thrombosis in severe motor and intellectual disabilities patients and its treatment by anticoagulants of warfarin versus edoxaban[J]. Ann Vasc Dis, 2019, 12(3): 372-378. DOI: 10.3400/avd.oa.19-00040.

[3] Batagini NC, Hardy D, Clair DG, et al. Nellix endovascular aneurysm sealing system: Device description, technique of implantation, and literature review[J]. Semin Vasc Surg, 2016, 29(1-2): 55-60. DOI: 10.1053/j.semvasc.2016.04.001.

[4] Gao F, Zeng Q, Lin F, et al. Sandwich technique for endovascular repair of acute type a aortic dissection[J]. J Endovasc Ther, 2017, 24(5): 647-653. DOI: 10.1177/1526602817721674.

[5] 熊长明,郑亚国,何建国,等. 2014 版欧洲心脏病学会急性肺血栓栓塞症诊断治疗指南解读[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(11): 864-866. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2014.11.002.

[6] Yokoyama M, Yamashita R, Furuya M, et al. A case of cerebral venous thrombosis and deep venous thrombosis due to hyperthyroidism with increased factor VIII activity[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(11): 104364. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104364.

[7] Nguyen KP, Weber J, Samuel R, et al. Prospective study comparing the rate of deep venous thrombosis of complete and incomplete lower extremity venous duplex ultrasound examinations[J]. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord, 2019, 7(6): 882-888. DOI: 10.1016/j.jvsv.2019.05.014.

[8] Krishnappa S, Rachaiah JM, Hegde SS, et al. Percutaneous antegrade and retrograde endovascular approach to symptomatic high-grade subclavian artery stenosis: Technique and follow-up[J]. Heart Views, 2019, 20(3): 87-92. DOI: 10.4103/HEARTVIEWS.HEARTVIEWS_31_18.

[9] Ng JJ, Choong AMTL. Modification of the syringe plunger is not required to facilitate wire threading in endovascular procedures[J]. J Endovasc Ther, 2019, 26(5): 749. DOI: 10.1177/1526602819868209.

[10] Fukuda H, Yanagawa T, Horikawa F, et al. "Clip anchor-assisted coil embolization" for endovascular parent artery occlusion of intracranial traumatic aneurysm[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(11): 104374. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104374.

[11] 艾文佳,林少芒,张智辉,等. Angiojet 清栓联合髂静脉腔内成形一期治疗急性下肢深静脉血栓合并髂静脉压迫综合征的疗效分析[J/OL]. 中国血管外科杂志: 电子版, 2017, 9(4): 258-261. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7429.2017.04.004.

[12] 陈艳梅,武云涛,张薇,等. 血浆 D-二聚体在老年男性冠心病患者合并急性静脉血栓形成时的变化及临床意义[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(12): 1204-1207. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.12.004.

(下转 343 页)

拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学及安全性评价

田文静, 孙祖真, 马倩倩, 杨燕

基金项目: 山东省自然科学基金联合专项 (ZR2017LH031); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2017WS222)

作者单位: 272029 济宁医学院附属医院神经内科

通信作者: 杨燕, E-mail: dryangyan@mail.jnmc.edu.cn

【摘要】目的 观察拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学及安全性, 为部分发作性癫痫的临床治疗提供参考。**方法** 选择 2016 年 1 月—2018 年 8 月济宁医学院附属医院神经内科诊治部分发作性癫痫患者 96 例作为研究对象, 按照随机数字表法分为对照组和观察组 (再按照年龄不同分为儿童亚组 15 例和成年亚组 33 例) 各 48 例。对照组给予安慰剂治疗, 观察组给予拉克酰胺治疗, 并随访 10 个月。比较 2 组患者治疗前后癫痫发作次数、生活质量及认知功能变化, 观察 2 组患者临床疗效及不良反应发生情况。**结果** 观察组患者治疗总有效率为 91.67%, 高于对照组的 52.08% ($\chi^2/P=18.603/<0.001$), 脑电图改善优于对照组 ($\chi^2/P=11.253/0.000$)。成年亚组患者的 AUC_{0-4} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 及 $T_{1/2}$ 水平明显高于儿童亚组, T_{max} 明显低于儿童亚组 ($t/P=2.470/0.017$ 、 $2.615/0.012$ 、 $4.089/<0.001$ 、 $3.726/0.000$ 、 $4.934/<0.001$)。与治疗前比较, 治疗后观察组 QOLIE-31、MMSE 评分明显升高, WCST 评分降低, 且改善程度优于对照组 ($t/P=5.247/<0.001$ 、 $4.024/<0.001$ 、 $3.428/0.000$)。观察组患者治疗后 4 周、5~8 周、9~12 周、13~16 周癫痫发作减低次数均明显高于对照组 ($t/P=3.894/<0.001$ 、 $5.402/<0.001$ 、 $9.689/<0.001$ 、 $11.632/<0.001$)。2 组不良反应发生率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 拉克酰胺治疗部分发作性癫痫患者, 其药动学指标与年龄存在一定相关性, 并可以明显改善患者认知功能和生活质量, 降低癫痫发作次数, 治疗过程中不良反应轻、安全性好, 疗效显著, 具有较好的临床应用价值。

【关键词】 拉克酰胺; 癫痫, 部分发作性; 药动学; 疗效; 安全性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.004

Pharmacokinetic and safety evaluation of laccase in the treatment of partial seizure Tian Wenjing, Sun Zuzhen, Ma Qianqian, Yang Yan. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Shandong Province, Jining 272029, China

Corresponding author: Yang Yan, E-mail: dryangyan@mail.jnmc.edu.cn

Funding program: Joint Project of Shandong Natural Science Foundation (ZR2017LH031); Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan Project (2017WS222)

【Abstract】Objective To observe the pharmacokinetics and safety of laccase in the treatment of partial seizure, and to provide reference for the clinical treatment of partial seizure. **Methods** From January 2016 to August 2018, 96 patients with partial seizure diagnosed and treated in the Department of Neurology, Affiliated Hospital of Jining Medical College were selected as the study objects. According to the random number table method, they were divided into the control group and the observation group (again divided into 15 children's subgroups and 33 adults' subgroups according to different ages) with 48 cases each. The control group was treated with placebo, and the observation group was treated with laccase and followed up for 10 months. The changes of seizure frequency, quality of life and cognitive function were compared before and after treatment in the two groups. **Results** The total effective rate of the observation group was 91.67%, which was higher than that of the control group 52.08% ($\chi^2/P=18.603/<0.001$). The improvement of EEG was better than that of the control group ($\chi^2/P=11.253/0.000$). The levels of AUC_{0-4} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} and $T_{1/2}$ in the adult subgroup were significantly higher than those in the child subgroup, and T_{max} was significantly lower than that in the child subgroup ($t/P=2.470/0.017$, $t/P=2.615/0.012$, $t/P=4.089/<0.001$, $t/P=3.726/0.000$, $t/P=4.934/<0.001$). Compared with that before treatment, QOLIE 31 and MMSE scores of the observation group were significantly higher and WCST scores were lower after treatment, and the improvement degree was better than that of the control group ($t/P=5.247/<0.001$, $t/P=4.024/<0.001$, $t/P=3.428/0.000$). The frequency of epileptic attack reduction in the observation group was significantly higher than that in the control group

($t/P=3.894/ <0.001$, $t/P=5.402/ <0.001$, $t/P=9.689/ <0.001$, $t/P=11.632/ <0.001$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** In the treatment of epilepsy, the pharmacokinetic indexes of laccase are related to age, which can improve the cognitive function and quality of life of patients, reduce the number of epileptic seizures. In the process of treatment, the adverse reactions are light, the safety is good, the curative effect is significant, and it has better clinical application value.

[Key words] Lacosamide; Partial epileptic seizure; Pharmacokinetics; Therapeutic effect; Safety

癫痫一种由多种因素引起的脑部神经元过度异常放电,造成中枢神经系统短暂性、发作性及反复性的功能失常为临床特征的神经系统慢性疾病^[1]。调查显示,目前全球有不低于 5 000 万的癫痫患者,可用一种药物进行治疗的有 70% 左右,剩余患者需要多种药物联合治疗,较为棘手^[2]。部分发作性癫痫是临床常见的一种癫痫类型,容易向难治性癫痫转化^[3]。拉克酰胺是一种新型的抗癫痫药物,于 2008 年被美国 FDA 和欧盟 EMA 批准上市,主要针对临床部分发作性癫痫患者的辅助治疗^[4]。拉克酰胺主要通过钠通道失活进行选择性的促进,并对脑衰蛋白介导调控蛋白-2 (CRMP-2) 具有较好调节作用,同时还具有一定抗惊厥及神经痛缓解效果^[5]。拉克酰胺对于部分发作性癫痫的临床疗效已在欧美证实并报道^[6]。但是目前我国临床上少有关于拉克酰胺在治疗部分发作性癫痫方面的报道。故本研究探讨拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学及安全性,为部分发作性癫痫的临床治疗提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2016 年 1 月—2018 年 8 月济宁医学院附属医院神经内科诊治部分发作性癫痫患者 96 例作为研究对象,按照随机数字表法分为对照组和观察组,每组 48 例。2 组患者在性别、年龄、病程及联合用药等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。2 组患者均无家族遗传史及合并症。另将观察组患者按照年龄不同分为儿童亚组($n=15$)和成年亚组($n=33$),分析年龄对经拉克酰胺治疗部分发作性癫痫患者药动学指标的影响。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 选择标准 (1) 纳入标准:①符合国际抗癫痫联盟制定的“癫痫和癫痫综合征分类”中关于部分性或部分继发全身性癫痫发作的诊断标准^[7];②经相关抗癫痫药物治疗 3 个月以上,仍有发作者;③临床资料完整者。(2) 排除标准:①对本研究药物过敏者;②妊娠、哺乳期患者;③嗜烟酒或药物滥用者;④影响药物吸收和代谢疾病者;⑤梅毒抗体、HIV 抗体、丙肝抗体

表 1 2 组患者基线资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组 ($n=48$)	观察组 ($n=48$)	t/χ^2 值	P 值
男/女(例)	26/22	25/23	0.042	0.838
平均年龄(岁)	26.32 ± 2.10	25.98 ± 2.14	0.786	0.217
平均病程(年)	6.02 ± 3.56	5.98 ± 3.28	0.057	0.954
收缩压(mmHg)	115.95 ± 9.68	115.88 ± 9.53	0.036	0.486
舒张压(mmHg)	74.12 ± 6.35	74.23 ± 6.29	0.080	0.466
联合用药[例(%)]				
卡马西平+丙戊酸钠	15(31.25)	13(27.08)	0.220	0.653
苯妥英钠+丙戊酸钠	19(39.58)	18(37.50)	0.044	0.834
卡马西平+加巴喷丁	14(29.17)	17(35.42)	0.429	0.513

或乙肝表面抗原阳性者;⑥近期有缺血或失血 200 ml 者;⑦进行性神经系统疾病和颅内占位性病变者;⑧依从性差,中途退出者。

1.3 治疗方法 2 组患者的联合用药方案为加巴喷丁+卡马西平、丙戊酸钠+苯妥英钠、丙戊酸钠+卡马西平,维持血药浓度为正常范围。对照组患者在联合用药基础上给予安慰剂(江西青峰药业有限公司)治疗,观察组患者给予拉克酰胺片(比利时 UCB 公司)治疗,以 50 mg/d 为初始剂量,并按照每周 50 mg 增加量,直至 200~400 mg/d 的推荐剂量,并结合患者的不良反应及临床症状制定适合个人的维持剂量,随访 10 个月。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 脑电图检查及评定:采用数字脑电图仪[BM-1116 型,西化仪(北京)科技有限公司]对患者头颅扫描。根据治疗前后脑电图变化将其分为癫痫放电增加或减少<25%为无变化,减少 25%~49%为好转,减少 50%以上为明显好转,癫样放电完全消失为正常。改善率=(正常+明显好转+好转)/总例数 $\times 100\%$ 。

1.4.2 药动学指标测定:采集观察组患者服拉克酰胺前和给药后 15 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、5 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h 及 72 h 的肘部静脉血 5 ml,离心前将其置于冰水浴中保存,之后在 4℃ 条件下,离心取血浆,置于 -70℃ 条件下冰箱保存,采用液相色谱串联质谱(其中质谱仪、液相色谱泵及自动进样器购于安捷伦)对患者 AUC_{0-1} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、药峰浓度(C_{max})、末端消除半衰期($T_{1/2}$)、达峰时间(T_{max})水平进行测定。

1.4.3 生活质量及认知功能评分:采用癫痫患者生活质量量表 (QOLIE-31)、威斯康星卡片分类测验 (WCST) 及简易智能精神状态检查量表 (MMSE) 对患者生活质量及认知功能进行评定。QOLIE-31 量表有 7 个方面 (综合生活质量、社会功能、药物不良反应、认知功能、精神疲乏、情绪健康及对发作的担忧等 7 个) 31 个项目, 问卷总分 100 分, 生活越差得分越低^[8]。WCST 测验依据完成分类数、非持续错误数、持续错误数、正确次数及总测验数 5 项指标对结果进行评定^[9]。MMSE 评定量表包含有视空间、延时记忆、短时记忆、计算和注意力、语言记忆、地点定向、时间定向等功能, 回答不知道或错误计 0 分, 回答正确计 1 分, 总分为 30 分, 分值越高, 患者精神状态越好^[10]。

1.4.4 不良反应:记录 2 组患者治疗过程中出现的不良反应。

1.5 临床疗效评价标准 评价患者治疗第 5 ~ 16 周时的临床疗效, 并结合患者每月癫痫发作次数对患者临床综合疗效进行分析^[11]。其中发作次数减少 < 50% 者为无效; 发作次数减少 ≥ 50% 者为有效; 发作次数减少 > 75% 者为显效; 不再发作为完全控制。总有效率 = (完全控制 + 显效 + 有效) / 例数 × 100%。

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

2 结 果

2.1 2 组临床疗效比较 观察组患者治疗总有效率

为 91.67%, 明显高于对照组的 52.08% ($\chi^2 = 18.603$, $P < 0.001$), 见表 2。

2.2 2 组脑电图变化比较 观察组患者脑电图改善优于对照组, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 6.918$, $P = 0.009$), 见表 3。

2.3 2 亚组药动学指标比较 成年亚组患者 AUC_{0-1} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 及 $T_{1/2}$ 水平明显高于儿童亚组, T_{max} 明显低于儿童亚组 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.4 2 组生活质量及认知功能评分比较 对照组患者治疗前后生活质量及认知功能评分比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与治疗前相比, 观察组治疗后 QOLIE-31、MMSE 评分升高, WCST 评分降低, 且改善程度优于对照组 ($P < 0.01$), 见表 5。

表 5 2 组患者治疗前后生活质量及
认知功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组 别	时间	QOLIE-31	WCST	MMSE
对照组 ($n = 48$)	治疗前	54.69 ± 10.38	89.39 ± 12.54	23.15 ± 3.58
	治疗后	54.23 ± 10.41	89.05 ± 12.47	22.96 ± 3.51
观察组 ($n = 48$)	治疗前	54.78 ± 10.23	88.97 ± 12.64	23.22 ± 3.61
	治疗后	65.91 ± 11.38	81.02 ± 10.39	25.96 ± 3.79
t/P 对照组内值		0.218/0.414	0.133/0.447	0.263/0.397
t/P 观察组内值		5.039/ <0.001	3.366/0.001	3.627/0.000
t/P 治疗后组间值		5.247/ <0.001	3.428/0.000	4.024/ <0.001

2.5 2 组癫痫发作次数比较 随着治疗的进行, 2 组患者癫痫发作次数均逐渐降低, 且观察组患者癫痫发作减低次数较对照组更为显著 ($P < 0.01$), 见表 6。

2.6 2 组不良反应发生情况比较 治疗过程中, 对照

表 2 2 组治疗后临床疗效比较 [例 (%)]

组 别	例数	完全控制	显效	有效	无效	总有效率 (%)
对照组	48	0	11 (22.92)	14 (29.17)	23 (47.92)	52.08
观察组	48	15 (31.25)	17 (35.42)	12 (25.00)	4 (8.33)	91.67

表 3 2 组患者治疗后脑电图变化比较 [例 (%)]

组 别	例数	正常	明显好转	好转	无变化	改善率 (%)
对照组	48	8 (16.67)	8 (16.67)	15 (31.25)	17 (35.41)	64.58
观察组	48	25 (52.08)	9 (18.75)	8 (16.67)	6 (12.50)	87.50

表 4 不同年龄患者经拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	儿童亚组 ($n = 15$)	成年亚组 ($n = 33$)	t 值	P 值
AUC_{0-1} ($h \cdot ng \cdot ml^{-1}$)	50 925.36 ± 8 523.82	57 513.15 ± 8 584.31	2.470	0.017
$AUC_{0-\infty}$ ($h \cdot ng \cdot ml^{-1}$)	51 463.84 ± 8 538.15	58 145.32 ± 8 054.09	2.615	0.012
C_{max} (ng/ml)	3 145.04 ± 541.39	3 864.03 ± 571.63	4.089	<0.001
$T_{1/2}$ (h)	12.10 ± 2.18	14.96 ± 2.58	3.726	0.000
T_{max} (h)	1.35 ± 0.28	1.01 ± 0.19	4.934	<0.001

表 6 2 组患者治疗前后癫痫发作次数比较 ($\bar{x} \pm s$, 次/月)

组别	例数	治疗前	治疗后 4 周	治疗 5~8 周	治疗 9~12 周	治疗 13~16 周
对照组	48	10.74 ± 3.58	10.68 ± 3.56	9.60 ± 2.87	8.15 ± 2.31	7.09 ± 2.84
观察组	48	10.71 ± 3.66	8.11 ± 2.87	6.85 ± 2.05	4.45 ± 1.29	2.23 ± 0.56
<i>t</i> 值		0.041	3.894	5.402	9.689	11.632
<i>P</i> 值		0.483	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组患者头痛 3 例,胃肠道不适 4 例,头晕 3 例,不良反应发生率 20.8% (10/48),予临床常规处理缓解。观察组患者头痛 3 例,胃肠道不适 6 例,头晕 3 例,交界性心律 1 例,不良反应发生率 27.1% (13/48),均未停药处理,几天后缓解。2 组患者不良反应发生率差异无统计学意义 ($\chi^2/P=0.061/0.805$)。

3 讨论

多项临床研究显示,社会心理因素、手术治疗情况、抗癫痫药物数量、脑电图特征、发作间隔时间、发作形式及类型、年龄、病程等均是引发癫痫患者并发认知功能降低的影响因素^[12]。而 Chung 等^[13]认为,长期服用抗癫痫药物进行治疗,可引起认知功能降低等不良反应,严重影响患者的生活质量。拉克酰胺是一种近期推出的癫痫辅助治疗药物,对部分发作性癫痫具有潜在的效益,同时经多中心随机及安慰剂设定的临床研究证实^[14]。Chouchi 等^[15]研究显示,长期进行拉克酰胺单药治疗会引起呼吸道感染等多种不良反应,临床上常与常规抗癫痫药物联用。本研究结果提示,拉克酰胺辅助治疗部分发作性癫痫,可更好地改善患者认知功能,提高患者生活质量。这可能是由于拉克酰胺是一种辅助传统型电压门控钠离子通道阻滞剂类抗癫痫药物,与奥卡西平、拉莫三嗪、苯妥英钠、卡马西平等药物相互作用可起到治疗神经毒性的效果^[16]。另外,拉克酰胺还是一种新型的功能性氨基酸,可以对 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体甘氨酸位点相结合物质产生拮抗性,具有双重抗癫痫机制^[17]。拉克酰胺对患者认知功能的改善效果可能是与其他抗癫痫药物相互作用,削弱其认知功能不良反应程度,并可能对癫痫发作的良好控制所致。

本结果表明,年龄对拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的药动学影响显著,与 Zhang 等^[18]研究相一致。这可能主要是由于与成年人相比,儿童患者的肾脏清除率较高,且年龄越小清除率越高,因此成年组患者药物半衰期相对较大。另外,随着年龄的增加,机体体表面积也相应增加,其肾脏清除率呈现下降趋势,稳态血药浓度随之升高,与 Punia 等^[19]、Mäkinen 等^[20]研究相符。对于拉克酰胺治疗部分发作性癫痫的安全性评价,本结果提示,2 组患者均未出现严重不良反应,且

未进行特殊治疗,患者可自行恢复。但近年有研究显示,长期拉克酰胺治疗可能引发患者心律失常,持续性的低剂量拉克酰胺可引发房颤,高剂量可诱发房颤/房扑急性发作,心律失常风险增加^[21]。临床研究显示,拉克酰胺主要通过房室传导阻滞及 P-R 间期延长对患者心脏安全产生影响^[22]。Yildiz 等^[23]通过对住院患者、健康受试者及麻醉动物心电图研究也证实了这一观点。本研究中出现 1 例交界性心律失常,未进行干预,自动恢复。目前国内外临床对于长期服用拉克酰胺的心脏安全不良反应事件,多作为个案进行处理,国内对其研究也相对较少,缺乏充足的证据证实,但是对此临床医师需引起重视,并进行适当的风险监测和评估。

综上所述,拉克酰胺治疗部分发作性癫痫患者,可以明显改善其认知功能和生活质量,降低癫痫发作次数,其药动学指标与年龄存在一定相关性,治疗过程中不良反应轻,疗效显著,具有较好的临床应用价值。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

田文静:实施研究过程;孙祖真:资料搜集整理,进行统计学分析;马倩倩:论文修改,提出研究思路,分析试验数据;杨燕:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写

参考文献

- [1] Tagarelli A, Piro A. Epilepsy in popular medicine from the classic age to the modern age: A study on elk hoof as an original treatment [J]. *Neurological Sciences*, 2018, 39 (7):1283-1287. DOI:10.1007/s10072-018-3409-z.
- [2] 吴克刚,陈怡,何消阳. 吡仑帕奈治疗难治性癫痫部分发作的 Meta 分析 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40 (8):1157-1162. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.026.
- [3] Chrastina J, Kocvarova J, Novak Z, et al. Older age and longer epilepsy duration do not predict worse seizure reduction outcome after vagus nerve stimulation [J]. *Journal of Neurological Surgery Part A Central European Neurosurgery*, 2017, 79 (2):152-158. DOI:10.1055/s-0037-1607396.
- [4] Strzelczyk A, Zöllner JP, Willems LM, et al. Lacosamide in status epilepticus: Systematic review of current evidence [J]. *Epilepsia*, 2017, 58 (6):933-950. DOI:10.1111/epi.13716.
- [5] Wechsler RT, Yates SL, Messenheimer J, et al. Lacosamide for uncontrolled primary generalized tonic-clonic seizures: An open-label pilot study with 59-week extension [J]. *Epilepsy Research*, 2017,

- 130(8):13-20. DOI:10.1016/j.eplesysres.2016.12.015.
- [6] Mazzocchetti P, Tantucci M, Bastioli G, et al. Lacosamide protects striatal and hippocampal neurons from in vitro ischemia without altering physiological synaptic plasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135(6):424-430. DOI:10.1097/WAD.0000000000000245.
- [7] Jdrzejczak J, Bombaopón D, Jakiel G, et al. Managing epilepsy in women of childbearing age- Polish Society of Epileptology and Polish Gynecological Society Guidelines [J]. *Ginekologia Polska*, 2017, 88(5):278-284. DOI:10.5603/GP.a2017.0053.
- [8] Simeone KA, Hallgren J, Bockman CS, et al. Respiratory dysfunction progresses with age in Kcna1-null mice, a model of sudden unexpected death in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2018, 59(2):345-357. DOI:10.1111/epi.13971.
- [9] Mahmoud LB, Hakim A, Ghazzi H, et al. Influence of age and co-medication on the steady-state pharmacokinetics of valproic acid in Tunisian patients with epilepsy[J]. *Revue Neurologique*, 2017, 173(3):159-163. DOI:10.1016/j.neurol.2017.02.004.
- [10] Ridsdale L, Wojewodka G, Robinson E, et al. Characteristics associated with quality of life among people with drug-resistant epilepsy[J]. *Journal of Neurology*, 2017, 264(6):1174-1184. DOI:10.1007/s00415-017-8512-1.
- [11] Rosenberg EC, Louik J, Conway E, et al. Quality of Life in Childhood Epilepsy in pediatric patients enrolled in a prospective, open-label clinical study with cannabidiol [J]. *Epilepsia*, 2017, 58(8):e96-e100. DOI:10.1111/epi.13815.
- [12] 金超,郝立成,陈娜,等.丙戊酸钠单药治疗学龄期癫痫患儿的疗效及对认知功能的影响[J]. *儿科药理学杂志*, 2019, 25(7):23-27. DOI:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2019.07.008.
- [13] Chung S, Williams B, Dobrinsky C, et al. Perampanel with concomitant levetiracetam and topiramate: Post hoc analysis of adverse events related to hostility and aggression [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2017, 75(6):79-85. DOI:10.1016/j.yebeh.2017.06.038.
- [14] 葛梦娜,陈洁.奥卡西平治疗小儿部分性发作癫痫的临床疗效及对患者脑电图和认知功能的影响[J]. *现代医学*, 2018, 46(6):660-663. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2018.06.013.
- [15] Chouchi M, Kaabachi W, Tizaoui K, et al. The HLA-B*15:02 polymorphism and Tegretol®-induced serious cutaneous reactions in epilepsy: An updated systematic review and meta-analysis[J]. *Revue Neurologique*, 2018, 174(5):278-291. DOI:10.1016/j.neurol.2017.11.006.
- [16] Ruffolo G, Bonaventura CD, Cifelli P, et al. A novel action of lacosamide on GABA_A currents sets the ground for a synergic interaction with levetiracetam in treatment of epilepsy[J]. *Neurobiology of Disease*, 2018, 115(9):59-68. DOI:10.1016/j.nbd.2018.03.015.
- [17] Yassine IA, Eldeeb WM, Gad KA, et al. Cognitive functions, electroencephalographic and diffusion tensor imaging changes in children with active idiopathic epilepsy[J]. *Epilepsy & Behavior*, 2018, 84(6):135-141. DOI:10.1016/j.yebeh.2018.04.024.
- [18] Zhang ZB, Ji SM, Ying H, et al. Population pharmacokinetic models of lamotrigine in different age groups of Chinese children with epilepsy[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2017, 73(4):445-453. DOI:10.1007/s00228-016-2190-2.
- [19] Punia V, Abdelkader A, Busch RM, et al. Time to push the age limit: Epilepsy surgery in patients 60 years or older[J]. *Epilepsia Open*, 2018, 3(1):73-80. DOI:10.1002/epi4.12099.
- [20] Mäkinen J, Peltola J, Raitanen J, et al. Comparative effectiveness of eight antiepileptic drugs in adults with focal refractory epilepsy: the influence of age, gender, and the sequence in which drugs were introduced onto the market[J]. *Journal of Neurology*, 2017, 264(7):1345-1353. DOI:10.1007/s00415-017-8526-8.
- [21] Bttcher S, Lutz MT, Mayer T. Lacosamide in the treatment of patients with epilepsy and intellectual disabilities: A long-term study of 136 patients[J]. *Epilepsia*, 2017, 58(10):1749-1754. DOI:10.1111/epi.13869.
- [22] Baulac M, Byrnes W, Williams P, et al. Lacosamide and sodium channel-blocking antiepileptic drug cross-titration against levetiracetam background therapy[J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2017, 135(4):434-441. DOI:10.1111/ane.12691.
- [23] Yildiz EP, Gunes D, Bektas G, et al. Predictive factors of drug-resistant epilepsy in children presenting under 2 years of age: Experience of a tertiary center in Turkey[J]. *Acta Neurologica Belgica*, 2017, 118(1):71-75. DOI:10.1007/s13760-017-0850-3.

(收稿日期:2019-12-02)

(上接 338 页)

- [13] 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.
- [14] 苏成铭,司冰心,甄贞,等. Wells 量表与修正的 Geneva 量表对肺栓塞的评估价值比较[J]. *中国医药*, 2018, 13(9):1316-1318. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2018.09.009.
- [15] 李杰,陈殿森,彭楠.核医学及分子成像在肺栓塞诊断中的现状及进展[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(11):41-44.
- [16] 龚柳阳,吴小脉,徐有祖,等.中危急性肺栓塞临床特征及治疗分析[J]. *中国现代医生*, 2018, 56(10):45-49.
- [17] 柴海强.丹红注射液联合利伐沙班治疗急性肺栓塞的临床疗效及其对凝血功能、血管内皮功能、炎性反应的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(1):70-74. DOI:10.3969/j.issn.1008-5971.2019.01.015.
- [18] 李雯,何爱丽,张雯,等. CS-5100 全自动血凝仪检测抗凝血酶Ⅲ、蛋白 C、蛋白 S 活性的性能验证[J]. *检验医学*, 2018, 33(11):1009-1012. DOI:10.3969/j.issn.1673-8640.2018.011.009.
- [19] 赵燕霞,邓明琴,杨晓红. D-二聚体与凝血因子Ⅷ联合检测对肺栓塞合并肺栓塞的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(18):2283-2286. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.18.027.
- [20] 卞路,殷世武,倪才方,等. AngioJet 血栓清除系统治疗急性肢体缺血 19 例[J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27(2):123-127. DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.02.007.

(收稿日期:2019-11-21)

慢性肾脏病患者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标水平变化及其临床意义

方纪林, 蒋红利, 李向东, 李毅, 赵明, 沈海燕

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81370838)

作者单位: 723000 汉中, 西安交通大学医学院附属汉中三二〇一医院肾内科(方纪林、李向东、李毅、赵明、沈海燕); 710061

西安交通大学第一附属医院肾内科(蒋红利)

通信作者: 赵明, E-mail: 18909168933@139.com

【摘要】目的 探讨慢性肾脏病(CKD)患者血清 25-羟维生素 D[25(OH)D]、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及骨质疏松指标的水平变化及其临床意义。**方法** 选取 2015 年 8 月—2018 年 8 月西安交通大学医学院附属汉中三二〇一医院肾内科收治 CKD 患者 100 例(观察组),另选取同期在医院体检的健康志愿者 30 例作为健康对照组,收集 2 组临床资料,比较 2 组血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标的水平。根据 CKD 分期将观察组分为 CKD 1 亚组(27 例)、CKD 2 亚组(29 例)、CKD 3 亚组(23 例)、CKD 4 亚组(21 例)4 个亚组。比较各亚组血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标的水平,并应用 Pearson 线性相关分析血清 25(OH)D、IGF-1 水平与骨质疏松指标之间的相关性。**结果** 观察组患者血清 25(OH)D、IGF-1、钙(Ca)水平均低于健康对照组($t/P=9.654/0.000$ 、 $21.399/0.000$ 、 $4.840/0.000$),血清磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)、I 型胶原 β -C 末端肽(β -CTX)、总 I 型胶原氨基端延长肽(tPINP)、N 端骨钙素(N-MID)和全段甲状旁腺素(iPTH)水平均高于健康对照组($t/P=3.659/0.000$ 、 $10.275/0.000$ 、 $8.022/0.000$ 、 $15.572/0.000$ 、 $17.568/0.000$ 、 $25.608/0.000$)。随 CKD 病情加重,血清 25(OH)D 水平、IGF-1、Ca 水平依次降低($F/P=26.541/0.000$ 、 $107.935/0.000$ 、 $6.871/0.000$),P、ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID 和 iPTH 水平依次升高($F/P=15.986/0.000$ 、 $52.449/0.000$ 、 $433.074/0.000$ 、 $171.993/0.000$ 、 $258.851/0.000$ 、 $311.589/0.000$)。CKD 患者血清 25(OH)D 水平和 IGF-1 水平与 ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID、iPTH 水平均呈负相关[25(OH)D; $r/P=-0.516/0.013$ 、 $-0.662/0.010$ 、 $-0.733/0.008$ 、 $-0.165/0.024$ 、 $-0.298/0.029$;IGF-1; $r/P=-0.419/0.019$ 、 $-0.302/0.032$ 、 $-0.519/0.013$ 、 $-0.395/0.022$ 、 $-0.314/0.027$],与 Ca、P 无明显相关性($P>0.05$)。**结论** 随着 CKD 患者病情的加重,血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平降低,骨代谢异常情况加重,血清 25(OH)D、IGF-1 与骨质疏松指标 ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID、iPTH 均存在一定的相关性,检测血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平有助于 CKD 患者并发骨质疏松的诊断和预防。

【关键词】 肾脏病,慢性;25-羟维生素 D;胰岛素样生长因子-1;骨质疏松;相关性分析

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.005

Changes and clinical significance of serum 25(OH)D, IGF-1 and osteoporosis in patients with chronic kidney disease

Fang Jilin*, Jiang Hongli, Li Xiangdong, Li Yi, Zhao Ming, Shen Haiyan. *Department of Nephrology, Hanzhong 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China

Corresponding author: Zhao Ming, E-mail: 18909168933@139.com

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81370838)

【Abstract】Objective To investigate the changes of serum 25 hydroxyvitamin D[25(OH)D], insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and osteoporosis in patients with chronic kidney disease (CKD) and their clinical significance. **Methods** From August 2015 to August 2018, 100 CKD patients (observation group) were enrolled in the Department of Nephrology of Hanzhong 301 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University School of Medicine, and 30 healthy volunteers who were in the hospital at the same time were selected as the health control group. The clinical data of the two groups were collected, and the levels of serum 25(OH)D, IGF-1 and osteoporosis indexes of the two groups were compared. According to the stage of CKD, the observation group was divided into four subgroups: CKD 1 (27 cases), CKD 2 (29 cases), CKD 3 (23 cases) and CKD 4 (21 cases). The levels of serum 25(OH)D, IGF-1 and osteoporosis indexes were compared among the subgroups, and the correlation between serum 25(OH)D, IGF-1 and osteoporosis indexes was analyzed by Pearson linear correlation. **Result** The levels of serum 25(OH)D, IGF-1, CA in the observation group were lower than those in the control group ($t/P=$

9.654/0.000, 21.399/0.000, 4.840/0.000), and the levels of serum P, ALP, β -C-terminal peptide (β -CTX), tPINP, N-terminal Osteocalcin and whole parathyroid hormone (iPTH) were higher than those of healthy controls ($t/P=3.659/0.000$, 10.275/0.000, 8.022/0.000, 15.572/0.000, 17.568/0.000, 25.608/0.000). With the aggravation of CKD, the levels of serum 25 (OH) D, IGF-1, Ca decreased in turn ($F/P=26.541/0.000$, 107.935/0.000, 6.871/0.000), P, ALP, β -CTX, tPINP, N-MID and iPTH increased in turn ($F/P=15.986/0.000$, 52.449/0.000, 433.074/0.000, 171.993/0.000, 258.851/0.000, 311.589/0.000). Serum 25 (OH) D and IGF-1 levels in CKD patients are negatively correlated with ALP, β -CTX, tPINP, N-MID, and iPTH levels [25 (OH) D: $r/P=-0.516/0.013$, $-0.662/0.010$, $-0.733/0.008$, $-0.165/0.024$, $-0.298/0.029$; IGF-1: $r/P=-0.419/0.019$, $-0.302/0.032$, $-0.519/0.013$, $-0.395/0.022$, $-0.314/0.027$], and there was no significant correlation with Ca and P ($P>0.05$). **Conclusion** With the aggravation of CKD patients' condition, the levels of serum 25 (OH) D and IGF-1 decreased, and the abnormal condition of bone metabolism aggravated. Serum 25 (OH) D and IGF-1 were correlated with ALP, β -CTX, tPINP, N-MID and iPTH. The detection of serum 25 (OH) D and IGF-1 was helpful to the diagnosis and prevention of osteoporosis in CKD patients.

[Key words] Chronic kidney disease; 25 hydroxyvitamin D; Insulin like growth factor 1; Osteoporosis; Correlation

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 通常指发病时间超过 3 个月的肾损害^[1]。随着疾病的发展和病程的延长,患者多会出现骨矿物质代谢紊乱、脑血管疾病、心血管疾病等并发症,严重影响患者的生活质量^[2]。研究表明,CKD 患者血清 25-羟维生素 D [25 hydroxy vitamin D, 25(OH)D] 的水平明显低于健康人群,其骨代谢标志物的水平也会随其肾功能的恶化而升高^[3]。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种单链多肽,其与慢性肾功能衰竭患者的营养状况有关,还可促进骨形成与骨吸收的耦联,在骨重建中起重要作用^[4]。CKD 患者发生骨质疏松的风险较高,但当前用于检测骨质疏松的指标虽然有效,但各有不足,而有研究已表明血清 25 (OH) D、IGF-1 与骨代谢有关^[5],为此,本研究通过比较不同严重程度的 CKD 患者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标的水平,并研究血清 25 (OH) D、IGF-1 与骨质疏松指标的关系,以期为临床上 CKD 患者发生骨质疏松的诊断提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 回顾性选取 2015 年 8 月—2018 年 8 月西安交通大学医学院附属汉中三二〇一医院肾内科收治 CKD 患者 100 例作为观察组,男 53 例,女 47 例,年龄 21 ~ 73 (44.67 $\pm$ 4.85) 岁;根据疾病分期^[6],将其分为 4 个亚组:CKD 1 亚组 [CKD 2 期,肾功能轻度下降,肾小球滤过率 (eGFR) 60 ~ 89 ml/min] 27 例,男 14 例,女 13 例,平均年龄 (44.15 $\pm$ 4.94) 岁;CKD2 亚组 (CKD 3 期,肾功能中度下降, eGFR 30 ~ 59 ml/min) 29 例,男 16 例,女 13 例,平均年龄 (44.09 $\pm$ 3.68) 岁;CKD 3 亚组 (CKD 4 期,肾功能重度下降, eGFR 15 ~ 29 ml/min) 23 例,男 12 例,女 11 例,平均年龄 (45.69 $\pm$ 5.02) 岁;CKD 4 亚组 (CKD 5 期,肾功能衰

竭, eGFR < 15 ml/min) 21 例,男 11 例,女 10 例,平均年龄 (45.02 $\pm$ 5.78) 岁;另选同期在医院体检的健康体检者 30 例作为健康对照组,男 16 例,女 14 例,年龄 25 ~ 72 (45.02 $\pm$ 5.24) 岁。观察组与健康对照组的性别、年龄比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,受试者及家属知情同意并签署同意书。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准:①患者符合国际 KDIGO 指南^[6]中的相关诊断标准;②年龄 ≥ 18 岁;③入院前 2 周内未使用活性维生素 D 及钙剂治疗者。(2) 排除标准:①自身免疫性疾病者;②肾病综合征、肾小管酸中毒所致肾性骨病者;③恶性肿瘤,肝、肾功能衰竭者;④临床资料不全者。

1.3 观察指标与方法 所有受试者均于入院后次日 (对照组于体检当日) 清晨抽取空腹肘静脉血 5 ml,离心分离血清,置于 -80℃ 冰箱中保存备用。取第 1 份血清标本,采用德国罗氏 Cobas e601 全自动电化学发光免疫分析仪,以电化学发光法测定 25(OH)D 水平;利用双抗体夹心 ELISA 法测定血清 IGF-1 水平, IGF-1 试剂盒购自德国西门子 DPC 公司,按照说明书内容操作;利用 Siemens Advia 2400 全自动生化分析仪检测血清磷 (P)、钙 (Ca)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 水平;用全自动电化学发光仪检测血清 I 型胶原 β -C 末端肽 (β -C-terminal telopeptide of type I collagen, β -CTX)、总 I 型胶原氨基端延长肽 (total N-terminal propeptide of type I procollagen, tPINP)、N 端骨钙素 (N-terminal-midfragment of osteocalcin, N-MID)、全段甲状旁腺素 (intact parathyroid hormone, iPTH) 水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,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;采用 Pearson 线性相关分析血清 25(OH)D、IGF-1 水平与骨质疏松指标间的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标比较

观察组患者血清 25(OH)D 水平、IGF-1、Ca 水平均低于健康对照组,血清 P、ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID 和 iPTH 水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 2 组受试者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

指 标	健康对照组 (<i>n</i> = 30)	观察组 (<i>n</i> = 100)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
25(OH)D(ng/ml)	14.89 ± 3.30	9.95 ± 2.15	9.654	0.000
IGF-1(μg/ml)	206.74 ± 16.63	153.27 ± 10.26	21.399	0.000
Ca(mmol/L)	2.43 ± 0.12	1.86 ± 0.64	4.840	0.000
P(mmol/L)	1.20 ± 0.27	1.55 ± 0.51	3.659	0.000
ALP(U/L)	50.55 ± 9.27	76.01 ± 12.57	10.275	0.000
β-CTX(ng/ml)	0.40 ± 0.01	0.87 ± 0.32	8.022	0.000
tPINP(ng/ml)	49.94 ± 8.12	92.18 ± 14.15	15.572	0.000
N-MID(ng/ml)	15.24 ± 3.67	45.64 ± 9.24	17.568	0.000
iPTH(ng/ml)	52.08 ± 7.90	151.31 ± 20.73	25.608	0.000

2.2 CKD 各亚组患者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标水平比较

血清 25(OH)D、IGF-1、Ca 水平比较,CKD 4 亚组 < CKD 3 亚组 < CKD 2 亚组 < CKD 1 亚组($P<0.05$),血清 P、ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID、iPTH 水平比较,CKD 4 亚组 > CKD 3 亚组 > CKD 2 亚组 > CKD 1 亚组($P<0.01$),见表 2。

2.3 血清 25(OH)D、IGF-1 与骨质疏松指标的相关性

Pearson 线性相关分析显示,血清 25(OH)D 水平、IGF-1 水平与 ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID、iPTH 水平均呈负相关($P<0.05$),与 Ca、P 无明显相关性($P>0.05$),见表 3。

表 3 血清 25(OH)D、IGF-1 与骨质疏松指标的相关性

指 标	25(OH)D		IGF-1	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
ALP	-0.516	0.013	-0.419	0.019
β-CTX	-0.662	0.010	-0.302	0.032
tPINP	-0.733	0.008	-0.519	0.013
N-MID	-0.165	0.024	-0.395	0.022
iPTH	-0.298	0.029	-0.314	0.027
Ca	0.312	0.093	0.224	0.101
P	-0.434	0.072	-0.337	0.084

3 讨 论

维生素 D 是一种主要来源于自身合成的脂溶性维生素,在紫外线照射下,皮肤中的 7-脱氢胆固醇转化为维生素 D,维生素 D 入血与蛋白结合并转运至肝脏,在肝内 25-羟化酶的作用下生成 25(OH)D,再在肾脏 1 α -羟化酶的作用下生成活性维生素 D。25(OH)D 在血液循环中浓度高、半衰期长,常用于评价维生素 D 的存储状态^[7-8]。在本研究中,CKD 患者的血清 25(OH)D 水平低于健康对照组。维生素 D 主要由紫外线照射合成或饮食摄入,因此,推测此结果可能与患者较少进行户外活动或饮食不均衡有关。本研究还显示,随着病情的进展,患者的 25(OH)D 水平越来越低,原因可能在于肾功能受损越严重,酶的活性越低,25(OH)D 的合成受到影响,进而影响 25(OH)D 到 1,25-二羟维生素 D [1,25-dihydroxy vitamin-D, 1,25-(OH)₂-D] 的转化^[9-10],这与国外研究报道指出 CKD 患者维生素 D 的转化受到抑制,影响维生素 D 代谢的结论相一致^[11]。

IGF-1 是一种类似于胰岛素的生长因子和细胞营养因子,能促进细胞的增殖和分化,并参与多种病理生理过程^[12]。IGF-1 水平受生长激素和 IGF-1 结合蛋白(insulin-like growth factor-binding protein, IGFBP)共同调节。IGFBP 共有 6 种形式,分别是 IGFBP-1 ~

表 2 各亚组患者血清 25(OH)D、IGF-1 及骨质疏松指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

指 标	CKD 1 亚组(<i>n</i> = 27)	CKD 2 亚组(<i>n</i> = 29)	CKD 3 亚组(<i>n</i> = 23)	CKD 4 亚组(<i>n</i> = 21)	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
25(OH)D(ng/ml)	12.14 ± 2.20	10.53 ± 2.04	9.25 ± 1.98	7.11 ± 1.69	26.541	0.000
IGF-1(μg/ml)	173.48 ± 10.60	162.15 ± 12.05	149.55 ± 11.03	119.08 ± 9.10	107.935	0.000
Ca(mmol/L)	2.12 ± 0.69	1.90 ± 0.07	1.79 ± 0.32	1.55 ± 0.44	6.871	0.000
P(mmol/L)	1.38 ± 0.24	1.49 ± 0.21	1.60 ± 0.04	1.82 ± 0.33	15.986	0.000
ALP(U/L)	60.03 ± 10.56	69.27 ± 11.34	79.34 ± 12.05	102.24 ± 14.64	52.449	0.000
β-CTX(ng/ml)	0.57 ± 0.02	0.69 ± 0.12	0.98 ± 0.11	1.46 ± 0.08	433.074	0.000
tPINP(ng/ml)	56.16 ± 9.03	65.14 ± 10.17	98.14 ± 16.81	169.30 ± 33.63	171.993	0.000
N-MID(ng/ml)	20.11 ± 3.20	29.25 ± 6.47	55.63 ± 10.20	90.14 ± 15.55	258.851	0.000
iPTH(ng/ml)	68.29 ± 7.33	95.49 ± 14.32	187.51 ± 29.27	295.47 ± 50.16	311.589	0.000

IGFBP-6,具有延长循环中 IGF 半衰期和稳定血清 IGF 浓度的作用,可调节 IGF-1 的生物利用度^[13]。在本研究中,相较于健康健康对照组,CKD 患者的血清 IGF-1 水平明显下降,且随病情越重,水平越低,可能是由于 CKD 患者尚未完全明确的某种病理改变可促进IGFBP 转化为低分子量的过程,例如 IGFBP-3 转化为分子量更低的 IGFBP-2,使 IGFBP-2 水平升高,导致 IGFBP 与 IGF-1 结合增多,加速 IGF-1 的代谢,表现为水平下降^[14]。谷立杰等^[15]研究分析了不同分期的 CKD 患者血清游离 IGF-1 和 IGFBP-3 的水平,结果显示随着肾功能的减退,IGFBP-3 水平趋于升高,IGF-1 水平下降,这与本研究结果相吻合,但导致 CKD 患者上述转化过程加剧的原因,尚待进一步探究。

CKD 病情进展过程中,在肾单位出现不同程度的受损后,肾脏逐渐出现排磷障碍,患者尿磷排泄减少,出现高磷血症,而小肠对钙的吸收和分泌、肾脏对钙的排泄和重吸收均会受到影响,表现为血钙水平下降;钙磷代谢的这种变化可导致 PTH 继发性分泌亢进,进而引起骨质疏松^[15]。在本研究中,CKD 患者的血清 Ca 水平低于健康对照组,血清 P 水平高于健康对照组,证实了该观点。血清中 ALP 主要来源于肝脏和骨骼,是骨骼形成的标志物;骨钙素是一种骨基质蛋白,其中 1/3 为 N-MID,同样可以反映骨形成;tPINP 为总 I 型胶原氨基端延长肽, β -CTX 是 I 型胶原蛋白的羧基端降解产物,可反映骨吸收;iPTH 能促进成骨细胞形成及骨的矿化,刺激内源性 PTH 分泌和骨形成,防止骨丢失^[16-17];本研究中观察组患者的 ALP、 β -CTX、tPINP、N-MID、iPTH 等骨代谢标志物指标水平均高于健康对照组,且随着病情的加重而升高,证实了 CKD 患者发生骨质疏松的风险较高。

有研究表明,老年人缺乏维生素 D 会诱发继发性 PTH 水平增高,骨转换增强、骨丢失加速,引起下肢肌力减弱,增加骨质疏松患病率^[18]。目前临床上多数观点认为骨质疏松与维生素 D 水平有关,如有研究发现外源性补充维生素 D 和钙,可以提高改善绝经后骨质疏松患者的骨矿物质和有机质含量^[19],有研究认为老年骨密度与血清 25(OH)D 水平密切相关^[20],但目前研究较少针对 CKD 患者开展。在本研究中,CKD 患者的血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平均与骨质疏松指标相关,提示低水平维生素 D 可能引起骨量减少或骨质疏松,维生素 D 对维持骨骼内环境的稳定有重要意义,活性维生素 D 能够促进肠钙吸收和尿钙、磷的重吸收,还可以抑制骨吸收和促进骨形成。IGF-1 是骨骼中含量最丰富的多肽物质,在促进骨骼细胞增殖分

化、骨量和骨密度维持等方面发挥重要的作用^[21], IGF-1 也可由骨细胞合成,以多种形式调节骨骼细胞的功能,促进成骨细胞的增殖、分化和募集,抑制细胞凋亡,刺激骨胶原 DNA 的合成和转录,抑制骨胶原的降解,增加骨基质的沉积^[22-23],因而 IGF-1 水平可反映 CKD 患者的骨代谢水平。

综上所述,随着 CKD 患者病情的加重,血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平明显降低,骨代谢异常更加明显,血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平的降低与骨代谢异常有关,血清 25(OH)D 和 IGF-1 水平的检测可为 CKD 患者并发骨质疏松的诊断提供参考。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

方纪林:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;蒋红利、李向东:实施研究过程,资料搜集整理;李毅、沈海燕:进行统计学分析;赵明:提出研究思路,课题设计,分析试验数据,论文审核

参考文献

- [1] 上海慢性肾脏病早发现及规范化诊治与示范项目专家组. 慢性肾脏病筛查诊断及防治指南[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(1): 28-34. DOI:10.19538/j.nk2017010108.
- [2] 许洪涛,郭正勇,张慧泽,等. 慢性肾脏病患者及进展危险因素分析[J]. 安徽医药, 2017, 21(5): 866-869. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.05.023.
- [3] 陈超,刘志超,祝永刚,等. 维生素 D 的最新研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(10): 135-140. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2018.10.024.
- [4] 潘祉谕,俞佳丽,孙翼,等. 高糖诱导肾小管上皮细胞发生上皮-间质转化过程中 Snail 1 对 IGF-1 表达的影响[J]. 广东医学, 2017, 38(15): 2265-2270. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2017.15.002
- [5] 陈泽华,陈乐锋,陈国荣,等. 血清 IGF-1 和 25(OH)D 水平在老年 2 型糖尿病并发骨折评估中的应用[J]. 广东医学, 2018, 39(13): 1997-1999, 2002. DOI:10.3969/j.issn.1001-9448.2018.13.017.
- [6] 赖玮婧,刘芳. 2012 年 KDIGO 慢性肾脏疾病血压管理临床实践指南解读[J/OL]. 中国医学前沿杂志:电子版,2013,5(6):69-73.
- [7] 廖玄,卢青,蔡凯鹏. 血清 25 羟维生素 D₃ 的缺乏对慢性肾脏病的影响[J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(10): 616-619. DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2018.10.006.
- [8] 王菊,王海燕,张桂霞,等. 慢性肾脏病 3-5 期患者血清 25-羟维生素 D₃ 水平与心脏瓣膜钙化的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(8): 573-577. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2016.08.003.
- [9] 史伟佳,张道友,汪裕伟,等. 慢性肾脏病患者 25(OH)D₃ 的水平及相关指标分析[J]. 皖南医学院学报, 2016, 35(4): 333-336. DOI:10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.008
- [10] 周晓霜,李荣山. 慢性肾脏病患者维生素 D 缺乏的风险因素分析[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(7): 1054-1056. DOI:10.

- 11655/zgywylc2017.07.049.
- [11] Batacchi Z, Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, et al. Effects of vitamin D2 supplementation on vitamin D3 metabolism in health and CKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(9): 1498-1506. DOI:10.2215/CJN.00530117.
 - [12] 陈思敏, 王圣治. 慢性肾脏病-矿物质和骨代谢紊乱的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(12): 221-224. DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2017.12.067.
 - [13] 王凯, 李春亮, 罗成林, 等. 骨质疏松合并压缩性胸腰椎骨折患者血清中 IGF-1、IGFBP3 含量与骨代谢活力的相关性研究[J]. 疑难病杂志, 2018, 17(8): 821-824. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2018.08.015.
 - [14] 姚向飞, 蔡东, 权皎洁, 等. 2 型糖尿病肾病患者外周血 IGF-1、TGF- β 和 VEGF 水平及临床意义[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(6): 78-81. DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2017.06.022.
 - [15] 谷立杰, 张月月, 王玲, 等. 慢性肾脏病中胰岛素样生长因子 1 轴的变化及其在骨骼肌萎缩中的作用[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(10): 749-754. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.10.007.
 - [16] 周婷婷, 冯正平. 骨代谢指标在慢性肾脏病-矿物质骨代谢紊乱中的研究进展[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(3): 311-316. DOI:10.3969/j.issn.1674-2591.2013.03.016.
 - [17] 陈慧敏, 邢昌赢, 张丽娜, 等. 慢性肾脏病 5 期患者血浆 iPTH、(1-84) PTH、(7-84) PTH 水平的特点及甲状旁腺切除术的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2017, 33(1): 15-21. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2017.01.003.
 - [18] 秦晓华. 维生素 D 在慢性肾脏病血管钙化中的作用[J]. 重庆医学, 2019, 48(14): 2464-2466. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.030.
 - [19] Paschalis EP, Gamsjaeger S, Hassler N, et al. Vitamin D and calcium supplementation for three years in postmenopausal osteoporosis significantly alters bone mineral and organic matrix quality[J]. Bone, 2017, 95: 41-46. DOI:10.1016/j.bone.2016.11.002.
 - [20] 韦丽红, 张劫. 中老年 2 型糖尿病患者 25 羟维生素 D3 与骨密度的相关性研究[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(6): 849-852. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.06.026.
 - [21] Rico-Llanos GA, Becerra J, Visser R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in vitro and in vivo, and together have a stronger osteogenic effect than when IGF-1 is combined with BMP-2[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(7): 1867-1875. DOI:10.1002/jbm.a.36051.
 - [22] LópezQuiles J, FortezaLópez A, Montiel M, et al. Effects of locally applied Insulin-like Growth Factor-I on osseointegration[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2019, 24(5): e652-e658. DOI:10.4317/medoral.22973.
 - [23] DeBoer MD, Lee AM, Herbert K, et al. Increases in IGF-1 After Anti-TNF- α Therapy Are Associated With Bone and Muscle Accrual in Pediatric Crohn Disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(3): 936-945. DOI:10.1210/je.2017-01916.

(收稿日期:2019-11-20)

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结果。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。

老年终末期肾病患者腹膜透析对肾功能及心功能的影响

热孜万古丽·阿布都拉, 贾依娜西·阿扎提, 姜鸿, 赛福丁·木沙

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160095)

作者单位: 830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院肾病科

通信作者: 赛福丁·木沙, E-mail: 2062472984@qq.com

【摘要】目的 观察老年终末期肾病患者腹膜透析治疗对肾功能及心功能的影响。**方法** 收集 2016 年 9 月—2018 年 8 月新疆维吾尔自治区人民医院肾病科住院治疗老年终末期肾病患者 78 例, 按随机数字表法分为 2 组, 各 39 例。对照组给以血液透析治疗, 观察组给以腹膜透析治疗, 治疗 4 个月后比较 2 组治疗效果, 观察肾功能、心功能相关指标及心理评分变化情况。**结果** 观察组治疗效果优于对照组 ($\chi^2/P = 5.028/0.025$); 治疗后观察组肾小球滤过率、血肌酐及尿素氮水平均低于对照组 ($t/P = 11.131/0.032, 13.101/0.016, 11.181/0.028$); 治疗后观察组左心室射血分数、心脏指数及每搏输出量均高于对照组, 左心室后壁厚度小于对照组 ($t/P = 9.547/0.055, 9.172/0.025, 9.043/0.054, 9.142/0.015$); 治疗后观察组 SDS、SAS 评分优于对照组 ($t/P = 11.844/0.005, 10.415/0.015$)。**结论** 老年终末期肾病患者应用腹膜透析治疗效果确切, 可在临床上进一步推广与应用。

【关键词】 终末期肾病; 腹膜透析; 治疗效果; 肾功能; 心功能; 老年人

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.006

Effect of peritoneal dialysis on renal function and cardiac function in elderly patients with end-stage renal disease

Gazvankuli Abdullah, Jiyinaxi Azhati, Jiang Hong, Saifuding Musha. People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumuqi 830001, China

Corresponding author: Saifuding Masha, E-mail: 2062472984@qq.com

Funding program: Project Supported by the National Natural Science Foundation of China (81160095)

【Abstract】 Objective To observe the effect of peritoneal dialysis on renal function and cardiac function in elderly patients with end-stage renal disease. **Methods** From September 2016 to August 2018, 78 elderly patients with end-stage renal disease were hospitalized in the Nephrology Department of the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region. According to the random number table, the patients were divided into two groups, 39 cases in each group. The control group was given hemodialysis treatment, the observation group was given peritoneal dialysis treatment. After 4 months of treatment, the treatment effect of the two groups was compared, and the changes of renal function, heart function related indexes and psychological scores were observed. **Results** The therapeutic effect of the observation group was better than that of the control group ($\chi^2/P = 5.028/0.025$); after treatment, the glomerular filtration rate, serum creatinine and urea nitrogen water of the observation group were lower than those of the control group ($t/P = 11.131/0.032, 13.101/0.016, 11.181/0.028$); after treatment, the left ventricular ejection fraction, cardiac ejection index and stroke output of the observation group were higher than those of the control group, and the left ventricular posterior wall thickness was lower than that of the control group ($t/P = 9.547/0.055, 9.172/0.025, 9.043/0.054, 9.142/0.015$). The scores of SDS and SAS in the observation group were better than those in the control group ($t/P = 11.844/0.005, 10.415/0.015$). **Conclusion** The effect of peritoneal dialysis in elderly patients with end-stage renal disease is definite, which can be further popularized and applied in clinic.

【Key words】 End stage renal disease; Peritoneal dialysis; Therapeutic effect; Renal function; Cardiac function; Elderly

随社会发展, 人们生活饮食习惯发生变化, 终末期肾病发病率也呈日趋上升的迹象^[1]。终末期肾病是

多种肾病的最终阶段, 早期无明显临床症状, 随肾功能降低, 大量毒素蓄积于体内, 可出现口腔氨臭味、恶心

吐逆、水肿、食欲不振、皮肤瘙痒等临床症状,还可能并发贫血,对患者的生命健康产生严重的不良影响^[2]。相关研究指出,终末期肾病患者的透析方式与其肾功能改善密切相关^[3]。临床治疗老年终末期肾病患者的常用方式为肾脏替代疗法,主要是腹膜透析及血液透析,但因终末期肾病病情较为复杂特殊,如何选取透析方式已成为近几年临床研究热点^[4]。现观察对老年终末期肾病患者施以腹膜透析的治疗效果,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2016 年 9 月—2018 年 8 月新疆维吾尔自治区人民医院肾病科住院治疗老年终末期肾病患者 78 例,按随机数字表法分为 2 组,各 39 例。对照组男 23 例,女 16 例,年龄 66~79 (72.2±5.6) 岁;病程 0.5~3 (1.1±0.5) 年;慢性肾小球肾炎 16 例,糖尿病肾病 14 例,高血压肾病 9 例。观察组男 21 例,女 18 例,年龄 66~81 (73.1±5.9) 岁,病程 0.6~3 (1.4±0.3) 年;慢性肾小球肾炎 15 例,糖尿病肾病 13 例,高血压肾病 11 例。2 组患者的基本资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。本研究经过医院伦理委员会批准,患者或家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 选择标准 (1) 入选标准:无语言、认知障碍及精神病史;依从性良好,可完成研究;无家族遗传史。(2) 排除标准:存在恶性肿瘤、免疫、血液系统、传染病症者;近期服用抗抑郁类药品者;无法随访的患者。

1.3 治疗方法 观察组给予腹膜透析治疗,透析装置及透析液均由 Baxter 公司生产。透析液通过脐旁手术切开将直管置入,每次使用 1.5% 透析液 2 L,3~4 次/d。对照组给予血液透析治疗,透析液为反渗水及碳酸氢盐,经中心静脉通路进行插管,利用血液透析机进行透析,血液流量 160~250 ml/min,4 h/次,3 次/周。疗程均 4 个月。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 治疗效果评价:治疗后 4 个月比较 2 组治疗效果。显效,临床表现、酸中毒、电解质异常情况明显改善,尿素氮、血肌酐水平明显降低;有效,临床表现、酸中毒、电解质异常情况有所改善,尿素氮、血肌酐水平降低;无效,临床表现、酸中毒、电解质异常情况无变化或进一步加重,尿素氮、血肌酐水平未降低或上升,总有效率=(有效+显效)/总例数×100%^[5]。

1.4.2 肾功能指标水平检测:分别在治疗前后抽取患者空腹肘静脉血 3 ml,离心获取血清置入 -70℃ 的环境中保存待测,采用全自动生化分析仪(美国 Biosite

公司生产),利用双抗体夹心免疫荧光法测定肾小球滤过率、血肌酐及尿素氮,试剂盒均为相关配套试剂,并严格按照相关操作说明进行检测。

1.4.3 心功能指标水平检测:治疗前后分别采用超声心电图(美国 HP 公司生产,型号 SONOS 1500)检测心脏功能及结构(左心室射血分数、心脏指数、每搏输出量及左心室后壁厚度)。

1.4.4 SAS、SDS 评分:治疗后 4 个月,以 SAS、SDS 评分评估患者心理状态变化^[6]。SDS 评分标准,>73 分属重度抑郁;63~72 分属中度抑郁;53~62 分属轻度抑郁;<53 分属无抑郁。SAS 评分的标准,>70 分属重度焦虑;60~69 分属中度焦虑;50~59 分属轻度焦虑;<50 分属无焦虑。评分低代表心理状态得到改善,效果较为理想。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 18.0 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($\bar{x} \pm s$)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 组治疗效果比较 治疗后对照组总有效率为 74.4%,低于观察组的 94.9% ($\chi^2 = 5.028$, $P = 0.025$),见表 1。

表 1 2 组治疗总有效率比较 [例(%)]

组别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)
对照组	39	15 (38.5)	14 (35.9)	10 (25.6)	74.4
观察组	39	18 (46.2)	19 (48.7)	2 (5.1)	94.9

2.2 2 组肾功能指标比较 治疗前,2 组患者肾小球滤过率、血肌酐及尿素氮水平比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);治疗 4 个月后,2 组各项指标均显著改善,观察组均低于对照组 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 2 组患者治疗前后肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	肾小球滤过率 (ml/min)	血肌酐 (μ mol/L)	尿素氮 (mmol/L)
对照组 ($n=39$)	治疗前	11.1±4.9	186.3±13.3	10.2±1.3
	治疗后	9.3±3.1	135.6±14.2	8.7±1.3
观察组 ($n=39$)	治疗前	11.2±4.7	186.5±13.0	10.3±1.4
	治疗后	8.2±2.9	116.2±10.7	6.1±1.1
t/P 对照组内值		10.031/0.000	13.619/0.000	11.036/0.000
t/P 观察组内值		9.458/0.000	14.161/0.000	10.052/0.000
t/P 治后组间值		11.131/0.000	13.101/0.000	11.181/0.000

2.3 2 组心功能指标比较 治疗前,2 组患者左心室

射血分数、心脏指数、每搏输出量、左心室后壁厚度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗 4 个月后,2 组各项指标均显著改善,观察组左心室射血分数、心脏指数及每搏输出量均高于对照组,而左心室后壁厚度小于对照组(P 均 < 0.05),见表 3。

2.4 2 组 SAS 及 SDS 评分比较 治疗前,2 组患者 SAS 及 SDS 评分比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗 4 个月后,2 组患者抑郁评分及焦虑评分均显著下降,观察组 2 项评分均低于对照组(P 均 < 0.05),见表 4。

表 4 2 组患者治疗前后 SAS 及 SDS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组 别	例数	SDS 评分		SAS 评分	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	39	57.7 $\pm$ 2.8	37.3 $\pm$ 3.7	59.4 $\pm$ 2.9	38.3 $\pm$ 3.5
观察组	39	57.6 $\pm$ 2.9	22.4 $\pm$ 2.8	59.3 $\pm$ 2.7	23.7 $\pm$ 2.9
t 值		1.514	11.844	1.536	10.415
P 值		0.405	0.005	0.605	0.005

3 讨 论

透析是终末期肾病患者其最合适的治疗方案,较多研究证实,老年透析患者具有合并多脏器并发症、认知功能下降、意志力减退及潜在的混合感觉功能减弱等特点,长期存活率明显低于年轻患者。因此,需要探究哪种透析方式更适合老年终末期肾病患者。

终末期肾病主要是指各种慢性肾病的终末阶段,与尿毒症类似,区别在于诊断标准不一致。通常认为肾小球滤过率 $< 15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$ 时,即慢性肾病进展至 5 期时,便进入终末期肾病阶段;随着病情进展,肾脏功能逐渐下降,体内毒素聚集难以排出体外,患者多伴有水电解质紊乱、恶心、呕吐、食欲不振、口内氨臭味、四肢水肿、皮肤瘙痒及贫血等不适症状,若未经有效治疗,则进一步发展成尿毒症或肾衰竭。对于老年患者,尤其是伴有心脑血管疾病的患者,腹膜透析是治疗的首选。尿毒症作为严重威胁人类健康的疾病,也在一定程度上影响着患者情绪,患者常会出现

诸多心理问题,其中以抑郁最常见。抑郁对血液透析患者危害极大,研究表明,在透析治疗开始前,患者的抑郁状况可产生一系列心身反应,加重其心血管疾病的发病率和病死率。关于抑郁对腹膜透析患者,尤其是对老年腹膜透析患者的影响,目前还没有确切的研究数据。关于透析时间对腹膜透析患者的影响,本研究显示,透析时间短者抑郁症发病率高,考虑得知患病,并要适应腹透操作,担心感染等并发症问题,故有一个心理不平衡及不稳定的过程,此时患者的情绪变化大;而随着时间的延长,逐步了解该疾病,掌握了腹透的操作方法,心理状态反而改善,因此医务人员在早期应帮助患者渡过这个过程,尽量多鼓励、讲解,使患者保持情绪稳定。尿毒症患者腹膜透析主要受到经济的影响,虽然现在腹膜透析的费用较以前已明显下降,但是患者仍面临大额医疗费用的问题,老年人更容易发生抑郁问题。

导致终末期肾病的因素多种多样,临床病死率较高,原发性或继发性肾病病情控制情况欠佳的患者因病情反复发作,易演变为终末期肾病^[7]。终末期肾病患者出现营养不良的几率较高,明显增加发生心脑血管病的几率,因此,心脑血管病也是导致终末期肾病患者死亡的重要原因。同时,营养不良亦可使患者糖、脂代谢异常,发生炎症反应,因此,老年终末期肾病患者易发生肺部感染,对患者机体恢复产生严重影响,目前治疗方式主要是腹膜透析及血液透析^[8]。透析是将肾功能障碍患者体液内溶质及多余水分通过透析膜排出体外,辅助或替代完成肾脏功能的治疗方式。血液透析和腹膜透析是常见的透析治疗,血液透析将人体内血液引流至体外再通过人工合成的一种半透膜将血液内各种毒素及多余水分除去,达到净化血液目的;腹膜透析原理与血液透析类似,区别在于腹膜透析是以人体自身腹膜作为透析膜。目前,对于 2 种透析方式的选择尚不明确,部分医生及患者对于透析方式的选择存在盲目性。对于不同透析方式患者的生存预后及生存率状况缺乏明确的研究。

表 3 2 组患者治疗前后心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	左心室射血分数	心脏指数($\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)	每搏输出量(ml/L)	左心室后壁厚度(mm)
对照组 ($n=39$)	治疗前	0.4 $\pm$ 0.1	2.86 $\pm$ 0.33	67.9 $\pm$ 19.9	13.0 $\pm$ 1.7
	治疗后	0.5 $\pm$ 0.1	4.01 $\pm$ 0.57	80.1 $\pm$ 10.2	11.3 $\pm$ 1.1
观察组 ($n=39$)	治疗前	0.4 $\pm$ 0.2	2.85 $\pm$ 0.31	68.0 $\pm$ 20.1	12.9 $\pm$ 1.5
	治疗后	0.6 $\pm$ 0.2	4.87 $\pm$ 0.63	89.7 $\pm$ 15.3	9.4 $\pm$ 0.8
t/P 对照组内值		4.416/0.000	10.426/0.000	10.147/0.000	9.143/0.000
t/P 观察组内值		9.951/0.000	10.287/0.000	10.574/0.000	9.172/0.000
t/P 治后组间值		9.547/0.000	9.172/0.000	9.043/0.000	9.142/0.000

腹膜透析目前已在临床上逐渐开展,已获得国内外诸多研究学者的广泛关注与认可。临床上应用腹膜透析治疗时无需建立体外循环,进而有效降低了治疗后人体内环境的变化,利于促进机体内血流动力学的稳定,有效保护患者残肾功能,提升人体内中分子物质排出率,维持机体内水电解质平衡稳定。但临床治疗发现,腹膜透析治疗时极易诱发多种并发症,这对临床治疗效果与患者生命安全均存在不利影响。与腹膜透析相比,血液透析治疗效率显著提升,但由于其需建立体外循环,导致治疗前后患者体内循环变化较大,需对患者进行积极的抗凝治疗,这将增加患者出血风险与心脑血管恶性事件发生率,对肾脏形态、残余肾功能影响较大,不利于保障治疗安全。腹膜透析最初在临床上是作为血液透析的辅助治疗手段,因其并发症腹膜炎发病率较高,当慢性肾衰竭患者不适合做血液透析治疗时才考虑腹膜透析。目前腹膜透析技术日趋成熟,腹膜炎发病率也越来越低,且腹膜透析患者前 3 年内生存率稍高于或基本同于血液透析,因此腹膜透析在终末期肾病患者治疗中所占比例也愈来愈高,甚至超过血液透析。2 种透析方法均是以清除体内代谢废物和有害物质、纠正电解质紊乱、维持酸碱平衡为目的的带有一定创伤的治疗,如行血液透析治疗的终末期肾病患者易出现恶心、呕吐、心力衰竭、心律失常、肌肉痉挛等并发症,严重影响患者生活质量,也影响预后和生存时间^[9-12]。

老年终末期肾病患者给予腹膜透析可保护患者残余肾功能,其原因可能是腹膜透析能提升超氧化物歧化酶活性,减轻载脂蛋白毒性,升高肾实质细胞的代谢值,降低血浆内皮素、血肌酐及尿素氮的水平,抑制肾纤维化,减轻肾缺血性受损,改善肾小球滤过率,明显延缓肾小球硬化^[13]。有学者指出,终末期肾病患者选取何种透析方式与其肾功能改善情况、治疗效果及生存期等密切相关^[14]。同时,相关研究指出,经腹膜透析治疗后的肾病患者,其 3 年内肾功能降低程度低于经血液透析治疗的肾病患者^[15-16]。有研究资料显示,长期腹膜透析治疗的肾功能下降程度、感染风险低,恢复快,有利于早期康复,缩短住院时间,减少医疗费用。

本研究显示,观察组治疗效果优于对照组($P < 0.05$),与相关研究结果一致。终末期肾病患者出现动脉粥样硬化的危险因素主要是脂质代谢异常,因此,改善机体脂代谢可有效降低发生心血管病的几率。研究显示,治疗后观察组左心室射血分数、心脏指数及每搏输出量均高于对照组,左心室后壁厚度小于对照组($P < 0.05$)。其原因可能是腹膜透析无需体外循环,

患者治疗前后的内环境差异较小,血流动力学较稳定。研究亦显示,治疗后观察组抑郁评分及焦虑评分均优于对照组($P < 0.05$)。说明采用腹膜透析治疗,相比血液透析治疗,对老年终末期肾病患者更具安全性,且治疗效果显著。对老年患者实施腹膜透析治疗,还能改善患者的心理状态,提高患者对疾病的认知。其原因可能是通过腹膜透析治疗,不仅能使患者病情得到明显改善,还可能保护患者残余肾功能和心功能,因腹膜透析无需体外循环,患者发生感染的几率较低,可减少治疗痛苦,有利于减少患者焦虑、抑郁等负面情绪,有利于延长生存期,提升生存质量。

此次研究也存在部分不足,本次研究所选取的病例数较少,获得的结果可能具有一定的局限性,后期需进行更加深入的探索和研究,为临床治疗老年终末期肾病提供一定的参考。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

热孜万古丽·阿布都拉:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;贾依娜西·阿扎提:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;姜鸿:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;赛福丁·木沙:课题设计,进行统计学分析,论文终审

参考文献

- [1] 杨军,曾建,孙红亮. 维持性血液透析患者血清钙磷及 PTH 水平与心脏结构功能的相关性[J]. 中国临床研究,2019,34(4):527-530. DOI:10.13429/j.cnki.cjcr.2019.04.023.
- [2] Ponce D, Thyago de Moraes TP, Pecoits-Filho R, et al. Peritonitis in children on chronic peritoneal dialysis: The experience of a large national pediatric cohort[J]. Blood Purification, 2018,45(1-3):118-125. DOI:10.1159/000484344.
- [3] 姚淑琴,张红娟,胡中华,等. 慢性肾功能衰竭患者腹膜透析期间腹腔感染的影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2019,24(5):684-686. DOI: 10.11816/cn.ni.2019-180659.
- [4] 杨书平,薛劲松,戴晓萍,等. 维持血液透析患者临床质控指标分析[J]. 中国临床研究,2018,33(6):809-812. DOI:10.13429/j.cnki.cjcr.2018.06.025.
- [5] 沈亦蔚,苏新琦,刘苗,等. 腹膜透析患者肌少症的发生率和危险因素[J]. 中华肾脏病杂志,2019,35(4):268-274. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2019.04.005.
- [6] 陈静,李莉,潘巧虹,等. 血液透析与腹膜透析肾功能衰竭患者的感染特征及影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2018,62(15):2298-2301. DOI: 10.11816/cn.ni.2018-173233.
- [7] 陈佩娜,吴宝林,胡润月,等. 终末期肾病患者认知功能损害与脑局部一致性的相关性研究[J]. 中华神经医学杂志,2019,18(1):55-60. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2019.01.010.
- [8] 原成英,周晓霜,李荣山. 终末期肾脏病患者血液透析前后血浆鸢尾素水平的变化[J]. 中华肾脏病杂志,2017,33(12):895-899. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2017.12.003.

(下转 357 页)

沙格列汀联合缬沙坦对早期 2 型糖尿病肾病患者炎性指标与肾功能的影响

张彤, 凌宏威, 应长江, 赵越, 程雪, 韩啸, 郭凯, 张闫, 张梅, 李伟

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81701298); 江苏省徐州市科技项目 (KC17194)

作者单位: 221000 徐州医科大学附属医院内分泌科

通信作者: 李伟, E-mail: Liwei190@hotmail.com

【摘要】目的 观察沙格列汀联合缬沙坦对早期 2 型糖尿病肾病患者炎性指标及肾功能的影响。**方法** 收集 2017 年 12 月—2018 年 8 月徐州医科大学附属医院内分泌科收治早期 2 型糖尿病肾病患者 108 例, 采用随机数字表法分为 2 组, 每组 54 例。A 组予二甲双胍 + 阿卡波糖治疗, B 组予二甲双胍 + 沙格列汀治疗, 2 组均用缬沙坦治疗蛋白尿, 连续治疗 12 周。比较 2 组治疗前后血糖、脂质代谢、肾功能及炎性指标水平, 并记录不良反应发生情况。**结果** B 组治疗总有效率高 A 组 (88.9% vs. 66.7%, $\chi^2 = 7.714$, $P = 0.005$)。治疗后 2 组患者的空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (2 hPG)、糖化血红蛋白 (HbA_{1c})、尿白蛋白/肌酐比值 (UACR) 及血清 hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平均较治疗前降低, 且 B 组较 A 组下降更显著 ($t/P = 3.354, 6.997, 9.702, 5.882, 6.622, 6.106, 7.526$, P 均 < 0.05)。B 组治疗后 CysC 较治疗前降低 ($t/P = 8.146$, $P = 0.000$), A 组治疗后 CysC 亦降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用药期间 2 组不良反应发生率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 沙格列汀联合缬沙坦治疗早期 2 型糖尿病肾病能有效改善患者的血糖, 明显降低 UACR 及炎性因子水平, 值得临床推广。

【关键词】 糖尿病肾病; 沙格列汀; 缬沙坦; 尿白蛋白肌酐比值; 炎性反应

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.007

The effect of combination of salaglipitin and valsartan on inflammatory index and renal function in patients with early type 2 diabetic nephropathy Zhang Tong, Ling Hongwei, Ying Changjiang, Zhao Yue, Cheng Xue, Han Xiao, Guo Kai, Zhang Yan, Zhang Mei, Li Wei. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu Province, Xuzhou 221000, China

Corresponding author: Li Wei, E-mail: liwei190@hotmail.com

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81701298); Science and Technology Project of Xuzhou, Jiangsu (KC17194)

【Abstract】Objective To observe the effect of salaglipitin combined with valsartan on inflammatory indexes and renal function in patients with early type 2 diabetic nephropathy (DN). **Methods** From December 2017 to August 2018, 108 patients with early DN were admitted to the Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University. Randomly divided into two groups, 54 cases in each group. Group A was treated with metformin + acarbose, group B with metformin + sagglipitin, and both groups were treated with Valsartan for proteinuria for 12 weeks. Blood glucose, lipid metabolism, renal function and inflammatory indexes were compared before and after treatment, and adverse reactions were recorded. **Results** The total effective rate in group B was higher than that in group A (88.9% vs. 66.7%, $\chi^2 = 7.714$, $P = 0.005$). The fasting blood glucose (FPG), postprandial blood glucose (2hPG), HbA_{1c}, UACR and serum hs-CRP, IL-6, TNF- α levels in the two groups were all lower than those before treatment, and the decrease in group B was more significant than that in group A ($t/P = 3.354, 6.997, 9.702, 5.882, 6.622, 6.106, 7.526$, $P < 0.05$). CysC in group B was lower than that before treatment ($t/P = 8.146$, $P = 0.000$). CysC in group A was also lower after treatment, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Treatment of early DN with combination of salaglipitin and valsartan can effectively improve blood glucose, significantly reduce the level of UACR and inflammatory factors, which is worthy of clinical promotion.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Saxagliptin; Valsartan; Urinary albumin to creatinine ratio; Inflammation

糖尿病肾病(DN)是2型糖尿病的主要微血管并发症之一,是导致终末期肾病(ESRD)的主要原因,占全球所有启动肾脏替代治疗(renal replacement therapy, RRT)患者的1/3^[1-2]。DN发病隐匿且进展缓慢,其早期特征是尿中白蛋白轻度增加,逐步进展至大量白蛋白尿及肾小球滤过率下降,最终发展为不可逆的肾功能衰竭^[3]。缬沙坦是血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂,近年来研究显示^[4],其有预防及治疗DN的作用。沙格列汀(saxagliptin)属于二肽基肽酶4(DPP-4)竞争性抑制剂,主要通过抑制促胰岛素激素(GLP-1)和胃肠肽(GIP)的降解而降低血糖^[5]。研究结果证实,沙格列汀可以降低2型糖尿病肾病患者尿白蛋白/肌酐(UACR)水平,具有肾脏保护作用^[6]。但目前尚未发现二者联合应用的相关报道。现观察沙格列汀联合缬沙坦对早期2型糖尿病肾病患者肾功能及炎性指标的影响,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集2017年12月—2018年8月徐州医科大学附属医院内分泌科收治早期2型糖尿病肾病患者108例,采用随机数字表法分为A组和B组,各54例。A组男32例,女22例,年龄22~73(58.12±8.23)岁;糖尿病病程2.6~8.3(5.2±2.3)年。B组男29例,女25例,年龄21~76(57.73±7.84)岁;糖尿病病程2.8~8.9(5.8±2.6)年。见表1。本研究经医院伦理委员会批准,患者及家属对本次研究知情同意且签署同意书。

1.2 选择标准 (1)纳入标准:①符合1999年世界卫生组织(WHO)T2DM诊断标准;②DN早期分期标准参照Mogensen等^[7]DN诊断分期法,3~6个月内收集DN患者3次晨尿标本,3次检测中有2次尿白蛋白排泄率(UAER)稳定在20~200 μg/min(UACR 30~300 mg/g)范围内;③7% < 糖化血红蛋白(HbA_{1c}) < 9%,既往3个月未使用胰高血糖素样肽-1类似物、二肽基肽酶4抑制剂、α-葡萄糖苷酶抑制剂治疗者;④近3个月未使用肾毒性药物。(2)排除标准:①1型糖尿病;②排除剧烈运动、高蛋白摄入、泌尿系感染、发热、心力衰竭、未纠正的严重高血压等所致的一过性尿蛋白升高因素;③合并严重感染、恶性肿瘤及心、肝、脑等脏器有严重器质性病变者;④妊娠及哺乳期妇女;⑤不合作者(不按规定配合饮食控制、服药及进行指标检查者)。

1.3 治疗方法 根据患者具体情况制定饮食、控制总热量摄入及适当运动。血压>136/86 mmHg口服钙通道阻滞剂,使血压控制在正常范围内。A组予二甲

双胍(格华止,中美上海施贵宝制药有限公司生产)0.5 g口服,每天2次;阿卡波糖(拜糖苹,拜耳医药保健有限公司生产)50 mg餐时嚼服,每天3次;B组应用二甲双胍同上,沙格列汀(安立泽, AstraZeneca Pharmaceuticals LP生产)5 mg口服,每天1次。2组均予缬沙坦(代文,诺华制药有限公司生产)80 mg口服,每天1次。2组患者均持续治疗12周。

1.4 观测指标与方法 于治疗前及治疗12周后分别采集患者空腹肘静脉血10 ml待测。

1.4.1 血压、血糖及脂质指标检测:测量2组患者治疗前后的血压[收缩压(SBP)、舒张压(DBP)],测3次取平均值。采用全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司,日立7600)检测空腹血糖(FPG)、餐后2 h血糖(2 hPG)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C);HbA_{1c}由全自动糖化血红蛋白分析仪(瑞士罗氏公司)检测。

1.4.2 肾功能指标检测:采用全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司,日立7600)检测胱抑素C(CysC)、肌酐(SCr);于治疗前及治疗12周后分别在空腹状态下采集患者清晨首次尿标本,用放射免疫法测定尿白蛋白,速率法测定尿肌酐,计算尿白蛋白/肌酐比值(UACR);计算肾小球滤过率(eGFR),改良肾脏饮食修正公式(MDRD)^[8]: $eGFR = 175 \times SCr^{-1.234} \times \text{年龄}^{-0.179}$ (女性×0.79)。

1.4.3 炎性指标检测:采用免疫比浊法(德国西门子BN特定蛋白仪)测定血清hs-CRP,免疫层析法(武汉明德生物科技公司的PCT检测仪)检测血清PCT,试剂盒均购自瑞士罗氏公司;采用ELISA法检测血清IL-6、TNF-α水平,检测过程严格按照检测试剂盒(购自上海科华生物技术有限公司)操作说明进行。

1.4.4 疗效评价标准^[9] (1)显效:治疗12周后,炎性因子、血糖、肾功能指标降低>50%;(2)有效:治疗12周后,炎性因子、血糖、肾功能指标降低20%~50%;(3)无效:治疗12周后,炎性因子、血糖、肾功能指标改善不明显,降低<20%。总有效率=(显效+有效)/总例数×100%。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内治疗前后比较采用配对t检验,组间比较采用独立样本t检验。计数资料以频数或率(%)表示,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组临床资料比较 治疗前,2组患者的性别、年龄、糖尿病病程、基础病、合并症、治疗史、家族史、血

压、血糖指标、脂质代谢及 UACR 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。

表 1 2 组患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	A 组($n=54$)	B 组($n=54$)	χ^2/t 值	P 值
男/女(例)	32/22	29/25	0.339	0.560
年龄(岁)	58.12 $\pm$ 8.23	57.73 $\pm$ 7.84	0.221	0.825
糖尿病病程(年)	5.2 $\pm$ 2.3	5.8 $\pm$ 2.6	0.454	0.642
基础病[例(%)]				
高血压	28(51.85)	24(44.44)	0.593	0.441
高血脂	33(61.11)	36(66.67)	0.361	0.548
冠心病	16(29.63)	19(35.19)	0.380	0.537
合并症[例(%)]				
糖尿病足	4(7.41)	5(9.26)	0.000	1.000
糖尿病视网膜病变	11(20.37)	13(24.07)	0.214	0.643
糖尿病周围神经病变	14(25.93)	11(20.37)	0.468	0.494
治疗史[例(%)]	24(44.44)	28(51.85)	0.593	0.441
家族遗传史[例(%)]	13(24.07)	12(22.22)	0.052	0.820
SBP(mmHg)	134 $\pm$ 16	132 $\pm$ 14	1.166	0.246
DBP(mmHg)	85 $\pm$ 11	83 $\pm$ 12	1.373	0.173
FPG(mmol/L)	9.63 $\pm$ 0.92	9.76 $\pm$ 1.22	0.925	0.357
2 hPG(mmol/L)	13.71 $\pm$ 1.82	13.56 $\pm$ 2.27	0.995	0.322
HbA _{1c} (%)	9.16 $\pm$ 0.61	9.28 $\pm$ 0.45	1.107	0.271
TG(mmol/L)	2.30 $\pm$ 1.29	2.26 $\pm$ 1.38	0.120	0.905
LDL-C(mmol/L)	3.18 $\pm$ 1.09	3.23 $\pm$ 1.12	1.593	0.114
HDL-C(mmol/L)	1.32 $\pm$ 0.34	1.29 $\pm$ 0.30	0.186	0.845
UACR(mg/g)	130.23 $\pm$ 43.87	136.12 $\pm$ 44.22	0.875	0.384

2.2 2 组疗效比较 治疗 12 周后 B 组总有效率为 88.9%,显著高于 A 组的 66.7% ($P<0.01$),见表 2。

表 2 2 组患者治疗后疗效比较 [例(%)]

组 别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)
A 组	54	12(22.3)	24(44.4)	18(33.3)	66.7
B 组	54	19(35.2)	29(53.7)	6(11.1)	88.9
U/χ^2 值		$U=8.052$		$\chi^2=7.714$	
P 值		0.018		0.005	

2.3 2 组血压、血糖及脂质代谢指标比较 治疗 12 周后,2 组血压均较治疗前明显降低($P<0.01$),但组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);2 组 FPG、2 hPG、HbA_{1c}水平均较治疗前降低($P<0.01$),B 组较 A 组下降更明显($P<0.05$);2 组 TG、LDL-C、HDL-C 水平均较治疗前变化不明显,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.4 2 组肾功能指标比较 治疗 12 周后,2 组患者 UACR 水平较治疗前下降($P<0.05$),且 B 组下降较 A 组更显著($P<0.01$);B 组 CysC 较治疗前降低($P<0.01$),A 组治疗后 CysC 亦降低,但差异无统计学意义($P>0.05$),B 组 CysC 降低大于 A 组($P<0.01$);2

组的 e-GFR、SCr 水平均较治疗前无明显变化($P>0.05$),组间比较差异亦无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

2.5 2 组炎症指标比较 治疗 12 周后,2 组患者 hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平均较治疗前明显降低($P<0.01$);B 组 hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平低于 A 组($P<0.01$),见表 5。

2.6 2 组不良反应发生情况比较 观察期间,2 组分别有 4 例和 2 例出现轻微胃肠道反应,对症处理后症状缓解。2 组均未出现低血糖反应、肝肾功能异常。A 组不良反应发生率为 7.41% (4/54),B 组为 3.70% (2/54),2 组比较差异无统计学意义($\chi^2=0.176$, $P=0.674$)。

3 讨 论

DN 的发病机制十分复杂,迄今仍未彻底阐明。目前认为与遗传因素、高糖状态下的代谢紊乱、肾血流动力学改变、局部炎症反应及氧化应激等诸多因素有关^[10]。研究认为^[11-12],持续存在的慢性微炎症反应在糖尿病肾病进展中发挥着重要作用。减少炎症细胞向肾脏趋化,抑制炎症因子的表达,可以减轻 DN^[13]。临床研究也显示^[14],DN 患者体内 TNF- α 、IL-6 及 hs-CRP 等炎症因子水平升高,且与尿微量白蛋白排泄率呈正相关。炎症细胞因子(如 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 等)可直接破坏肾脏结构并促进上皮间充质转化的过程,导致细胞外基质积聚,也可引起肾脏血流学改变、血管通透性增强、其他炎症因子产生,从而参与 DN 的发生与发展^[15]。

缬沙坦是血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂,主要通过高度选择性竞争 Ang II 受体使 RAS 系统受到抑制。它可以通过扩张血管,缓解肾小球的高滤过状态,改善肾脏组织的血液循环^[16]。同时,缬沙坦还通过抑制肾组织局部炎症因子生成,阻止肾小球细胞增生肥大,延缓肾小球硬化,从而减轻肾损害^[4]。沙格列汀是一种强效、选择性的 DPP-4 抑制剂,国内外研究证实,沙格列汀可显著降低糖尿病肾病患者尿蛋白水平^[6,17-18]。其降低尿蛋白的作用机制除与改善血糖水平有关外,还可能与提高 GLP-1 水平,减轻炎症反应和氧化应激有关^[19]。

对于 2 型糖尿病患者,沙格列汀不论单药使用还是联合使用均可显著改善血糖,且不增加低血糖风险^[20]。本研究结果显示,治疗后 2 组患者的血糖、糖化血红蛋白均较治疗前明显下降,且 B 组下降更明显。再次证实沙格列汀可以较好地控制血糖,与既往研究结果一致^[21]。

表 3 2 组血压、血糖及脂质代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	A 组 ($n=54$)			B 组 ($n=54$)			t/P 治疗后组间值
	治疗前	治疗后	t/P 值	治疗前	治疗后	t/P 值	
SBP (mmHg)	134 ± 16	121 ± 13	6.607/0.000	132 ± 14	118 ± 11	6.826/0.000	0.981/0.329
DBP (mmHg)	85 ± 11	72 ± 9	7.532/0.000	83 ± 12	70 ± 10	6.829/0.000	0.381/0.704
FPG (mmol/L)	9.63 ± 0.92	8.25 ± 0.73	9.270/0.000	9.76 ± 1.22	7.63 ± 0.91	14.743/0.000	3.354/0.035
2 hPG (mmol/L)	13.71 ± 1.82	10.47 ± 2.16	8.308/0.000	13.56 ± 2.27	8.82 ± 1.79	13.095/0.000	4.322/0.000
HbA _{1c} (%)	9.16 ± 0.61	7.48 ± 0.46	13.628/0.000	9.28 ± 0.45	6.62 ± 0.32	11.888/0.000	9.702/0.000
TG (mmol/L)	2.30 ± 1.29	2.12 ± 1.07	0.125/0.901	2.26 ± 1.38	2.04 ± 1.14	1.086/0.282	0.804/0.423
LDL-C (mmol/L)	3.18 ± 1.09	3.09 ± 1.02	0.492/0.624	3.23 ± 1.12	3.01 ± 1.10	1.596/0.116	0.530/0.597
HDL-C (mmol/L)	1.32 ± 0.34	1.38 ± 0.42	0.824/0.413	1.29 ± 0.30	1.42 ± 0.26	1.719/0.091	0.460/0.646

表 4 2 组患者治疗前后肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	UACR (mg/g)	eGFR (ml · min ⁻¹ · 1.73 m ⁻²)	SCr (μmol/L)	CysC (mg/L)
A 组 ($n=54$)	治疗前	130.23 ± 43.87	102.37 ± 20.52	74.46 ± 13.82	1.33 ± 0.32
	治疗后	108.36 ± 40.83	99.28 ± 19.65	73.23 ± 12.47	1.17 ± 0.34
B 组 ($n=54$)	治疗前	136.12 ± 44.22	98.16 ± 17.83	76.35 ± 15.15	1.22 ± 0.38
	治疗后	92.30 ± 35.36	94.35 ± 16.21	72.28 ± 14.62	0.71 ± 0.16
t/P A 组内值		2.265/0.028	1.008/0.286	0.112/0.928	1.948/0.057
t/P B 组内值		12.638/0.000	1.278/0.207	1.758/0.084	8.146/0.000
t/P 治疗后组间值		5.882/0.005	1.363/0.176	0.526/0.600	9.114/0.000

表 5 2 组患者治疗前后炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	hs-CRP (mg/L)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
A 组 ($n=54$)	治疗前	8.26 ± 0.68	27.18 ± 6.21	48.37 ± 10.25
	治疗后	6.04 ± 0.53	18.34 ± 4.28	29.64 ± 8.66
B 组 ($n=54$)	治疗前	8.12 ± 0.87	28.90 ± 5.72	50.10 ± 12.48
	治疗后	3.87 ± 0.46	12.27 ± 5.84	18.45 ± 7.35
t/P A 组内值		6.059/0.000	8.797/0.000	10.609/0.000
t/P B 组内值		10.878/0.000	12.219/0.000	16.758/0.000
t/P 治疗后组间值		6.622/0.000	6.106/0.000	7.526/0.000

本研究结果显示,治疗后 2 组患者 UACR 及血清中 hs-CRP、IL-6、TNF-α 水平均较治疗前明显降低。其降低 UACR 水平可能与控制血糖,解除高糖影响及缬沙坦减少肾灌注、减轻炎症反应有关。另外,结果显示,治疗后 B 组患者 UACR、CysC、hs-CRP、IL-6 及 TNF-α 水平明显低于 A 组,说明沙格列汀与阿卡波糖相比,可以更好地减少尿蛋白,保护肾功能。其降低尿蛋白的机制可能与其较好的控制血糖及抑制炎症反应有关。Matsubara 等^[22] 研究显示,在人类巨噬细胞培养中,DPP-4 抑制剂可以增加 GLP-1 引起的细胞内 cAMP 水平,通过激活 cAMP/Pka 通路,抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、NF-κB (P65) 及 Erk-1/2 的磷酸化,从而抑制促炎细胞因子 (IL-6、TNF-α) 的表达。此外,最近一项动物实验研究表明^[5],沙格列汀可能通过抑制肾小球和肾小管中 DPP-4 活性来抑制肾脏炎症反应和纤维化相关因子如 TNF-α、IL-6、TGF-β 等表达,使肾小球硬化和肾脏纤维化减轻,从而改善蛋白

尿。除此之外,本结果显示,A、B 组治疗方案所产生的不良反应率无显著差异,提示安全性较高。

综上所述,沙格列汀不仅能有效降低血糖,还可以减轻机体内炎症反应,缬沙坦对 DN 患者亦有肾脏保护作用,沙格列汀联合缬沙坦对早期 DN 有更好的治疗效果,且安全性好,但是否有其他作用机制还需进一步研究观察。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张彤:提出研究思路、设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;凌宏威、应长江:提出研究思路、数据收集、设计论文框架;赵越、程雪、韩啸、张梅:实施研究过程、资料搜集整理;郭凯、张闫:进行统计分析;李伟:课题设计、论文修改、论文审核

参考文献

- [1] Zelnick LR, Weiss NS, Kestenbaum BR, et al. Diabetes and CKD in the United States population [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12 (12): 1984-1990. DOI: 10.2215/CJN.03700417.
- [2] Thomas MC, Cooper ME, Zimmet P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12 (2): 73-81. DOI: 10.1038/nrneph.2015.173.
- [3] Agrawal L, Azad N, Emanuele NV, et al. Observation on renal outcomes in the Veterans Affairs Diabetes Trial [J]. Diabetes Care, 2011, 34 (9): 2090-2094. DOI: 10.2337/dc11-0175.
- [4] 潘道延, 沈洁. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统与糖尿病肾病 [J/OL]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2015, 9 (4): 523-527. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2015.04.001.
- [5] Uchii M, Kimoto N, Sakai M, et al. Glucose-independent renoprotec-

- tive mechanisms of the tissue dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, saxagliptin, in Dahl salt-sensitive hypertensive rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 783: 56-63. DOI:10.1016/j.ejphar.2016.04.005.
- [6] Mosenzon O, Leibowitz G, Bhatt DL, et al. Effect of saxagliptin on renal outcomes in the SAVOR-TIMI 53 trial [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(1): 69-76. DOI:10.2337/dc16-0621.
- [7] Mogensen CE. Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: Origin and development of ideas [J]. *Diabetologia*, 1999, 42(3): 263-285. DOI:10.1007/s001250051151.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会微血管及并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(11): 792-801. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2014.11.004.
- [9] 徐波, 冯云华, 张瑛, 等. 津力达颗粒联合通心络胶囊治疗早期糖尿病肾病患者对微炎性状态及肾功能保护的影响 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(9): 936-939. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2018.09.017.
- [10] 张秀华, 曹式丽. 糖尿病肾病的发病机制研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(6): 1212-1216. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2019.06.032.
- [11] Barutta F, Bruno G, Grimaldi S, et al. Inflammation in diabetic nephropathy: Moving toward clinical biomarkers and targets for treatment [J]. *Endocrine*, 2015, 48(3): 730-742. DOI:10.1007/s12020-014-0437-1.
- [12] 张洋, 马坤岭, 刘晶, 等. 慢性炎性反应对糖尿病肾病的促进作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(9): 681-686. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.09.008.
- [13] Sakai N, Wada T. Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: The role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells [J]. *Kidney Int*, 2015, 87(1): 12-14. DOI:10.1038/ki.2014.322.
- [14] 侯斌, 石峻. 2 型糖尿病肾病患者血清 hs-CRP、Hcy、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的水平检测及临床意义 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2015, 18(3): 383-385. DOI:10.11723/mtgyx1007-9564201503013.
- [15] 陈小永, 宋军营, 王自闯. 炎症和氧化应激在糖尿病肾病中的应用 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6254-6256. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.24.108.
- [16] 张福霞, 刘海霞, 陈文峰. 血管紧张素 II 受体拮抗剂防治老年糖尿病肾病研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4409-4411. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.15.140.
- [17] Bae JH, Kim S, Park EG, et al. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on renal outcomes in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2019, 34(1): 80-92. DOI:10.3803/EnM.2019.34.1.80.
- [18] 郭娟娟, 李金金, 董荣娜, 等. 沙格列汀对 2 型糖尿病早期肾病患者尿微量白蛋白的影响 [J]. *中国实用医药*, 2019, 14(15): 95-96. DOI:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2019.19.052.
- [19] 赵静, 武晓泓. 肠促胰岛素在糖尿病肾病治疗中的研究进展 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7(1): 54-56. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2015.01.015.
- [20] 苏青. 中国 2 型糖尿病患者沙格列汀临床应用进展 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2015, 31(7): 649-652. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2015.07.024.
- [21] 王雯, 陈一丁, 钱铁镭, 等. 沙格列汀联合二甲双胍对老年 2 型糖尿病患者血糖、血压及糖化血红蛋白的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(2): 332-333. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2016.02.035.
- [22] Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes [J]. *Circ J*, 2013, 77(5): 1337-1344. DOI:10.1253/circj.cj-12-1168.

(收稿日期: 2019-11-27)

(上接 352 页)

- [9] Kalantar Zadeh K, Parameswaran V, Ficociello LH, et al. Real-World scenario improvements in serum phosphorus levels and pill burden in peritoneal dialysis patients treated with sucroferic oxyhydroxide [J]. *American Journal of Nephrology*, 2018, 47(3): 153-161. DOI:10.1159/000487856.
- [10] 周麟, 李向东, 赵明. 血清 FGF-23、sKL 检测对持续非卧床腹膜透析患者心脏瓣膜钙化的预测价值 [J]. *山东医药*, 2019, 59(13): 33-36. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.13.007.
- [11] Shen YJ, Cai RR, Sun J, et al. Diabetes mellitus as a risk factor for incident chronic kidney disease and end-stage renal disease in women compared with men: A systematic review and meta-analysis [J]. *Endocrine*, 2017, 55(1): 66-76. DOI:10.1007/s12020-016-p14-6.
- [12] 张翠玲, 章俊. 腹膜透析患者左心室舒张功能不全的发病机制 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(10): 1555-1557. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2017.10.006.
- [13] Marcos Wolf, Anneloes De Boer, Kanishka Sharma, et al. Magnetic resonance imaging T1- and T2-mapping to assess renal structure and function: a systematic review and statement paper [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2018, 33(Suppl 2): 41-50. DOI:10.1093/ndt/gfy198.
- [14] 高豆青, 单岩, 张琳, 等. 终末期肾脏病患者与主要照顾者疾病不确定感的相关性研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(8): 1145-1148. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.08.048.
- [15] 李迎婕, 魏晓岩, 贾军利, 等. 维持性血液透析终末期肾性高血压病患者血清 NT-proBNP、BPV 与心血管事件的相关性分析 [J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(4): 364-368. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.04.009.
- [16] Swartz SJ, Neu A, Skversky Mas on A, et al. Exit site and tunnel infections in children on chronic peritoneal dialysis: findings from the Standardizing Care to Improve Outcomes in Pediatric End Stage Renal Disease (SCOPE) Collaborative [J]. *Pediatric Nephrology*, 2018, 33(6): 1029-1035. DOI:10.1007/s00467-018-3889-3.

(收稿日期: 2019-11-27)

津力达颗粒对 2 型糖尿病患者胰岛功能及脂代谢的影响

赵晓娟, 权青云, 张愉, 张贵云, 张克举, 王建国

作者单位: 710054 西安, 武警陕西总队医院老干部病区

通信作者: 权青云, E-mail: 13669261090@163.com

【摘要】目的 观察津力达颗粒对 2 型糖尿病患者胰岛素功能及脂代谢的影响。**方法** 收集 2017 年 10 月—2019 年 1 月武警陕西总队医院诊治的 2 型糖尿病患者 116 例, 按随机数字表法分为对照组 ($n=56$) 和观察组 ($n=60$)。对照组口服常规降血糖药物, 观察组在原有降糖药物的基础上, 加服津力达颗粒 9 g, 3 次/日, 连续服用 3 个月。分别在治疗前后测定 2 组患者空腹血糖 (FPG)、餐后 2 h 血糖 (2 hPG)、糖化血红蛋白 (HbA_{1c})、血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平、胰岛素分泌指数 (HOMA- β)、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、脂联素及瘦素, 并观察患者的不良反应情况。**结果** 与治疗前比较, 2 组 FPG、2 hPG、 HbA_{1c} 水平均有下降, 且观察组优于对照组 ($t/P=-3.480/0.009$ 、 $-7.692/0.000$ 、 $-7.816/0.000$); 治疗后观察组 TC、TG、LDL-C 水平较对照组下降显著, HDL-C 水平较对照组升高 ($t/P=-2.434/0.018$ 、 $-2.694/0.008$ 、 $-2.237/0.004$ 、 $3.377/0.001$), HOMA- β 、HOMA-IR、脂联素及瘦素较对照组明显改善 ($t/P=2.057/0.042$ 、 $-2.023/0.045$ 、 $2.310/0.031$ 、 $-3.200/0.003$)。**结论** 津力达颗粒能有效改善 2 型糖尿病患者胰岛功能, 并对脂代谢有明显改善作用, 考虑与其对脂联素及瘦素的调控有关。

【关键词】 津力达颗粒; 2 型糖尿病; 胰岛功能; 脂代谢

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.008

Effect of Jinlida granule on islet function and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus Zhao Xiaojuan, Quan Qingyun, Zhang Yu, Zhang Guiyun, Zhang Keju, Wang Jianguo. Cadre ward, Shaanxi Provincial Corps Hospital, Chinese People Armed Police Forces, Shaanxi Province, Xi'an 710054, China

Corresponding author: Quan Qingyun, E-mail: 13669261090@163.com

【Abstract】Objective To observe the effect of Jinlida granule on insulin function and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes. **Methods** From October 2017 to January 2019, 116 patients with type 2 diabetes were collected. The patients were divided into control group ($n=56$) and observation group ($n=60$). The control group was treated with conventional hypoglycemic drugs, and the observation group was treated with Jinlida granule 9g, 3 times/day, for 3 months. FPG, 2 hPG, HbA_{1c} , TC, TG, LDL-C, HDL-C, HOMA- β , HDL-C were measured before and after treatment IR), adiponectin and leptin, and the adverse reactions were observed. **Results** Compared with before treatment, 2 hPG, PPG and HbA_{1c} levels of the two groups were all decreased, and the observation group was better than the control group ($t/P=-3.480/0.009$, $-7.692/0.000$, $-7.816/0.000$); after treatment, TC, TG and LDL-C levels of the observation group were significantly lower than the control group, and HDL-C levels were higher than the control group ($t/P=-2.434/0.018$, $-2.694/0.008$, $-2.237/0.004$, $3.377/0.001$). HOMA- β , HOMA-IR, adiponectin and leptin were significantly improved compared with the control group ($t/P=2.057/0.042$, $-2.023/0.045$, $2.310/0.031$, $-3.200/0.003$). **Conclusion** The Jinlida granule can effectively improve the function of islet of Langerhans in patients with type 2 diabetes mellitus, and significantly improve lipid metabolism, considering its regulation of adiponectin and leptin.

【Key words】 Jinlida granule; Type 2 diabetes; Insulin function; Serum lipid metabolism

随着生活水平提高、活动减少、生活方式的改变, 近年来 2 型糖尿病的发病率呈上升趋势, 已成为威胁

人类的重要社会问题^[1], 并且随着病程的延长, 胰岛 β 细胞功能受损和胰岛素抵抗逐渐加重, 患者对药物治

疗的敏感性逐渐下降。因此,临床上治疗糖尿病不仅依靠西药,中成药也表现出显著的优势。研究发现,津力达颗粒对胰岛 β 细胞具有保护功能,对胰岛素抵抗有改善作用^[2]。由于 2 型糖尿病是代谢性疾病,动物实验证实长期高脂饮食可诱导大鼠胰岛素抵抗模型,模拟了人类糖尿病发生的病理过程^[3],因此,临床上治疗 2 型糖尿病的同时,亦应关注脂质代谢。现观察津力达颗粒对 2 型糖尿病患者胰岛功能和脂代谢的影响,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 10 月—2019 年 1 月武警陕西总队医院门诊及住院治疗的 2 型糖尿病患者 116 例作为研究对象,均符合 2013 年“中国 2 型糖尿病防治指南”的诊断标准^[4]。利用随机数字表法分为对照组($n=56$)和观察组($n=60$)。对照组男 33 例,女 23 例;年龄 35~72(50.3 ± 4.8)岁;病程 1~10(6.1 ± 1.4)年;合并症:高脂血症 50 例,高血压 29 例,脑血管病 13 例,冠心病 18 例;家族中有糖尿病史 15 例。观察组男 35 例,女 25 例;年龄 36~75(50.1 ± 5.0)岁;病程 1~10(6.3 ± 1.3)年;合并症:高脂血症 56 例,高血压 31 例,脑血管病 12 例,冠心病 19 例;家族中有糖尿病史 16 例。2 组患者在性别、年龄、病程、合并症、家族病史等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究已通过医院伦理委员会审批,患者及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:①年龄 35~75 岁;②病程在 1~10 年者;③空腹血糖(FPG)6.1~11.1 mmol/L,餐后 2 h 血糖(2 hPG)11.1~15.0 mmol/L 者, $6.5\% \leq$ 糖化血红蛋白(HbA_{1c}) $\leq 9.0\%$;④能进行规范饮食及运动疗法者。(2)排除标准:①近 1 个月并发糖尿病酮症、酮症酸中毒、低血糖昏迷者;②心、脑、肾等功能衰竭者;③近期急性感染者,需要服糖皮质激素等影响糖、脂代谢药物者;④高敏体质者;⑤妊娠及哺乳期妇女;⑥其他原因不能配合者。

1.3 治疗方法 2 组均进行糖尿病健康教育及低血糖反应教育,给以饮食、运动及药物等常规治疗。观察组在原有治疗基础上加用津力达颗粒(石家庄以岭药业股份有限公司生产)9 g 口服,每日 3 次。连续服用 3 个月。合并高血压、冠心病者进行相应治疗。治疗期间禁用其他调脂治疗。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 血糖、血脂指标检测:于治疗前、治疗后 3 个月时,留取患者清晨空腹肘静脉血 6 ml,采用美国贝克曼 LX20 全自动生化分析仪测定血清 FPG、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平;采用美国伯乐 D-10 分析仪用高效液相色谱(HPLC)法检测糖化血红蛋白(HbA_{1c});口服 75 g 无水葡萄糖 2 h 后采集肘静脉血,留取血清 2 ml 测定 2 hPG。

1.4.2 胰岛功能检测:上述静脉血,采用德国罗氏 E601 型电化学发光全自动免疫分析仪测定空腹胰岛素(FINS)。稳态模型评估胰岛素分泌指数($HOMA-\beta$)= $20 \times$ 空腹胰岛素/(FPG-3.5),正常值为 100%;胰岛素抵抗指数($HOMA-IR$)= $FPG \times$ 空腹胰岛素/22.5,正常值为 <2.69 ^[5]。

1.4.3 血清瘦素和脂联素检测:上述血清,通过酶联免疫分析法(ELISA)测定血清瘦素和脂联素。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。正态分布计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组治疗前后血糖指标比较 治疗前,2 组 FPG、2 hPG、 HbA_{1c} 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后 2 组均下降,但对照组无统计学意义($P>0.05$),且观察组低于对照组($P<0.05$),见表 1。

2.2 2 组治疗前后血脂指标比较 治疗前,2 组 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较,差异无统计学意义($P>$

表 1 2 组患者治疗前后 FPG、2 hPG、 HbA_{1c} 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	FPG (mmol/L)	2 hPG (mmol/L)	HbA_{1c} (%)
对照组 ($n=56$)	治疗前	8.32 ± 1.81	12.12 ± 1.23	8.25 ± 1.51
	治疗后	7.52 ± 1.53	11.71 ± 1.51	8.01 ± 1.26
观察组 ($n=60$)	治疗前	8.11 ± 1.02	12.96 ± 1.63	8.08 ± 1.37
	治疗后	7.01 ± 1.67	11.09 ± 1.57	7.36 ± 1.21
t/p 对照组内值		-0.957/0.401	-1.608/0.102	-0.927/0.303
t/p 观察组内值		-2.489/0.021	-4.692/0.000	-3.038/0.003
t/p 治后组间值		-3.480/0.009	-7.692/0.000	-7.816/0.000

0.05); 治疗后, 观察组 TC、TG、LDL-C 水平下降并低于对照组 ($P < 0.05$), HDL-C 水平升高并高于对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 2 组治疗前后胰岛功能比较 治疗前, 2 组 HOMA- β 、HOMA-IR 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后, 观察组 HOMA- β 升高并高于对照组 ($P < 0.05$), HOMA-IR 下降并低于对照组 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 2 组患者治疗前后胰岛功能变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	时间	HOMA- β (%)	HOMA-IR
对照组 ($n = 56$)	治疗前	68.27 $\pm$ 10.34	8.36 $\pm$ 1.18
	治疗后	69.40 $\pm$ 9.93	8.12 $\pm$ 1.51
观察组 ($n = 60$)	治疗前	69.17 $\pm$ 10.51	8.32 $\pm$ 1.26
	治疗后	73.72 $\pm$ 12.31	7.60 $\pm$ 1.23
t/P 对照组内值		0.589/0.626	0.949/0.345
t/P 观察组内值		2.178/0.038	3.158/0.032
t/P 治后组间值		2.570/0.042	2.023/0.045

2.4 2 组治疗前后血清脂肪因子比较 治疗前, 2 组血清脂联素和瘦素比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后, 观察组血清脂联素升高并高于对照组 ($P < 0.05$), 瘦素下降并低于对照组 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 2 组患者治疗前后血清
脂肪因子的变化比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组 别	时间	脂联素	瘦素
对照组 ($n = 56$)	治疗前	15.18 $\pm$ 2.19	28.26 $\pm$ 3.18
	治疗后	15.67 $\pm$ 2.06	27.22 $\pm$ 2.61
观察组 ($n = 60$)	治疗前	15.11 $\pm$ 2.07	27.82 $\pm$ 2.92
	治疗后	16.52 $\pm$ 1.88	25.62 $\pm$ 2.73
t/P 对照组内值		1.222/0.285	0.638/0.506
t/P 观察组内值		3.906/0.000	4.264/0.000
t/P 治后组间值		2.310/0.031	3.200/0.003

2.5 2 组不良反应比较 对照组轻微恶心、头昏 1 例, 经过对症处理后症状逐渐消失, 未影响治疗及观

察。所有患者均未出现低血糖反应及肝、肾功能损害等不良反应。

3 讨 论

2 型糖尿病是临床上常见的以胰岛素分泌减少及胰岛素抵抗为特点的代谢性疾病, 主要表现为葡萄糖及脂肪代谢紊乱、空腹及餐后血糖水平增高, 起病和病情发展相对缓慢, 往往临床上无明显症状, 早期不易发现, 但严格持续地控制血糖、血脂, 可有效减少慢性并发症的发生。高脂血症是 2 型糖尿病发病的重要因素之一。普遍认为当机体能量过剩, 超过脂肪组织的储存能力后, 脂质代谢产物异位沉积于肝脏及骨骼肌等组织, 活性氧生成过多, 导致胰岛素抵抗, 因此脂肪及糖类摄入过量可造成 2 型糖尿病。同时国内外研究已经表明, 2 型糖尿病患者血清瘦素水平升高, 脂联素水平降低与胰岛素抵抗有关^[6-7]。目前临床常用的传统降糖方案往往不能达到满意的结果, 并且有较明显的不良反应, 尤其是老年人, 往往多种疾病集于一身, 需要服用多种药物, 药物之间的相互作用, 患者不能耐受, 依从性差^[8-10]。本研究结果发现, 在常规降糖基础上加用津力达颗粒后, 可明显降低患者空腹血糖、餐后 2 h 血糖及糖化血红蛋白水平, 同时脂代谢紊乱及脂肪因子脂联素、瘦素均有不同程度的改善, 分析津力达颗粒改善胰岛功能、调节脂代谢与其调控脂联素及瘦素有一定的相关性。

津力达颗粒是由 10 余种中药组成的复方制剂, 用于治疗 2 型糖尿病的中成药。津力达颗粒的药理研究表明, 既可以改善胰岛素抵抗、增加胰岛素分泌、降低血糖; 又能改善肝脏功能, 有确切的抗氧化、抗炎作用, 可明显降低血脂及尿蛋白^[11]。史婧丽等^[12]在动物实验研究中发现, 津力达颗粒对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞有保护作用, 可以明显降低 FPG、HbA_{1c}, 降低 IL-1 β 、TNF- α 、MDA 含量。国内也有临床研究发现, 津力达对糖尿病前期及妊娠期糖尿病患者胰岛素功能改善与血清 nesfatin-1 有一定关联, 并对控制糖尿病进展有密

表 2 2 组患者治疗前后血脂变化比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组 别	时间	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照组 ($n = 56$)	治疗前	5.92 $\pm$ 1.04	2.10 $\pm$ 1.02	3.57 $\pm$ 1.21	1.91 $\pm$ 0.19
	治疗后	5.44 $\pm$ 1.34	2.41 $\pm$ 1.08	3.32 $\pm$ 1.16	1.87 $\pm$ 0.38
观察组 ($n = 60$)	治疗前	6.01 $\pm$ 1.33	2.31 $\pm$ 1.11	3.63 $\pm$ 1.17	1.88 $\pm$ 0.37
	治疗后	5.02 $\pm$ 1.06	1.82 $\pm$ 1.26	2.83 $\pm$ 1.19	2.13 $\pm$ 0.46
t/P 对照组内值		1.681/0.080	1.574/0.120	1.131/0.180	0.727/0.192
t/P 观察组内值		3.607/0.000	2.258/0.030	3.738/0.000	3.247/0.002
t/P 治后组间值		1.984/0.027	2.694/0.008	2.237/0.004	3.377/0.001

切关系^[13-16]。李婷等^[17]临床研究发现,津力达颗粒可降低 2 型糖尿病患者血浆三酰甘油水平,改善胰岛素抵抗及降低尿蛋白,与徐祖传等^[18]研究结果类似。多项研究表明,津力达颗粒可显著降低糖尿病患者空腹及餐后血糖,改善胰岛素抵抗,保护胰岛 β 细胞功能,促进胰岛细胞再生,在临床疗效方面与二甲双胍相近^[19-21]。本研究结果提示,津力达颗粒能够明显改善糖尿病患者糖代谢紊乱,尤其在胰岛素抵抗方面更明显;在脂代谢方面,津力达颗粒对脂代谢调节有明确疗效,与高怀林等^[22]研究结果一致。从中医角度讲,糖尿病是由于过食肥甘厚味,损伤脾胃,脾虚湿浊,引起脾的功能异常,津力达颗粒从络病理论角度出发,通过多层次、多渠道、多靶点调节糖尿病患者的脏腑功能,改善患者体质,从而达到改善各项生化指标,减轻患者的临床症状,延缓及控制并发症的发生。

由于本试验病例数有限,研究时间较短,对于 2 型糖尿病,中药津力达颗粒在调节糖脂代谢方面的作用及可能的机制还需更进一步研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

赵晓娟、权青云:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写、论文修改;张愉:论文审核;张贵云、张克举、王建国:实施研究过程,资料搜集整理,分析试验数据,进行统计学分析

参考文献

- [1] Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: Estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 94 (3): 311-321. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2011. 10. 029.
- [2] 孙颖,魏聪,刘红利,等. 自噬与 2 型糖尿病胰岛 β 细胞增殖及凋亡[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (22): 6598-6600. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2015. 22. 138.
- [3] Liu YX, Song A, Zang SS, et al. Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 162: 244-252. DOI: 10. 1016/j. jep. 2014. 12. 040.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6 (7): 447-498. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1674-5809. 2014. 07. 004.
- [5] 孙剑,杜群,王国萍,等. 2 型糖尿病胰岛 β 细胞分泌功能与胰岛素抵抗指数的变化及其临床意义[J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23 (7): 592-594. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-6187. 2015. 07. 004.
- [6] 段力园,赵静,刘颐轩,等. 津力达对高脂饮食诱导的胰岛素抵抗大鼠血清瘦素、脂联素的影响[J]. 解放军医药杂志, 2014, 26 (12): 8-11. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-140x. 2014. 12. 003.
- [7] 郭明皓,陆颖理. 津力达颗粒联合二甲双胍治疗初发 2 型糖尿病

- 患者的疗效分析[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17 (23): 35-38. DOI: 10. 7619/jcmp. 201323010.
- [8] 陈舒婉. 糖尿病周围神经病变的中医研究进展[J]. 疑难病杂志, 2019, 18 (2): 213-216. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 02. 027.
- [9] 李红梅,刘俊伟. 2 型糖尿病患者发生氯吡格雷抵抗的危险因素分析[J]. 中国医药, 2019, 14 (2): 246-248. DOI: 10. 3760/j. issn. 1673-4777. 2019. 02. 022.
- [10] 张蕊,赵晓冉,郭宏英,等. 2 型糖尿病患者发生颈动脉斑块的影响因素分析[J]. 中国医药导报, 2019, 16 (20): 72-75.
- [11] 庞洁,高怀林,王宏涛,等. 津力达对糖尿病大鼠血糖调节激素及胰岛细胞功能干预作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20 (5): 605-607.
- [12] 史婧丽,吴莹,宋玉萍,等. 津力达颗粒对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33 (4): 385-389. DOI: 10. 3724/sp. j. 1008. 2012. 00385.
- [13] 蔡静,赵志刚,张力双,等. 津力达颗粒对糖尿病前期患者血清 nesfatin-1 与胰岛 β 细胞功能影响[J]. 疑难病杂志, 2017, 16 (7): 720-723. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2017. 07. 019.
- [14] 马吉红,张芳,郭翠梅,等. 血清 FABP4, FGF21, Nesfatin-1 与妊娠糖尿病患者胰岛素抵抗的关系[J]. 疑难病杂志, 2016, 15 (11): 1162-1165. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2016. 11. 017.
- [15] 张小路,张景义. 单核细胞趋化因子蛋白-1 与糖尿病血管病变的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2016, 15 (12): 1304-1308. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2016. 12. 027.
- [16] 徐波,冯云华,张璞,等. 津力达颗粒联合通心络胶囊治疗早期糖尿病肾病患者对微炎症状态及肾功能保护的影响[J]. 疑难病杂志, 2018, 17 (9): 936-939. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2018. 09. 017.
- [17] 李婷,柳洁. 津力达颗粒改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗和血管并发症的临床研究[J]. 世界中医药, 2015, 10 (12): 1883-1884. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7202. 2015. 12. 012.
- [18] 徐祖传,刘如善,冉玲玲. 津力达 3 号治疗糖尿病肾病临床观察[J]. 中医临床杂志, 2007, 19 (5): 435-437. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-7134. 2007. 05. 006.
- [19] 张喜芬,杨立波,孙利,等. 津力达颗粒治疗 2 型糖尿病随机双盲临床研究[J]. 疑难病杂志, 2013, 12 (5): 351-353. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2013. 05. 009.
- [20] 杨茂,贾静,王岩,等. 伊伐布雷定对糖尿病合并慢性心力衰竭患者心功能及心率变异性的影响[J]. 疑难病杂志, 2019, 18 (4): 325-328. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 04. 001.
- [21] 周立忠. 小而密低密度脂蛋白胆固醇对糖尿病患者早期肾损伤的评估价值[J]. 中国医药, 2019, 14 (7): 1007-1010. DOI: 10. 3760/j. issn. 1673-4777. 2019. 07. 013.
- [22] 高怀林,张建军,吴以岭,等. 津力达颗粒对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (5): 1119-1120. DOI: 10. 3969/j. issn. 1008-0805. 2010. 05. 042.

(收稿日期:2019-12-02)

甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达及其与 Th17/Treg 的相关性分析

周伟清, 庄一心, 沈卫星, 沈育锋, 章平

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(17ZR1701025)

作者单位: 201700 上海, 复旦大学附属中山医院青浦分院普外科

通信作者: 沈卫星, E-mail: 517592181@qq.com

【摘要】目的 分析甲状腺癌患者血清中 let-7e、miR-142 表达水平及其与辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(Treg)相关性及甲状腺癌发展的关系。**方法** 选取 2016 年 5 月—2019 年 6 月复旦大学附属中山医院青浦分院普外科收治的甲状腺癌患者 109 例为研究对象,另选取同期在医院健康体检者 109 例作为健康对照组。qRT-PCR 法检测血清中 let-7e、miR-142 表达水平,流式细胞术检测 Th17 及 Treg 水平,ELISA 法检测血清相关细胞因子水平,分析 let-7e、miR-142 表达与甲状腺癌患者临床病理特征及 Th17/Treg 相关性。**结果** 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平均显著低于健康对照组($t=9.196, 12.847, P$ 均 <0.01)。甲状腺癌患者外周血 Th17 细胞比例、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 均显著高于健康对照组($t=21.733, 13.921, 7.256, P$ 均 <0.01)。let-7e、miR-142 及 Th17/Treg 水平与甲状腺癌患者 TNM 分期和淋巴结转移有关($t=3.803, 4.860, 5.138, 6.416, 3.987, 6.341, P$ 均 <0.01)。甲状腺癌患者血清 IL-10、IL-17、IL-23、IL-6 及 TGF- β 水平显著高于健康对照组($t=42.865, 22.503, 17.622, 23.928, 24.804, P$ 均 <0.01)。甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平与外周血 Th17/Treg 水平均呈负相关($r=-0.337, -0.402, P$ 均 $=0.000$)。甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平与 IL-10、IL-17、IL-23 及 TGF- β 水平亦呈负相关(P 均 <0.01)。**结论** 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平下调,与 Th17/Treg 及其相关因子水平呈负相关,三者可能存在调控机制,共同影响甲状腺癌发生发展。

【关键词】 let-7e;微小 RNA-142;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;甲状腺癌;相关性分析

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.009

The correlation between the expression of let-7e, miR-142 and Th17/Treg in patients with thyroid cancer Zhou Weiqing, Zhuang Yixin, Shen Weixing, Shen Yufeng, Zhang Ping. Department of General Surgery, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China

Corresponding author: Shen Weixing, E-mail: 517592181@qq.com

Funding program: Scientific Research Project of Shanghai Science and Technology Commission (17ZR1701025)

【Abstract】Objective To analyze the relationship between the expression of let-7e and miR-142 in serum of patients with thyroid cancer and the correlation between helper T cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) and the progression of thyroid cancer. **Methods** From May 2016 to June 2019, 109 patients with thyroid cancer admitted to the general surgery Department of Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University were selected as the study object, and 109 healthy people in the hospital during the same period were selected as the health control group. The expression levels of let-7e and miR-142 in serum were detected by qRT-PCR, Th17 and Treg by flow cytometry, and the levels of serum related cytokines by ELISA. The expression levels of let-7e and miR-142 were analyzed in relation to the clinicopathological features and Th17/Treg in patients with thyroid cancer. **Results** The levels of serum let-7e and miR-142 in patients with thyroid cancer were significantly lower than those in healthy controls ($t=9.196, 12.847, P<0.01$). The proportion of Th17 cells, Treg cells and Th17/Treg cells in peripheral blood of patients with thyroid cancer were significantly higher than those of healthy controls ($t=21.733, 13.921, 7.256, P<0.01$). The levels of let-7e, miR-142 and Th17/Treg were correlated with TNM stage and lymph node metastasis ($t=3.803, 4.860, 5.138, 6.416, 3.987, 6.341, P<0.01$). The serum levels of IL-10, IL-17, IL-23, IL-6 and TGF- β in patients with thyroid cancer were significantly higher than those in healthy controls ($t=42.865, 22.503, 17.622, 23.928, 24.804, P<0.01$). The levels of serum let-7e and miR-142 were negatively correlated with Th17/Treg ($r=-0.337, -0.402, P=0.000$). The levels of serum let-7e and miR-142 were also negatively correlated with

the levels of IL-10, IL-17, IL-23 and TGF- β ($P < 0.01$). **Conclusion** The levels of serum let-7e and miR-142 were down regulated in patients with thyroid cancer, which was negatively correlated with Th17/Treg and its related factors. There might be a regulatory mechanism among these three factors, which could affect the occurrence and development of thyroid cancer.

【Key words】 let-7e; microRNA 142; Helper T cell 17; Regulatory T cell; Thyroid cancer; Correlation analysis

甲状腺癌是内分泌系统的常见恶性肿瘤,女性发病率远高于男性。大多数甲状腺癌患者预后良好,治疗后生存率高,但部分未分化癌预后极差。虽然关于甲状腺癌影响因素研究较多,但由于近年来人们饮食结构、生活环境恶化、遗传、肥胖等因素影响,甲状腺癌发病率逐年上升,严重影响人类生存质量^[1]。因此继续探寻甲状腺癌进展中相关因子及指标仍有重要意义。Shan 等^[2]研究发现,结直肠癌组织中 let-7e 显著低于癌旁组织,可能与结直肠癌进展有关,下调 let-7e 可促进癌细胞增殖、侵袭、体外血管生成和肿瘤生长。有研究表明,let-7e 在非小细胞肺癌中表达下调,可能与患者生存率有关^[3]。miR-142 在肝癌组织中低表达,过表达 miR-142 可明显诱导癌细胞凋亡。胡潺潺等^[4]研究报道,乳腺癌组织和细胞中 miR-142 表达下调,与癌细胞侵袭性有关,上调 miR-142 表达可抑制癌细胞侵袭和迁移^[5]。由于辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17)/调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 水平与肿瘤进展有关,且甲状腺癌中 let-7e、miR-142 表达水平及与 Th17/Treg 关系未见报道,因此本研究通过检测甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平及患者外周血 Th17/Treg 水平,分析 let-7e、miR-142 表达与 Th17/Treg 水平关系,以期对甲状腺癌患者临床治疗和预后改善提供一定理论依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2016 年 5 月—2019 年 6 月复旦大学附属中山医院青浦分院普外科收治的甲状腺癌患者 (甲状腺癌组) 109 例,其中男 41 例,女 68 例,年龄 28 ~ 65 (47.25 $\pm$ 9.87) 岁。纳入标准: (1) 经临床及病理组织切片检查确诊为甲状腺癌; (2) 患者入组前未进行任何治疗; (3) 临床资料完整。排除标准: (1) 合并患有其他部位肿瘤者; (2) 心脏、肾脏、肝脏等功能严重不全者; (3) 患有严重精神疾病者。根据美国癌症联合会 TNM 分期系统^[6]将入组患者分为: I ~ II 期 56 例, III 期 53 例; 根据病理分型分为: 乳头状癌 83 例,滤泡型癌 10 例,未分化癌 9 例,髓样癌 7 例; 根据是否有淋巴结转移分为: 无淋巴结转移 39 例,有淋巴结转移 70 例。另选取同期在医院健康体检者 109 例作为健康对照组,其中男 43 例,女 66 例; 年龄 29 ~ 63 (48.03 $\pm$ 8.96) 岁。2 组性别、年龄比较差异无统计学

意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,受试者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 (1) 主要试剂: 总 RNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); 反转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); 实时荧光定量 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (日本 Takara 公司)。主要仪器: qRT-PCR 仪 (ABI 7500, 美国 ABI 公司); 流式细胞仪 (CytoFLEX, 美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样本采集: 甲状腺癌组患者和健康对照组分别于入组后和体检时 (07:00 ~ 09:00) 空腹采集外周静脉血 5 ml, 3 ml 在 4℃、3 000 r/min 条件下离心 15 min, 用于 qRT-PCR 和 ELISA 试验, 2 ml 用于流式细胞术检测。

1.3.2 血清 let-7e、miR-142 表达水平检测: 使用 Trizol 法提取总 RNA, 反转录后得到 cDNA, 进行 qRT-PCR 试验。20 μ l 反应体系如下, 10 μ l SYBR² Taq II, 2 μ l cDNA, 0.4 μ l ROX, 0.8 μ l 上游引物, 0.8 μ l 下游引物, ddH₂O 6.0 μ l。qRT-PCR 反应步骤如下, 95℃、35 s, 1 循环; 95℃、5 s; 63℃、34 s, 38 循环。每个样本重复 3 次, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 let-7e、miR-142 表达水平, 所用引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物 5'3'	下游引物 5'3'
let-7e	GCATCGTGAATTGTGCATAC	CAGACGGTGCAAGGAGTTGT
miR-142	ACAGAGTCATAGTGAACACT	CTAATGAGGTGTATCGAGGA
U6	CTCGCAACATGGTCGCACAT	GAACGGATCAGATATTGCGT

1.3.3 流式细胞术检测 Th17 及 Treg 细胞水平: 取入组者外周血 5 ml, 加入 PBS 缓冲液混匀后滴入装有 10 ml ficoll 分离液离心管中, 离心后取中层单个核细胞, 显微镜下计数。将所得单个核细胞稀释到相应浓度后于细胞培养箱培养 4 h。收集培养后细胞, 分成 2 份, 分别加入相应单抗, 用流式细胞仪进行检测, 严格按照说明书进行操作。以 CD4⁺ IL-17⁺ 在 CD4⁺ T 细胞中百分比表示 Th17 水平, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞在 CD4⁺ T 细胞中百分比表示 Treg 细胞水平。

1.3.4 血清相关细胞因子水平检测: 采用 ELISA 法检测白介素 10 (IL-10)、白介素 17 (IL-17)、白介素 23

(IL-23)、白介素 6 (IL-6) 及转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作,试剂盒购自上海群己生物科技有限公司。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析。符合正态分布计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料用频数或率(%)表示,采用 χ^2 检验;采用 Pearson 法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清中 let-7e、miR-142 表达水平比较 甲状腺癌组患者血清中 let-7e、miR-142 表达水平均显著低于健康对照组(P 均 < 0.01),见表 2。

表 2 2 组受试者 let-7e、miR-142 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	let-7e	miR-142
健康对照组	109	1.02 ± 0.31	1.01 ± 0.29
甲状腺癌组	109	0.68 ± 0.23	0.59 ± 0.18
t 值		9.196	12.847
P 值		0.000	0.000

2.2 2 组外周血 Th17、Treg 细胞比例比较 甲状腺癌组患者外周血 Th17 细胞比例、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 均显著高于健康对照组(P 均 < 0.01),见表 3。

表 4 let-7e、miR-142 及 Th17/Treg 水平与甲状腺癌患者临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征		例数	let-7e	t/F 值	P 值	miR-142	t/F 值	P 值	Th17/Treg	t/F 值	P 值
性别	男	41	0.69 ± 0.24	0.371	0.711	0.62 ± 0.25	1.149	0.253	0.60 ± 0.19	0.725	0.470
	女	68	0.67 ± 0.22			0.57 ± 0.20			0.63 ± 0.22		
年龄(岁)	<47	57	0.71 ± 0.29	1.022	0.309	0.61 ± 0.23	0.738	0.462	0.59 ± 0.21	0.696	0.488
	≥47	52	0.66 ± 0.21			0.58 ± 0.19			0.62 ± 0.24		
肿瘤直径(cm)	<3	64	0.70 ± 0.23	0.455	0.650	0.63 ± 0.24	1.656	0.101	0.58 ± 0.21	1.552	0.124
	≥3	45	0.68 ± 0.22			0.56 ± 0.18			0.65 ± 0.26		
病理分型	乳头状癌	83	0.73 ± 0.27	0.377	0.770	0.65 ± 0.22	2.006	0.118	0.57 ± 0.19	0.902	0.443
	滤泡型癌	10	0.69 ± 0.25			0.60 ± 0.21			0.53 ± 0.17		
	未分化癌	9	0.66 ± 0.23			0.54 ± 0.16			0.64 ± 0.25		
	髓样癌	7	0.64 ± 0.22			0.55 ± 0.18			0.66 ± 0.27		
TNM 分期	I ~ II 期	56	0.81 ± 0.27	3.803	0.000	0.76 ± 0.25	5.138	0.000	0.56 ± 0.18	3.987	0.000
	III 期	53	0.63 ± 0.22			0.54 ± 0.16			0.73 ± 0.26		
淋巴结转移	无	39	0.85 ± 0.29	4.860	0.000	0.79 ± 0.28	6.416	0.000	0.49 ± 0.15	6.341	0.000
	有	70	0.61 ± 0.22			0.52 ± 0.16			0.75 ± 0.23		

表 5 2 组血清 Th17、Treg 细胞相关细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组 别	例数	IL-10	IL-17	IL-23	IL-6	TGF-β
健康对照组	109	76.34 ± 26.23	10.37 ± 3.12	95.37 ± 30.56	15.62 ± 4.87	39.67 ± 12.64
甲状腺癌组	109	403.68 ± 75.29	37.45 ± 12.17	231.49 ± 74.63	65.54 ± 21.23	198.69 ± 65.73
t 值		42.865	22.503	17.622	23.928	24.804
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 2 组受试者 Th17、Treg 细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	Th17 细胞(%)	Treg 细胞(%)	Th17/Treg
健康对照组	109	2.12 ± 0.67	4.71 ± 1.24	0.45 ± 0.13
甲状腺癌组	109	6.57 ± 2.03	10.69 ± 4.31	0.61 ± 0.19
t 值		21.733	13.921	7.256
P 值		0.000	0.000	0.000

2.3 血清 let-7e、miR-142 及外周血 Th17/Treg 与甲状腺癌患者临床病理特征的关系 let-7e、miR-142 及 Th17/Treg 水平与甲状腺癌患者性别、年龄、肿瘤直径和病理分型无关(P 均 > 0.05),与 TNM 分期和淋巴结转移有关(P 均 < 0.01),见表 4。

2.4 2 组血清 Th17、Treg 细胞相关细胞因子水平比较 甲状腺癌患者血清 IL-10、IL-17、IL-23、IL-6 及 TGF-β 水平显著高于健康对照组(P 均 < 0.01),见表 5。

2.5 甲状腺癌患者 let-7e、miR-142 表达与 Th17/Treg 水平相关性分析 甲状腺癌患者血清 let-7e 表达水平与外周血 Th17/Treg 水平呈负相关($r = -0.337, P = 0.000$),血清 miR-142 表达水平与外周血 Th17/Treg 水平呈负相关($r = -0.402, P = 0.000$),见图 1、图 2。

2.6 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达与细胞因子相关性分析 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平与 IL-6 无关($P > 0.05$),与 IL-10、IL-17、IL-23 及 TGF-β 水平均呈负相关(P 均 < 0.01),见表 6。

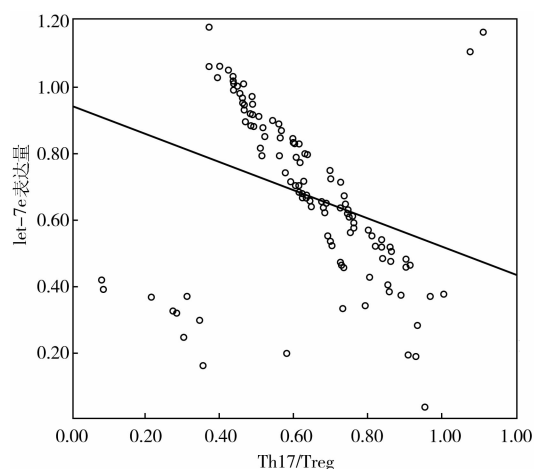


图 1 甲状腺癌患者 let-7e 与 Th17/Treg 水平相关性

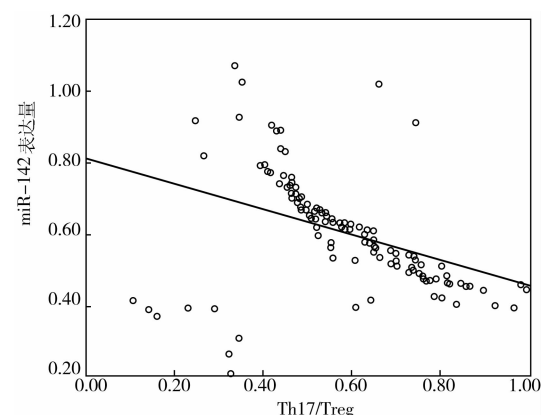


图 2 甲状腺癌患者 miR-142 与 Th17/Treg 水平相关性

表 6 甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达与细胞因子相关性分析

细胞因子	let-7e		miR-142	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-10	-0.435	0.000	-0.507	0.000
IL-17	-0.327	0.001	-0.404	0.000
IL-23	-0.392	0.000	-0.453	0.000
IL-6	-0.201	0.087	-0.213	0.076
TG-β	-0.376	0.000	-0.427	0.000

3 讨论

甲状腺癌早期表现为颈部甲状腺出现非对称性肿块、咽喉有压抑感、颈部疼痛等,但由于早期症状无典型性特征,甲状腺癌易进展至中晚期。中晚期甲状腺癌患者出现呼吸不畅、吞咽困难、颈部放射痛、淋巴结肿大、转移至其他部位引起其他器官病变,严重威胁患者生存^[7]。甲状腺癌发生发展中相关影响因子仍是甲状腺癌研究重要部分。微小 RNA (micro RNA, miR-

NA) 是一类短链非编码 RNA,能参与多种疾病调控。研究表明,miR-126-3p 在甲状腺癌组织中表达水平显著低于癌旁组织,上调其表达可抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭,促进凋亡^[8]。Bai 等^[9]研究发现,miR-150 在甲状腺癌组织中明显下调,体外过表达可诱导癌细胞周期阻滞,提示多种 miRNA 可参与调控甲状腺癌进展。

有研究报道,miRNA 家族成员 let-7e 在上皮性卵巢癌中低表达,与患者无进展生存率较差有关^[10]。本研究结果中,甲状腺癌患者血清 let-7e 表达水平显著低于健康对照组,与 Xiao 等^[10]研究结果相似,提示患者血清中 let-7e 表达水平可能与甲状腺癌发生有关。Gong 等^[11]研究发现,let-7e 在胶质母细胞瘤组织中表达低于正常脑组织,let-7e 可通过抑制细胞增殖、侵袭、迁移和促进细胞凋亡,抑制肿瘤进展。本研究结果显示,甲状腺癌患者血清 let-7e 表达水平与 TNM 分期和淋巴结转移有关,提示 let-7 水平可能与甲状腺癌发展有关。

Lu 等^[12]研究发现,胰腺癌组织和细胞系中 miR-142 表达显著下调,参与胰腺癌细胞增殖和侵袭调控。研究表明,miR-142 在食管鳞癌组织中明显低于癌旁组织,与淋巴结转移、临床分期及患者预后有关^[13]。另有研究报道,miR-142 在胃癌组织中低表达,可抑制癌细胞迁移和侵袭,与患者复发等不良预后有关^[14]。本研究结果显示,与健康对照组相比,甲状腺癌患者血清 miR-142 表达水平显著降低,与 Yan 等^[14]在胃癌中研究结果一致。进一步分析发现,miR-142 表达与甲状腺癌患者 TNM 分期和淋巴结转移有关,提示 miR-142 可能参与甲状腺癌进展。

Th17 细胞能分泌 IL-17,通过促进炎症反应参与机体免疫系统调控。有研究发现,非小细胞肺癌患者外周血 Th17 细胞比例显著高于健康对照组,与非小细胞肺癌临床分期有关^[15]。本研究结果显示,甲状腺癌患者外周血 Th17 细胞比例显著高于健康对照组,提示外周血 Th17 细胞比例升高可能与甲状腺癌发展有关。Treg 细胞能维持机体免疫耐受,通过抑制免疫反应维持免疫系统平衡。研究表明,非小细胞肺癌组织中 Treg 浸润明显高于癌旁组织,与 TNM 分期和淋巴结转移有关^[16]。本研究结果中,甲状腺癌患者外周血 Treg 细胞比例显著升高,提示外周血 Treg 细胞比例异常可能影响甲状腺癌发生发展。另外,研究报道,与健康对照组相比,非小细胞肺癌患者 Th17/Treg 比值明显升高,可能影响癌细胞分化^[17]。李清靖等^[18]发现,胃癌患者外周血 Th17/Treg 明显升高,与 TNM 分期、分化

程度、淋巴结转移有关。本研究结果显示,甲状腺癌患者外周血 Th17/Treg 比值明显高于健康对照组,且与 TNM 分期、发生淋巴结转移有关,提示甲状腺癌患者体内 Th17/Treg 平衡被打破,可能影响甲状腺癌发生发展。

Navarro 等^[19]研究表明,Th17 细胞因子 IL-17 可调控乳腺癌细胞增殖和迁移,可能与肿瘤进展及患者预后有关。Th17 可通过调控 IL-23 及 IL-6 促进结肠癌及大肠癌进展^[20-21]。刘勇等^[22]发现,Treg 细胞与 TGF- β 、IL-10 水平呈正相关,共同参与肝癌患者体内免疫调控过程。本研究结果显示,甲状腺癌患者血清中与 Th17/Treg 相关因子 IL-10、IL-17、IL-23、IL-6 及 TGF- β 水平显著升高,提示 Th17/Treg 比例失衡可能导致相关因子水平异常,影响甲状腺癌发生发展。进一步研究发现,甲状腺癌患者血清 let-7e、miR-142 表达水平与外周血 Th17/Treg 水平及其相关因子 IL-10、IL-17、IL-23、TGF- β 水平呈负相关,提示 let-7e、miR-142 可能通过调控 Th17/Treg 比值影响相关细胞因子水平,在甲状腺癌进展中发挥作用。

综上所述,与健康对照组相比,甲状腺癌患者血清 let-7e 与 miR-142 表达水平下调,Th17/Treg 水平上调,与患者 TNM 分期及淋巴结转移有关,且血清 let-7e、miR-142 表达水平与 Th17/Treg 及其相关因子水平均呈负相关,提示 let-7e、miR-142 与 Th17/Treg 之间可能存在调控机制,共同参与甲状腺癌发生发展。但由于本研究样本量较少、研究方法较为单一,具体作用机制尚需进一步深入研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

周伟清:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;庄一心:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;沈卫星:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;沈育锋:进行统计学分析;章平:课题设计,论文撰写

参考文献

- [1] 雷林,尚庆刚,刘维耿,等. 深圳市 2001—2015 年甲状腺癌发病现状和趋势分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(7): 504-508. DOI:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.07.A005.
- [2] Shan Y, Liu Y, Zhao L, et al. MicroRNA-33a and let-7e inhibit human colorectal cancer progression by targeting ST8SIA1[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 90: 48-58. DOI:10.1016/j.biocel.2017.07.016.
- [3] Kutiyawalla A, Ghoshal Gupta S, Lee BR, et al. Abstract 5906: TIMP-1 expression is inversely correlated with miRNA125a-5p and let-7e in non-small-cell lung carcinoma[J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 5906. DOI:10.1158/1538-7445.AM2017-5906.
- [4] 胡潺潺,李青山,刘兰芳,等. MiR-142 在乳腺癌组织和细胞中

的表达变化及其对 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移能力的影响[J]. 山东医药, 2018, 58(42): 5-8. DOI:10.36969/j.issn.1002-266X.2018.42.002.

- [5] 胡焯,许小青,王冰晶,等. MiR-142-5p 通过靶向 IGF2BP3 调控多柔比星诱导的肝癌细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 581-587. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.002.
- [6] 孙威,贺亮,张浩. 美国癌症联合委员会甲状腺癌分期系统(第 8 版)更新解读[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(3): 255-258. DOI:10.7504/CJPS. ISSN1005-2208.2016.05.05.
- [7] 田文,鄒洪庆. 甲状腺癌病人生存现状分析[J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(5): 489-493. DOI:10.7504/CJPS. ISSN1005-2208.2016.05.05.
- [8] 蔡洲,黄致远,张建新. miR-126-3p 在甲状腺癌中的表达及其功能研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 584-587,592. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2017.04.022.
- [9] Bai D, Sun H, Wang X, et al. MiR-150 inhibits cell growth in vitro and in vivo by restraining the RAB11A/WNT/ β -catenin pathway in thyroid cancer[J]. Med Sci Monit, 2017, 23(1): 4885-4894. DOI:10.12659/MSM.906997.
- [10] Xiao M, Cai J, Cai L, et al. Let-7e sensitizes epithelial ovarian cancer to cisplatin through repressing DNA double strand break repair[J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1):24. DOI:10.1186/s13048-017-0321-8.
- [11] Gong W, Zheng J, Liu X, et al. Knockdown of NEAT1 restrained the malignant progression of glioma stem cells by activating microRNA let-7e[J]. Oncotarget, 2016, 7(38): 62208-62223. DOI:10.18632/oncotarget.11403.
- [12] Lu Y, Ji N, Wei W, et al. MiR-142 modulates human pancreatic cancer proliferation and invasion by targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) in the tumor microenvironments[J]. Biol Open, 2017, 6(2): 252-259. DOI:10.1242/bio.021774.
- [13] 徐健,江跃全,蔡华荣,等. 食管鳞状细胞癌患者 miR-142-5p 的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(21): 1936-1941. DOI:10.16016/j.1000-5404.201805133.
- [14] Yan J, Yang B, Lin S, et al. Downregulation of miR-142-5p promotes tumor metastasis through directly regulating CYR61 expression in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2019, 22(2): 302-313. DOI:10.1007/s10120-018-0872-4.
- [15] Mark NM, Kargl J, Busch SE, et al. Chronic obstructive pulmonary disease alters immune cell composition and immune checkpoint inhibitor efficacy in non-small cell lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 197(3): 325-336. DOI:10.21037/atm.2019.02.27.
- [16] 陈丽萍,李琛. 非小细胞肺癌组织中程序性死亡受体配体表达与调节性 T 细胞浸润的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(4): 903-905. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.04.053.
- [17] Peng J, Yu Z, Xue L, et al. The effect of foxp3-overexpressing Treg cells on non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4):5860-5868. DOI:10.3892/mmr.2018.8606.

(下转 380 页)

白血病患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达分析

韩松, 侯志新, 刘承祥, 张雷, 郑伟

基金项目: 吉林省卫生厅科技计划项目(2013ZC023)

作者单位: 130062 长春, 中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院病理科

通信作者: 郑伟, E-mail: zw0113@sina.com

【摘要】目的 分析白血病患者 DNA 结合抑制因子 4(ID4)、人类 Mut L 同源物 1(hMLH1)、尾型同源盒转录因子-2(CDX2)基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达。**方法** 选取 2015 年 1 月—2019 年 3 月中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院确诊的白血病患者 90 例作为研究组,按照白血病类型分为急性髓系白血病(AML)38 例、慢性粒细胞白血病(CML)24 例、急性淋巴细胞白血病(ALL)28 例,并选取同期健康志愿者 30 例作为健康对照组。比较各组 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达情况。**结果** AML、CML、ALL 患者 ID4 基因甲基化发生率分别为 73.68%、75.00%、85.71%,明显高于健康对照组的 3.33% ($\chi^2 = 52.683, P < 0.001$),AML、CML、ALL 患者 hMLH1 基因甲基化发生率分别为 57.89%、58.33%、60.71%,明显高于健康对照组的 6.67%,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 24.772, P < 0.001$);AML、CML、ALL 患者 CDX2 基因甲基化发生率均为 100.00%,与健康对照组的 96.67% 比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。AML、CML、ALL 患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因 mRNA 表达均明显低于健康对照组,差异均有统计学意义 ($F = 349.916, 339.255, 114.064, P < 0.001$)。**结论** 白血病患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化与白血病的发病机制密切相关,ID4、hMLH1 基因的 mRNA 表达受到甲基化的影响,CDX2 基因的 mRNA 表达与甲基化无关。

【关键词】 白血病;DNA 结合抑制因子 4;人类 Mut L 同源物 1;尾型同源盒转录因子-2;基因甲基化;mRNA 表达

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.010

Abnormal methylation and mRNA expression of promoter regions of ID4, hMLH1 and CDX2 genes in leukemia patients Han Song, Hou Zhixin, Liu Chengxiang, Zhang Lei, Zheng Wei. Department of Pathology, The 964th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Jilin Province, Changchun 130062, China

Corresponding author: Zheng Wei, E-mail: zw0113@sina.com

Funding program: Jilin Provincial Department of Health Science and Technology program (2013ZC023)

【Abstract】Objective To analyze the abnormal methylation and mRNA expression of DNA binding inhibitor 4 (ID4), human MutL homologue 1 (hMLH1) and CDX2 gene promoter in leukemia patients. **Methods** From January 2015 to March 2019, 90 patients with leukemia confirmed by the Pathology Department of the 964 Hospital of the Joint Service Support Force of the Chinese People's Liberation Army were selected as the study group. According to the type of leukemia, they were divided into 38 cases of acute myeloid leukemia (AML), 24 cases of chronic myeloid leukemia (CML), 28 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL), and 30 healthy volunteers at the same period were selected as the healthy controls group. The abnormal methylation and mRNA expression in the promoter regions of ID4, hMLH1 and CDX2 genes were compared. **Results** The incidence of ID4 gene methylation in AML, CML and ALL patients was 73.68%, 75.00% and 85.71% respectively, which was significantly higher than that in the control group ($\chi^2 = 52.683, P < 0.001$). The incidence of hMLH1 gene methylation in AML, CML and ALL patients was 57.89%, 58.33% and 60.71% respectively, which was significantly higher than that in the control group (6.67%) ($\chi^2 = 24.772, P < 0.001$). The incidence of CDX2 gene methylation in AML, CML and ALL patients was 100.00%, compared with 96.67% in the control group, there was no significant difference ($P > 0.05$). The expression of ID4, hMLH1 and CDX2 mRNA in AML, CML and ALL patients was significantly lower than that in the healthy control group ($F = 349.916, 339.255, 114.064, P < 0.001$). **Conclusion** The abnormal methylation of the promoter regions of ID4, hMLH1 and CDX2 genes is closely related to the pathogenesis of leukemia. The mRNA expression

of ID4 and hMLH1 genes is affected by methylation, while the mRNA expression of CDX2 gene is not related to methylation.

【Key words】 Leukemia; DNA binding inhibitor 4; Human Mut L homolog 1; Tail homeobox transcription factor 2; Gene methylation; mRNA expression

DNA 甲基化是指在不改变 DNA 序列的前提下, 改变遗传表现的一种 DNA 化学修饰形式。DNA 结合抑制因子 4(DNA binding inhibitor 4, ID4) 是一种新的抑癌因子, 可调节细胞分化, 在细胞繁殖前后和细胞周期发展中起作用。有研究表明, 骨髓增生异常综合征患者 ID4 基因甲基化与恶性肿瘤复发及转移有关^[1]。人类 Mut L 同源物 1(human Mut L homolog 1, hMLH1) 是 DNA 错配修复系统(mismatch repair system, MMR) 中的重要基因, hMLH1 基因启动子区异常甲基化可导致 MMR 失活, 且 hMLH1 基因 mRNA 的表达及功能缺失与多种肿瘤的发生发展有关。尾型同源盒转录因子 2(caudal-type homeobox transcription factor 2, CDX2) 是一种转录因子, CDX2 基因 mRNA 表达的失调与肿瘤的发生发展密切相关, 在膀胱癌中 CDX2 基因 mRNA 呈高表达^[2-3]。为研究 ID4、hMLH1、CDX2 表达是否受到基因启动子区甲基化影响, 本研究分析白血病患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达情况, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2015 年 1 月—2019 年 3 月中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院确诊的白血病患者 90 例作为研究组, 按照白血病类型分为急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML) 38 例, 慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML) 24 例, 急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 28 例; AML 男 27 例, 女 11 例; 年龄 16 ~ 52 (35.17 ± 11.25) 岁。CML 男 16 例, 女 8 例; 年龄 17 ~ 48 (33.35 ± 11.27) 岁。ALL 男 20 例, 女 8 例; 年龄 20 ~ 50 (34.73 ± 10.83) 岁。选取同期健康志愿者 30 例作为健康对照组, 男 20 例, 女 10 例; 年龄 22 ~ 49 (34.39 ± 9.54) 岁。2 组性别、年龄比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准, 受试者及家属知情同意并签署同意书。

1.2 选择标准 (1) 纳入标准: ①经临床确诊为白血病, 且均符合法、美、英分型系统(French-American-British classification systems)^[4] 的诊断和分型标准; ②年龄 16 ~ 52 岁。(2) 排除标准: ①严重肝、肾功能不全者; ②其他严重恶性肿瘤影响本研究者。

1.3 试验方法 收集受试者抗凝骨髓液 2 ~ 5 ml, 采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 保存于 -80℃ 进

行基因组提取。

1.3.1 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区甲基化检测: 取 1×10^6 个单个核细胞提取总 RNA, 采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MS-PCR) 检测, DNA/RNA 抽提试剂盒、PCR 引物购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。(1) ID4 反应条件, 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 30 s, 此为 1 个循环, 共进行 30 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 7 min 的延展。ID4 甲基化特异性上游引物为 5'-TTTATAAATATAGTTGCGCGGC-3', 下游引物为 5'-GAATATCCTAATCACTC-CCTTCGA-3'。(2) hMLH1 反应条件, 94℃ 4 min, 94℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 此为 1 个循环, 共进行 40 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 7 min 的延展。hMLH1 甲基化特异性上游引物为 5'-ACGTAGACGTTTATTAGGGTCGC-3', 下游引物为 5'-CCTCATCGTAACCTACCCGCG-3'。(3) CDX2 反应条件, 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 45 s, 此为 1 个循环, 共进行 30 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 7 min 的延展。CDX2 甲基化特异性上游引物为 5'-CGAAAATAAAAATCACTACGACG-3', 下游引物为 5'-ATTCAAAAATAAAAATCACTACAACA-3'。

1.3.2 ID4、hMLH1、CDX2 基因 mRNA 表达水平检测: 采用逆转录—聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测, 人 CML 细胞株 K562、AML 细胞株 HL-60 购自上海继和生物科技有限公司, RT 逆转录试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。① ID4 反应条件, 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 此为 1 个循环, 共进行 40 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 7 min 的延展。ID4 上游引物为 5'-TCACTGCGCTCAACACCGACCC-3', 下游引物为 5'-TTCCCCCTCCCTCTCTAGTGCTCCTG-3'。② hMLH1 反应条件, 94℃ 4 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 此为 1 个循环, 共进行 30 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 7 min 的延展。hMLH1 上游引物为 5'-CGGT-TACTACCCAATGCCTCAACG-3', 下游引物为 5'-TTCTC-GACTAACAGCATTTCCAA-3'。③ CDX2 反应条件, 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 49℃ 30 s, 72℃ 45 s, 此为 1 个循环, 共进行 30 个循环, 再在 72℃ 条件下进行 8 min 的延展。CDX2 上游引物为 5'-AAAGGATATTG-GAGAGTATTTTAG-3', 下游引物为 5'-CATAGTCCTG-

GATTTCGTCA-3'。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同白血病类型比较采用单因素 F 检验,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化比较 AML、CML、ALL 患者的 ID4、hMLH1 基因甲基化发生率均高于健康对照组($P<0.01$),而 CDX2 基因甲基化与健康对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 2 组受试者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化比较 [例(%)]				
组别	例数	ID4	hMLH1	CDX2
健康对照组	30	1(3.33)	2(6.67)	29(96.67)
研究组	AML 38	28(73.68)	22(57.89)	38(100.00)
	CML 24	18(75.00)	14(58.33)	24(100.00)
	ALL 28	24(85.71)	17(60.71)	28(100.00)
χ^2 值		52.683	24.772	3.025
P 值		<0.001	<0.001	0.082

2.2 2 组 ID4、hMLH1、CDX2 基因 mRNA 表达比较与健康对照组比较,AML、CML、ALL 患者的 ID4、hMLH1 基因 mRNA 表达较低,而 CDX2 基因 mRNA 表达较高,差异均有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 2 2 组受试者 ID4、hMLH1、CDX2 基因 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)				
组别	例数	ID4 mRNA ($\times 10^{-4}$)	hMLH1 mRNA ($\times 10^{-2}$)	CDX2 mRNA ($\times 10^{-4}$)
健康对照组	30	89.69 $\pm$ 24.80	59.52 $\pm$ 11.36	0.32 $\pm$ 0.07
研究组	AML 38	5.04 $\pm$ 1.55	20.58 $\pm$ 1.85	1.59 $\pm$ 0.42
	CML 24	4.28 $\pm$ 1.31	19.79 $\pm$ 1.45	1.66 $\pm$ 0.43
	ALL 28	4.25 $\pm$ 1.25	19.73 $\pm$ 1.59	1.55 $\pm$ 0.24
F 值		349.916	339.255	114.064
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病,其发生与表观遗传和细胞遗传的改变有关。文献研究表明,肿瘤的发生发展与表观遗传中的 CpG 岛甲基化异常有关^[5-7]。DNA 甲基化是 DNA 的天然修饰方式,其过程为 DNA 甲基转移酶催化甲基供体,使胞嘧啶转变为 5 甲基胞嘧啶,可参与基因的调控、表达及细胞的增

生、调节和分化。吴明彩等^[8]研究表明,染色质域解旋酶 DNA 结合蛋白 5(chromodomain helicase DNA binding protein 5,CHD5)基因异常甲基化影响其表达,可促进 AML 的发生。本研究采用 MS-PCR、RT-PCR 对 AML、CML、ALL 患者及健康志愿者的 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达进行分析,旨在研究白血病的分子发病机制,为白血病的防治提供辅助参考。

ID4 基因位于染色体 6p22.3-p23 区域,是白血病的抑癌基因。ID4 基因由于缺乏富含碱性氨基酸的 DNA 结合域,因此其 Id 蛋白不能够与 DNA 结合,但可与碱性 HLH 蛋白(basic helix-loop-helix, bHLH)结合,从而抑制 bHLH 与 DNA 结合,调控相关基因转录^[9-10]。有研究表明,ID4 基因与肿瘤侵袭、肿瘤血管形成有关,在白血病中呈高度甲基化^[11]。本研究结果显示,AML、CML、ALL 患者的 ID4 基因甲基化异常升高;AML、CML、ALL 患者的 ID4 基因 mRNA 表达异常降低。结果证明 ID4 基因的异常甲基化在白血病的发生中起着重要作用,可影响 ID4 基因 mRNA 表达,并作为疾病诊断和预后评估的辅助方法。刘菲等^[12]研究表明,在 AML 患者中 ID4 基因呈高频甲基化,发生率约为 80%,在健康人体中未发现 ID4 基因异常甲基化。崔桂荣等^[13]研究表明,AML、CML、ALL 患者 ID4 基因异常甲基化分别为 73.5%、76.2%、84.0%,健康对照组为 3.3%,且 AML、CML、ALL 患者的 ID4 基因 mRNA 表达均明显低于健康对照组,与本研究结果相吻合。

hMLH1 基因位于染色体 3p21-23 区域,是 MMR 系统的关键基因,是最早发现的错配修复基因之一,可识别碱基错配部分,启动错配修复途径,其启动子区异常甲基化可影响基因的表达及功能。多数研究证实,在血液系统肿瘤、实体性肿瘤中会发生 hMLH1 甲基化^[14]。本研究结果显示,AML、CML、ALL 患者 hMLH1 基因甲基化异常明显升高,hMLH1 基因 mRNA 表达明显下降。结果证明 hMLH1 基因的异常甲基化在白血病的发生中起着重要作用,可影响 hMLH1 基因 mRNA 表达,并作为疾病诊断和预后评估的辅助方法。张启弘等^[15]研究表明,甲状腺乳头状癌(PTC)患者的 hMLH1 基因 mRNA 呈高表达,hMLH1 基因的 mRNA 表达与疾病的发生发展有关。邹菁等^[16]研究表明,AML 患者的 hMLH1 基因 mRNA 表达受到基因启动子区甲基化的影响,且 hMLH1 基因甲基化与白血病的发生发展有关,与本研究结果相似。

CDX2 基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成,可

以编码核转录因子,在正常组织中具有促进细胞的作用,是控制造血系统早期发育的主要基因^[17-18]。本研究结果显示,AML、CML、ALL 患者的 CDX2 基因甲基化均无明显变化;AML、CML、ALL 患者的 CDX2 基因 mRNA 表达明显升高。结果证明白血病患者 CDX2 基因的异常甲基化没有下调,可能是其他途径上调了 CDX2 基因 mRNA 表达。申淑珍等^[19]研究表明,CDX2 基因 mRNA 表达可反映患者的白血病细胞负荷,是评估预后的重要指标。王巍等^[20]研究表明,AML、ALL 与健康对照组的 CDX2 基因异常甲基化均为 100%,无明显差异,且 CDX2 基因异常甲基化与 CDX2 基因的 mRNA 表达无明显相关性,与本研究结果相吻合。

综上所述,白血病患者 ID4、hMLH1、CDX2 基因启动子区异常甲基化与白血病的发病机制密切相关, ID4、hMLH1 基因的 mRNA 表达受到甲基化的影响, CDX2 基因的 mRNA 表达与甲基化无关。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

韩松:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;侯志新:提出研究思路,分析试验数据;刘承祥:实施研究过程,资料搜集整理;张雷:进行统计学分析;郑伟:课题设计,论文修改,论文审核

参考文献

- [1] 邵秀茹,卢润章,关晓军,等. 三氧化二砷对骨髓增生异常综合征患者骨髓细胞及 Id4 基因甲基化表达的影响及其与疗效的关系研究[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(3):247-250. DOI:10.3760/cma.j. issn. 0253-2727. 2014. 03. 017.
- [2] 张启弘,黄煜庆,兰霞斌,等. miR-155-5p 通过调控 hMLH1 促进甲状腺乳头状癌增殖侵袭的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(6):492-497. DOI:10.11735/j. issn. 1671-170X. 2019. 06. B002.
- [3] 林晨,刘湘鄂,吴天玉,等. 尾型同源盒转录因子 2 和同源框蛋白 A9 在膀胱癌组织中的表达及临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(8):972-976. DOI:10.3969 / j. issn. 1000-7377. 2019. 08. 003.
- [4] 张力,高秀蓉,颜慕霞,等. 急性巨核细胞白血病伴 MLL - AF4 融合基因 1 例[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(15):1188-1190. DOI:10.3760/cma.j. issn. 2095-428X. 2018. 15. 019.
- [5] 付洁,宿颖,刘瑶,等. 人口腔鳞状细胞癌和口腔白斑的基因甲基化谱分析[J]. 中华口腔医学杂志, 2018, 53(4):248-253. DOI:10.3760/cma.j. issn. 1002-0098. 2018. 04. 007.
- [6] Saadeh H, Schulz R. Protection of CpG islands against de novo DNA methylation during oogenesis is associated with the recognition site of E2f1 and E2f2[J]. Epigenetics & Chromatin, 2014, 7(1):26. DOI:10.1186/1756-8935-7-26.
- [7] Jeziorska DM, Murray RJS, De Gobbi M, et al. DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity dur-

- ing differentiation and disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(36):E7526-E7535. DOI:10.1073/pnas.1703087114.
- [8] 吴明彩,蒋明,董婷,等. CHD5 基因启动子甲基化调控 p19 ~ (Arf)/p53/p21 ~ (Cip1) 信号通路促进急性髓系白血病发病的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(4):1001-1007. DOI:10.19746/j. cnki. issn1009-2137. 2019. 04. 002.
- [9] Haworth J, Grant R, Thayer S, et al. Abstract 3978: B7-H1/PD-L1 soluble expression in multiple cancer subtypes: High sensitivity measurement by immunoassay[J]. Cancer Research, 2017, 77(13 Supplement):3978-3978. DOI:10.1158/1538-7445. AM2017-3978.
- [10] 齐康,初向阳. Id4 基因与机体发育及肿瘤相关性的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(7):176-178. DOI:10.11969/j. issn. 1673-548X. 2016. 07. 048.
- [11] 刘洋,钟文雯,康慧媛,等. ID4 基因甲基化定量 PCR 检测在急性白血病中的临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3):675-680. DOI:10.7534/j. issn. 1009-2137. 2014. 03. 019.
- [12] 刘菲,徐瑞荣. 急性髓系白血病中医证型与 ID4 基因启动子区甲基化相关性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4):471-473. DOI:10.7661/CJIM. 2012. 4. 471.
- [13] 崔桂荣,李焱,贾振薇,等. 白血病患者 ID4、WT1、GLIPRI 基因启动子区异常甲基化及 mRNA 表达的研究[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(3):41-43. DOI:10.3969/j. issn. 1007-4287. 2019. 03. 013.
- [14] Tam BE, Hao Y, Sikes HD. An examination of critical parameters in hybridization-based epigenotyping using magnetic microparticles[J]. Biotechnology Progress, 2018, 34(6):1589-1595. DOI:10.1002/btpr. 2644.
- [15] 张启弘,黄煜庆,兰霞斌,等. miR-155-5p 通过调控 hMLH1 促进甲状腺乳头状癌增殖侵袭的研究[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(6):492-497. DOI:10.11735/j. issn. 1671-170X. 2019. 06. B002.
- [16] 邹菁,陈智超,邹萍. 急性髓性白血病中 hMLH1 基因启动子区甲基化与表达水平检测及意义[J]. 实用医院临床杂志, 2011, 8(4):11-13. DOI:10.3969/j. issn. 1672-6170. 2011. 04. 004.
- [17] 潘欢,陈晓燕,张婷,等. T 淋巴瘤细胞淋巴瘤/白血病患者 PDL1 蛋白/mRNA 表达及其与临床病理参数和预后的关系[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(12):1245-1248. DOI:10.3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 12. 013.
- [18] 刘艳,马秋玲. 长链非编码 RNA LINC01140 在急性髓细胞白血病患者骨髓单个核细胞中的表达及其临床意义[J]. 中国医药, 2019, 14(12):1834-1837. DOI:10.3760/j. issn. 1673-4777. 2019. 12. 018.
- [19] 申淑珍,白晓川,刘娟. CDX2 基因在成人急性淋巴细胞白血病中的表达及临床意义[J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(1):39-42. DOI:10.16050/j. cnki. issn1674-6309. 2016. 01. 010.
- [20] 王巍,刘文鑫,黄永彬,等. 急性白血病 CDX2 基因启动子甲基化状态与其 mRNA 表达关系[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(9):7-10. DOI:10.3969/j. issn. 1672-3619. 2018. 09. 001.

(收稿日期:2019-11-14)

瑞芬太尼调控 miR-148a 对骨肉瘤细胞生物行为的影响

孟杨,王绍伟,王宪峰,徐海伟

作者单位: 277100 山东省枣庄矿业集团枣庄医院骨科(孟杨、王绍伟、徐海伟),骨二科(王宪峰)

通信作者: 王宪峰, E-mail: wtswn19@163.com

【摘要】目的 探讨瑞芬太尼对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。**方法** 2017 年 8 月—2018 年 12 月于山东省枣庄矿业集团枣庄医院进行实验。收集经病理确诊的骨肉瘤患者 36 例,取其骨肉瘤组织及癌旁组织,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测其 miR-148a 的表达。以骨肉瘤 MG63 细胞为研究对象,设立对照组及瑞芬太尼 0.1、1、10、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组,分别处理 MG63 细胞,采用 MTT 细胞增殖实验测定瑞芬太尼抑制 MG63 细胞增殖的效果;流式细胞术检测瑞芬太尼对 MG63 细胞凋亡率的影响;qRT-PCR 检测瑞芬太尼对 MG63 细胞中 miR-148a 表达的影响。将 MG63 细胞随机分为瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组与瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组,观测抑制 miR-148a 表达验证瑞芬太尼对 MG63 细胞增殖及凋亡的作用机制。Western-blot 检测 Cyclin D1、P21 Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果** 与癌旁组织比较,骨肉瘤组织中 miR-148a 的表达水平显著降低($t/P = 20.402 / < 0.001$);24 h、48 h、72 h 时瑞芬太尼各组可抑制骨肉瘤细胞增殖($F = 182.419, 189.181, 165.061, P$ 均 < 0.001),促进细胞凋亡($F/P = 110.203 / < 0.001$),随瑞芬太尼浓度升高 P21 表达水平升高($F/P = 355.973 / < 0.001$),Cyclin D1 表达水平降低($F/P = 273.731 / < 0.001$),并可明显促进 Bax 表达($F/P = 156.941 / < 0.001$),抑制 Bcl-2 表达($F/P = 288.568 / < 0.001$);与瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组比较,瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组 MG63 细胞增殖活力显著升高,细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$)。**结论** 瑞芬太尼可能通过上调 miR-148a 表达诱导骨肉瘤细胞凋亡,同时具有抑制骨肉瘤细胞增殖的作用。

【关键词】 瑞芬太尼;骨肉瘤;miR-148a;凋亡;增殖

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2020.04.011

Effect of remifentanyl on the biological behavior of osteosarcoma cells by regulating miR-148a Meng Yang*, Wang Shaowei, Wang Xianfeng, Xu Haiwei. * Department of Orthopaedics, Zaozhuang Hospital, Zaozhuang Mining Group, Shandong Province, Zaozhuang 277100, China

Corresponding author: Wang Xianfeng, E-mail: wtswn19@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of remifentanyl on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** The experiment was conducted in Zaozhuang Hospital of Shandong Zaozhuang Mining Group from August 2017 to December 2018. The expression of Mir-148A was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The control group and remifentanyl 0.1, 1, 10, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ group were established. MG63 cells were treated with remifentanyl respectively, and the inhibitory effect of remifentanyl on MG63 cell proliferation was measured by MTT cell proliferation experiment. The effect of remifentanyl on the apoptosis rate of MG63 cells was detected by flow cytometry, and the expression of miR-148a in MG63 cells was detected by qRT-PCR. MG63 cells were randomly divided into remifentanyl 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC sub group and remifentanyl 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a sub group. The inhibition of miR-148a expression was observed to verify the mechanism of remifentanyl on the proliferation and apoptosis of MG63 cells. Western blot was used to detect the expression of cyclin D1, P21 Bax and Bcl-2. **Results** The expression level of miR-148a in osteosarcoma was significantly lower than that in paracancerous tissues ($t/P = 20.402 / < 0.001$). At 24 h, 48 h and 72 h, remifentanyl could inhibit the proliferation of osteosarcoma cells ($F = 182.419, 189.181, 165.061, P < 0.001$), promote apoptosis ($F/P = 110.203 / < 0.001$), and increase p21 expression level ($F/P = 355.973 / < 0.001$), cyclin The expression level of D1 decreased ($F/P = 273.731 / < 0.001$), and it could promote the expression of Bax ($F/P = 156.941 / < 0.001$), and inhibit the expression of Bcl 2 ($F/P = 288.568 / < 0.001$). Compared with remifentanyl 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC subgroup, the proliferation activity and apoptosis rate of MG63 cells in remifentanyl 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148A subgroup increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Remifentanyl may induce apoptosis of osteosarcoma cells by up

regulating the expression of miR-148a and inhibit the proliferation of osteosarcoma cells.

【Key words】 Remifentanyl; Osteosarcoma; miR-148a; Apoptosis; Proliferation

骨肉瘤是临床常见恶性肿瘤之一,常发病于青少年时期,其病死率较高,目前临床主要采用外科手术与化疗等方式治疗骨肉瘤,但治疗效果不佳^[1]。由于骨肉瘤具有高度特异性导致其极易产生耐药性从而影响治疗效果^[2-3]。因而寻找新型安全有效的药物是临床治疗骨肉瘤亟待解决的关键问题。研究表明瑞芬太尼可抑制肝癌、肺癌等多种肿瘤细胞增殖,并可降低细胞迁移侵袭能力^[4-5]。但瑞芬太尼对骨肉瘤细胞生物行为的影响及其机制尚未见报道。研究表明微小 RNA-148a (microRNA-148a, miR-148a) 在骨肉瘤患者中表达下调,其可作为骨肉瘤早期诊断及评估患者预后的生物标志物^[6]。过表达 miR-148a 可抑制骨肉瘤细胞增殖,抑制 miR-148a 表达可促进骨肉瘤细胞增殖^[7]。因此,本研究主要探讨瑞芬太尼对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响,初步分析其对 miR-148a 表达的调控作用,为临床合理应用瑞芬太尼治疗骨肉瘤提供理论依据,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 骨肉瘤细胞 MG63: 购自中国科学院上海细胞库, DMEM 培养基购自美国 Thermo Fisher 公司; 胎牛血清与胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; (2) 试剂与试剂: 瑞芬太尼购自湖北宜昌人福药业有限责任公司。miR-148a 抑制剂 (anti-miR-148a)、anti-miR-NC 购自广州锐博生物科技有限公司; Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; MTT 细胞增殖检测试剂盒购自黄石研科生物科技有限公司; Annexin V-FITC / PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司; Total RNA Kit 试剂盒购自美国 Omega Biotech 公司; M-MLV 第一链试剂盒购自美国 Life Technologies 公司; SYBR Green qPCR Super Mix-UDG 试剂盒购自美国 Life Technologies 公司; RIPA 裂解液购自美国 Cell Signaling Technology 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司; 兔抗人细胞周期蛋白 1 (CyclinD1)、P21 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 骨肉瘤标本 收集 2017 年 3 月—2018 年 5 月山东省枣庄矿业集团枣庄医院骨科收治骨肉瘤患者 36

例为研究对象,均接受手术治疗,切除骨肉瘤组织经病理证实为骨肉瘤、癌旁组织,二者放入液氮中,术后转移至 -80 ℃ 超低温冰箱内保存。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者知情同意且签署同意书。

1.3 实验方法 2017 年 8 月—2018 年 12 月于山东省枣庄矿业集团枣庄医院实验室进行实验。(1) 瑞芬太尼 1 mg 溶解于 0.9% 氯化钠注射液 1 ml 中,过滤,用 DMEM 培养基将原液分为不同浓度的干预液 (0.1、1、10、100、200 μmol/L)。培养 MG63 细胞,培养条件为 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱,培养液为 DMEM 培养基 (含有 10% 胎牛血清与青霉素—链霉素混合溶液),待细胞融合度为 90% 时进行传代培养,选取对数生长期细胞进行实验研究,用终浓度为 0.1、1、10、100、200 μmol/L 的瑞芬太尼处理 MG63 细胞,分别为瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组、1 μmol/L 组、10 μmol/L 组、100 μmol/L 组、200 μmol/L 组,未经任何处理的细胞作为对照组,应用 MTT 法检测细胞增殖抑制情况。(2) 选用抑制率约为 50% 瑞芬太尼浓度用于后续研究,将 MG63 细胞随机分为瑞芬太尼 10 μmol/L + anti-miR-NC 亚组 (anti-miR-NC 转染入 MG63 细胞,用终浓度为 10 μmol/L 的瑞芬太尼处理 MG63 细胞)、瑞芬太尼 10 μmol/L + anti-miR-148a 亚组 (anti-miR-148a 转染入 MG63 细胞,用终浓度为 10 μmol/L 的瑞芬太尼处理 MG63 细胞),各亚组处理时间均为 48 h,收取对数生长期细胞进行后续研究。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 MTT 检测细胞增殖: 取对数生长期 MG63 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用 DMEM 培养液 (含有 10% 胎牛血清) 制备单细胞悬液接种于 96 孔板 (3 × 10⁴ 个细胞/孔),培养 24 h 后,按不同分组分别于 24 h、48 h、72 h 时每孔加入 MTT 溶液 20 μl (5 mg/ml),室温孵育 4 h,弃上清,加入 DMSO (150 μl/孔),匀速振荡 10 min,应用酶标仪检测各孔吸光度值 (OD 490 nm)。实验重复 3 次,取平均值。

1.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡: 取各组 MG63 细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,每次 10 min,细胞沉淀转移至流式检测管,加入 1 × binding buffer 重悬细胞 500 μl,依次加入 Annexin V-FITC、PI 各 5 μl,充分混匀,室温条件下暗室避光孵育 10 min,于 1 h 内上机,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.3 qRT-PCR 法检测 RNA 表达: 应用 Total RNA

Kit 试剂盒提取骨肉瘤组织、癌旁组织细胞总 RNA,应用 NanoDrop 检测 RNA 浓度与纯度,应用反转录试剂盒合成 cDNA,参照 SYBR Green qPCR Super Mix-UDG 试剂盒配置 qRT-PCR 反应体系,qRT-PCR 反应条件:95℃ 10 s(循环 1 次),95℃ 10 s,60℃ 60 s(循环 40 次)。应用 ABI 7500 实时 PCR 进行检测,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-148a 的相对表达量,miR-148a 以 U6 为内参,miR-148a 正向引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3',反向引物为 5'-GCGTCACTGCACTACAGAACTT-3';U6 正向引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4.4 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 Cyclin D1、P21、Bax、Bcl-2 蛋白表达:收集各组 MG63 细胞,加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,蛋白上样量 30 μg/孔,电泳结束后转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗(1:1 000),摇床上 4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次 × 10 min,加入相应二抗(1:2 000),室温条件下摇床匀速孵育 1 h,TBST 洗涤 2 次 × 10 min,曝光,显影,应用 Image J 软件分析各条带灰度值。

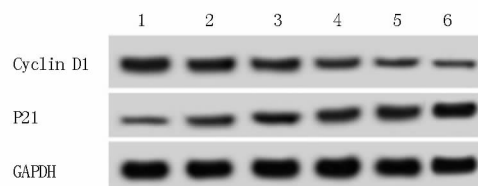
1.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布及方差齐性的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MG63 细胞增殖比较 与对照组比较,瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组、瑞芬太尼 1 μmol/L 组、瑞芬太尼 10 μmol/L 组、瑞芬太尼 100 μmol/L 组、瑞芬太尼 200 μmol/L 组 MG63 细胞 OD 值显著降低($P < 0.01$);Cyclin D1 蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$),P21 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$),瑞芬太尼不同剂量组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),呈剂量依赖效应,其中选用抑制率约为 50% 瑞芬太尼浓度

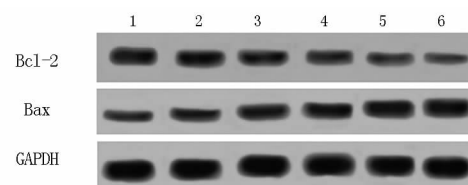
(10 μmol/L)做后续实验,见图 1、表 1。

2.2 各组 MG63 细胞凋亡率比较 与对照组比较,瑞芬太尼 0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L 组 MG63 细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$),Bax 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白的表达水平显著降低($P < 0.01$),见图 2、表 2。



注:1. 对照组;2. 瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组;3. 瑞芬太尼 1 μmol/L 组;4. 瑞芬太尼 10 μmol/L 组;5. 瑞芬太尼 100 μmol/L 组;6. 瑞芬太尼 200 μmol/L 组

图 1 不同浓度的瑞芬太尼对 MG63 细胞增殖蛋白表达的影响



注:1. 对照组;2. 瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组;3. 瑞芬太尼 1 μmol/L 组;4. 瑞芬太尼 10 μmol/L 组;5. 瑞芬太尼 100 μmol/L 组;6. 瑞芬太尼 200 μmol/L 组

图 2 瑞芬太尼对 MG63 细胞凋亡蛋白表达的影响

表 2 瑞芬太尼对 MG63 细胞凋亡的影响 $(\bar{x} \pm s)$

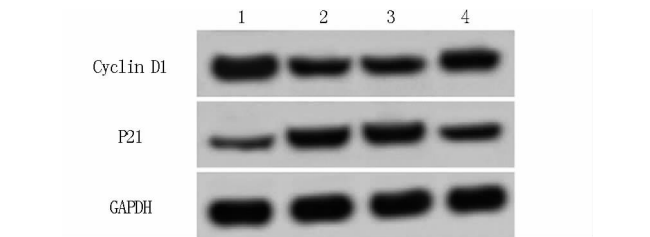
组 别	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	凋亡率 (%)
对照组	0.25 ± 0.02	0.86 ± 0.08	8.10 ± 0.86
瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组	0.34 ± 0.03	0.70 ± 0.07	13.15 ± 1.26
瑞芬太尼 1 μmol/L 组	0.54 ± 0.05	0.51 ± 0.05	16.84 ± 1.48
瑞芬太尼 10 μmol/L 组	0.73 ± 0.07	0.37 ± 0.03	21.65 ± 2.72
瑞芬太尼 100 μmol/L 组	0.82 ± 0.08	0.24 ± 0.02	24.12 ± 2.51
瑞芬太尼 200 μmol/L 组	0.88 ± 0.09	0.10 ± 0.01	27.37 ± 2.69
<i>F</i> 值	156.941	288.568	110.203
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 1 瑞芬太尼对 MG63 细胞增殖的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组 别	<i>n</i>	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	OD(490 nm)		
				24 h	48 h	72 h
对照组	9	0.78 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.77 ± 0.07	1.22 ± 0.11	1.68 ± 0.17
瑞芬太尼 0.1 μmol/L 组	9	0.64 ± 0.06	0.16 ± 0.01	0.62 ± 0.05	0.97 ± 0.08	1.35 ± 0.13
瑞芬太尼 1 μmol/L 组	9	0.51 ± 0.05	0.24 ± 0.02	0.51 ± 0.05	0.81 ± 0.08	1.07 ± 0.10
瑞芬太尼 10 μmol/L 组	9	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.88 ± 0.07
瑞芬太尼 100 μmol/L 组	9	0.24 ± 0.02	0.67 ± 0.06	0.31 ± 0.03	0.48 ± 0.04	0.63 ± 0.06
瑞芬太尼 200 μmol/L 组	9	0.11 ± 0.01	0.88 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.47 ± 0.05
<i>F</i> 值		273.731	355.973	182.419	189.181	165.061
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 miR-148a 在骨肉瘤中的表达及瑞芬太尼对 MG63 细胞中 miR-148a 表达的影响 与癌旁组织比较,骨肉瘤组织中 miR-148a 的表达水平显著降低 (1.02 ± 0.10 vs. 0.31 ± 0.03 , $t/P = 20.402 / < 0.001$);与对照组比较,瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 MG63 细胞中 miR-148a 的表达水平显著升高 (0.22 ± 0.02 vs. 0.68 ± 0.07 , $t/P = 18.956 / < 0.001$)。

2.4 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼抑制 MG63 细胞增殖的影响 与瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组比较,瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组 MG63 细胞增殖活力显著升高,Cyclin D1 蛋白的表达水平显著升高,P21 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.01$),见图 3、表 3。

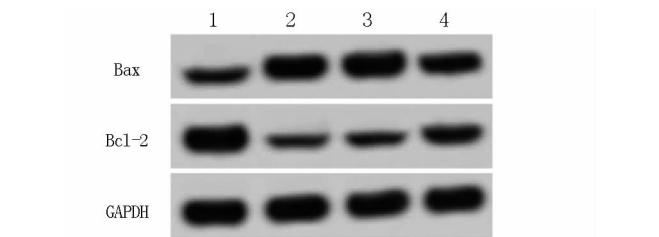


注:1. 对照组;2. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ 组;3. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组;4. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组

图 3 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼抑制 MG63 细胞增殖蛋白表达的影响

2.5 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼促进 MG63 细胞凋亡的影响 与瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组比较,瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组 MG63 细

胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),见图 4、表 4。



注:1. 对照组;2. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ 组;3. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组;4. 瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组

图 4 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼促进 MG63 细胞凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

骨肉瘤是指间质细胞从软骨阶段发展形成肿瘤骨样组织,早期诊断及治疗可有效提高骨肉瘤患者的生存率^[8]。近年来,研究表明 1 种或 2 种药物联合应用具有协同抗肿瘤的作用^[9-10]。因此,本研究观察瑞芬太尼对骨肉瘤的抗肿瘤作用,初步探讨其作用机制,旨在为该药物的临床应用提供理论基础。

瑞芬太尼可抑制肺癌手术患者血清 IL-6 水平而抑制氧化应激反应^[11]。研究表明瑞芬太尼可能通过下调 IL-7R 表达而抑制肺腺癌细胞转移^[12]。瑞芬太尼可能通过抑制 Akt 通路而抑制胰腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[13]。瑞芬太尼属于 μ 受体激动剂,研究指出瑞芬太尼可抑制结肠癌细胞增殖并促进细胞凋

表 3 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼抑制 MG63 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	miR-148a	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	OD(490 nm)		
				24 h	48 h	72 h
对照组	0.22 ± 0.02	0.78 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.77 ± 0.07	1.22 ± 0.11	1.68 ± 0.17
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.67 ± 0.07	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.88 ± 0.07
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组	0.66 ± 0.07	0.35 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.64 ± 0.06	0.85 ± 0.08
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组	0.43 ± 0.04	0.57 ± 0.06	0.27 ± 0.03	0.62 ± 0.06	0.87 ± 0.09	1.15 ± 0.12
F 值	140.034	141.524	166.857	97.846	100.973	97.451
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 抑制 miR-148a 对瑞芬太尼促进 MG63 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	凋亡率 (%)
对照组	0.25 ± 0.02	0.86 ± 0.08	8.10 ± 0.86
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.78 ± 0.07	0.17 ± 0.02	22.65 ± 2.72
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-NC 亚组	0.76 ± 0.07	0.14 ± 0.01	22.71 ± 2.78
瑞芬太尼 10 $\mu\text{mol/L}$ + anti-miR-148a 亚组	0.52 ± 0.05	0.46 ± 0.04	13.24 ± 1.35
F 值	174.685	473.612	106.814
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

亡^[14]。本结果显示,不同浓度的瑞芬太尼处理骨肉瘤 MG63 细胞后,细胞增殖活力显著降低,细胞凋亡率显著升高,与上述报道相似,提示瑞芬太尼可抑制骨肉瘤细胞增殖并促进其凋亡;同时显示瑞芬太尼可显著提高 MG63 细胞中 P21 的表达水平,降低 Cyclin D1 的表达水平,与相关文献报道结果一致^[15]。提示瑞芬太尼可能通过上调 P21 的表达及下调 Cyclin D1 的表达进而抑制骨肉瘤细胞增殖。而瑞芬太尼处理后 MG63 细胞中 Bax 蛋白水平显著升高,Bcl-2 蛋白水平显著降低,与相关报道相似^[16]。提示瑞芬太尼可能通过上调 Bax 表达及下调 Bcl-2 表达而促进骨肉瘤细胞凋亡。

miR-148a 在鼻咽癌、胃癌组织或细胞中表达水平降低,上调 miR-148a 表达可抑制癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。研究表明 miR-148a 还可抑制胃癌细胞迁移及侵袭^[17-18]。相关研究报道指出 miR-148a 过表达可通过抑制靶基因 HPIP 表达而抑制非小细胞肺癌细胞增殖^[19]。本结果显示,瑞芬太尼处理后 MG63 细胞中 miR-148a 的表达水平显著升高,提示瑞芬太尼可能通过上调 miR-148a 表达而影响骨肉瘤细胞增殖及凋亡。进一步研究显示抑制 miR-148a 可逆转瑞芬太尼对 MG63 细胞增殖的抑制作用,还可逆转瑞芬太尼对 MG63 细胞凋亡的促进作用。本实验结果证实,瑞芬太尼可通过促进 miR-148a 表达而降低骨肉瘤细胞增殖能力,促进细胞凋亡。

综上所述,瑞芬太尼对骨肉瘤细胞的增殖具有明显的抑制作用,并可诱导细胞凋亡,其可能通过上调 miR-148a 表达而发挥作用,为瑞芬太尼临床应用于骨肉瘤的治疗奠定理论基础。但关于瑞芬太尼在动物体内的相关实验及其安全性研究均需进一步探讨。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

孟杨、王宪峰:论文撰写,进行统计学分析,论文修改;王绍伟、徐海伟:实施研究过程,数据收集,分析整理

参考文献

- [1] Kager L, Tamamyan G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma[J]. *Future Oncol*, 2017, 13(4):357-368. DOI:0. 2217/for-2016-0261.
- [2] 肖鑫,王臻,许骋,等. 基于高通量测序技术的骨肉瘤基因研究与个体化治疗[J]. *中华骨科杂志*, 2014, 34(4):466-471. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-2352. 2014. 04. 020.
- [3] 李恒元,孙凌凌,李冰皓,等. 雷公藤红素通过 ROS/JNK 通路诱导骨肉瘤细胞周期阻滞、凋亡和自噬的研究[J]. *中华骨科杂志*, 2016, 36(8):490-502. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-2352. 2016. 08. 005.
- [4] 孟俊青. 芬太尼和瑞芬太尼对人肺癌细胞 A549 细胞活力的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2012.
- [5] Xu Y, Sun Y, Chen H, et al. Effects of two different anesthetic

- methods on cellular immunity of patients after liver cancer resection[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2016, 30(4):1099-1106.
- [6] Ma W, Zhang X, Chai J, et al. Circulating miR-148a is a significant diagnostic and prognostic biomarker for patients with osteosarcoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12):12467-12472. DOI: 10. 1007/s13277-014-2565-x.
- [7] Yang H, Peng Z, Da Z, et al. MicroRNA-148a acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting rho-associated coiled-coil kinase[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(8):1231-1243. DOI: 10. 3727/096504017X14850134190255.
- [8] 汪新媛,田京. 骨肉瘤化疗研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2010, 31(3):159-161. DOI:10. 3969/j. issn. 1673-7083. 2010. 03. 010.
- [9] Higuchi T, Sugisawa N, Miyake K, et al. Combination treatment with sorafenib and everolimus regresses a doxorubicin-resistant osteosarcoma in a PDOX mouse model[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(9):4781-4786. DOI:10. 21873/anticancer. 13662.
- [10] 代国,陶春杰,郑迪,等. 华蟾素联合顺铂对人骨肉瘤 U2OS 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 30(17):5812-5817. DOI:10. 13241/j. cnki. pmb. 2017. 30. 003.
- [11] 江山,殷飞,雷钧,等. 瑞芬太尼对肺癌手术患者血清 IL-6 和 TNF- α 水平的影响[J]. *东南大学学报:医学版*, 2016, 35(5):669-672. DOI:10. 3969/j. issn. 1671-6264. 2016. 05. 005.
- [12] 吴远波,李欣,鲁胜强,等. 瑞芬太尼对人肺腺癌细胞转移能力和白细胞介素-7 受体表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(9):1058-1060. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 0254-1416. 2017. 09. 008.
- [13] 唐优仕,王龙,马浩文,等. 瑞芬太尼对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *中国热带医学*, 2017, 17(12):1193-1197. DOI:10. 13604/j. cnki. 46-1064/r. 2017. 12. 07.
- [14] 赵莉,王志红,李学斌,等. 瑞芬太尼对人结肠癌 COLO205 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(5):401-403. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1673-4378. 2017. 05. 004.
- [15] 申莹莹,苏小桃,欧军,等. 二甲双胍联合异羟肟酸对骨肉瘤细胞增殖凋亡的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(1):11-15. DOI:10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2016. 01. 003.
- [16] 程新燕,符翠莉. 芹菜素对大鼠骨肉瘤细胞凋亡及相关蛋白 Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, 细胞色素 C 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(15):139-142. DOI:10. 13422/j. cnki. syfx. 2016150139.
- [17] 赵锦成,石颖,王宇,等. MiR-148a 在鼻咽癌中的表达及其对肿瘤细胞生物学功能的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(15):1219-1223. DOI: 10. 13201/j. issn. 1001-1781. 2016. 15. 010.
- [18] 吴洁,缪林. MiR-148a 调控胃癌细胞侵袭迁移的作用机制研究[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(10):99-102. DOI:10. 11969/j. issn. 1673-548X. 2016. 10. 026.
- [19] 徐桂丽,徐云华,倪才方. miR-148a 通过下调 HPIP 的表达抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖[J]. *中国血液流变学杂志*, 2017, 27(30):251-255. DOI:10. 3969/j. issn. 1009-881X. 2017. 03. 003.

(收稿日期:2019-10-23)

痛风合并糖调节受损男性患者氧化低密度脂蛋白、炎症因子水平与颈动脉粥样硬化的关系

李敏, 郭毅飞, 龚丽, 李雪峰

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372998)

作者单位: 442000 湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院内分泌风湿病科

通信作者: 李雪峰, E-mail: lm1980806@163.com

【摘要】目的 观察痛风合并糖调节受损(IGR)男性患者氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、炎症因子水平及颈动脉内膜中层厚度(IMT)的变化,探讨痛风合并 IGR 男性患者动脉粥样硬化的发生机制。**方法** 选择 2016 年 1 月—2017 年 6 月十堰市太和医院内分泌风湿病科诊治的男性痛风患者 76 例作为研究对象,根据口服葡萄糖耐量试验(OGTT)结果,分为痛风组(32 例)和痛风合并 IGR 组(合并症组,44 例),以 69 例健康体检男性作为健康对照组。检测 3 组颈动脉 IMT 及实验室指标。采用 Spearman 相关分析评估合并症组患者颈动脉 IMT 与 ox-LDL 及炎症因子水平的相互关系。采用多因素 Logistic 回归分析影响痛风患者颈动脉 IMT 的危险因素。**结果** 合并症组和痛风组患者 UA、TC、LDL-C、ApoB、INS 水平和 HOMA-IR 均显著高于健康对照组($F/P = 29.379/0.001, 18.111/0.025, 14.150/0.003, 13.429/0.017, 12.328/0.003, 21.540/0.002$);合并症组 IMT 高于痛风组和健康对照组($F/P = 19.547/0.001$)。合并症组血清 ox-LDL、hs-CRP、IL-6 和 TNF- α 水平显著高于痛风组和健康对照组($F/P = 17.681/0.001, 11.754/0.032, 29.378/0.002, 22.595/0.004$);痛风组患者 ox-LDL 高于健康对照组($t/P = 2.436/0.018$)。合并症组患者颈动脉 IMT 与 ox-LDL、hs-CRP、IL-6、TNF- α 呈显著正相关($r/P = 0.438/0.001, 0.343/0.002, 0.386/0.007, 0.659/0.029$)。Logistic 回归分析显示,ox-LDL、LDL-C、TNF- α 和 HOMA-IR 是痛风合并 IGR 发生颈动脉粥样硬化的危险因素。**结论** 痛风合并 IGR 男性患者体内 ox-LDL 浓度与炎症因子水平显著增高,ox-LDL 水平的变化可能与机体炎症反应有关,二者共同参与痛风患者动脉粥样硬化的形成。

【关键词】 痛风;糖调节受损;氧化低密度脂蛋白;炎症因子;颈动脉粥样硬化;男性

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.012

The relationship between oxidized LDL, inflammatory factors and carotid atherosclerosis in male patients with gout and impaired glucose regulation Li Min, Guo Yifei, Gong Li, Li Xuefeng. Department of Endocrinology and Rheumatology, Shiyan City Taihe Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Hubei Province, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Li Xuefeng, E-mail: lm1980806@163.com

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81372998)

【Abstract】 Objective To observe the changes of ox-LDL, inflammatory factors and carotid intima-media thickness (IMT) in male patients with gout and impaired glucose regulation (IGR), and to explore the pathogenesis of atherosclerosis in gout patients. **Methods** From January 2016 to June 2017, 76 male gout patients diagnosed and treated by the Department of Endocrinology and Rheumatology of Taihe Hospital were selected as the study object. According to the results of OGTT, the patients were divided into gout group (32 cases) and gout combined with IGR group (44 cases). 69 healthy men were selected as the control group. The IMT and laboratory indexes of the three groups were measured. Spearman correlation analysis was used to evaluate the relationship between carotid IMT, ox-LDL and inflammatory factors. Multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors of carotid IMT in patients with gout. **Results** The levels of UA, TC, LDL-C, Apo B, ins and HOMA-IR were significantly higher in the combined group and gout group than those in the healthy control group ($F/P = 29.379/0.001, 18.111/0.025, 14.150/0.003, 13.429/0.017, 12.328/0.003, 21.540/0.002$); the IMT in the combined group was higher than that in the gout group and the healthy control group ($F/P = 19.547/0.001$). The levels of ox-LDL, hs-CRP, IL-6 and TNF- α in the patients with complications were significantly higher than those in the gout group and the healthy control group ($F/P = 17.681/0.001, 11.754/0.032, 29.378/0.002, 22.595/0.004$); the ox-LDL in the patients

with gout group was higher than that in the healthy control group ($t/P=2.436/0.018$). There was a significant positive correlation between IMT and ox-LDL, hs-CRP, IL-6, TNF- α ($r/P=0.438/0.001, 0.343/0.002, 0.386/0.007, 0.659/0.029$). Logistic regression analysis showed that ox-LDL, LDL-C, TNF- α and HOMA-IR were risk factors of carotid atherosclerosis in gout with IGR. **Conclusion** The concentration of ox-LDL and the level of inflammatory factors in male patients with gout and IGR were significantly increased. The change of ox-LDL may be related to the inflammatory response of the body. Both of them participate in the formation of atherosclerosis in gout patients.

【Key words】 Gout; Impaired glucose regulation; Oxidized low density lipoprotein; Inflammatory cytokines; Carotid arteriosclerosis; Male

痛风(gout)是由于嘌呤代谢紊乱、尿酸排泄障碍所致的尿酸盐沉积而引起组织损伤临床症候群,以高尿酸血症、急性关节炎、痛风石形成和痛风性肾病为主要临床特征^[1]。近年来,流行病学研究发现,痛风患者冠心病、脑梗死的发病率与病死率均显著高于正常人群^[2]。糖调节受损(IGR)又称为糖尿病前期,是2型糖尿病发生、发展重要的病理阶段,包括空腹血糖受损(IFG)和糖耐量减低(IGT)。研究显示,痛风患者容易合并2型糖尿病(T2DM)和IGR,痛风与糖代谢异常并存时增加患者罹患心脑血管疾病的风险^[3]。氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)为LDL中的蛋白质及脂质成分受到自由基攻击而氧化修饰形成,机体ox-LDL的形成受炎症因子、炎症介质和氧化应激效应调控,ox-LDL及炎症因子在动脉粥样硬化(AS)中的致病性及对AS的预测意义已得到公认^[4]。利用彩色多普勒超声检查颈动脉内膜中层厚度(IMT)来发现内膜增厚及粥样斑块形成,是临床用于反映AS的重要“窗口”性检查^[5]。现分析痛风合并IGR患者颈动脉IMT变化与ox-LDL、炎症因子的关系及痛风患者AS发生的危险因素。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择2016年1月—2017年6月十堰市太和医院内分泌风湿病科诊治的男性痛风患者76例作为研究对象,均符合1977年美国风湿病协会制定的痛风诊断标准^[6]。IGR的诊断参照1999年世界卫生组织制定的相关诊断标准:糖耐量正常的空腹血糖(FPG)<6.1 mmol/L,餐后2 h血糖(2 h PG)<7.8 mmol/L;糖调节异常患者的FPG为6.1~7.0 mmol/L和/或2 h PG为7.8~11.1 mmol/L。患者均为男性,年龄29~66(45.3 $\pm$ 7.2)岁。根据是否合并IGR分成单纯痛风组(痛风组)32例和痛风合并IGR组(合并症组)44例。痛风患者均无急性及慢性肾功能衰竭、缺血性脑血管疾病、确诊的糖尿病、严重肝功能异常等并发症,排除长期服用糖皮质激素者。另选择于医院体检中心的健康体检者69例作为健康对照组,均为健

康男性,年龄28~68(46.7 $\pm$ 9.2)岁。3组年龄、吸烟史、高血压病史、BMI比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。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 观测指标与方法

1.2.1 颈动脉IMT测定:所有受试者取平卧位,选择双侧颈总动脉远端分叉水平连线下1.5 cm处为测量点,将超声取样门与血管壁垂直并置于血管外中膜处,在心电图R波顶点处即心室舒张末期时测量,每次扫描测量3点,每一受检者做2次扫描,两侧共取6个测量值求平均值作为IMT计数。由本院同一位高年资B型超声医师采用美国惠普公司HP Image point彩色多普勒超声仪(型号2410A),探头频率10 MHz,独立操作完成对所有受试对象颈动脉AS的评价。

1.2.2 实验室指标检测:于清晨空腹抽取研究对象肘静脉血5 ml,分离获得血清,利用罗氏cobas c311全自动生化仪检测血UA、血脂、FPG、INS和hs-CRP等生化指标。其中,UA、血脂、FPG采用直接法测定;hs-CRP采用乳胶增强免疫透射比浊法测定,INS采用间接免疫荧光法测定,根据FPG及INS值,计算胰岛素抵抗指数($HOMA-IR = \text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖} / 22.5$)。ox-LDL、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和TGF- β 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗夹心法测定,试剂盒购自武汉优尔科技股份有限公司,按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法 使用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,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,组间比较采用 χ^2 检验。采用Spearman相关性分析颈动脉IMT与ox-LDL及炎症因子关系,多因素Logistic回归分析影响痛风患者颈动脉IMT的危险因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组临床资料比较 UA、TC、LDL-C、ApoB、INS水平和HOMA-IR比较,合并症组>痛风组>健康对

照组, 合并症组 IMT 高于痛风组和健康对照组 (P 均 < 0.05); 3 组年龄、BMI、吸烟史、高血压病史、FPG、TG、HDL-C、ApoA 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 3 组 ox-LDL 与炎性因子水平比较 与痛风组和健康对照组比较, 合并症组患者 ox-LDL、hs-CRP、IL-6、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 痛风组患者 ox-LDL 高于健康对照组 ($t = 2.436, P = 0.018$), 3 组 IL-1 β 、TGF- β 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 痛风合并 IGR 组患者颈动脉 IMT、ox-LDL 与炎性因子的关系 Spearman 相关性分析发现, 颈动脉 IMT 与 ox-LDL 及炎性指标 hs-CRP、IL-6、TNF- α 均呈显著正相关 ($r = 0.438、0.343、0.386、0.659, P = 0.001、0.002、0.007、0.029$)。

2.4 痛风合并 IGR 组患者动脉粥样硬化危险因素 Logistic 多元逐步回归分析 以痛风颈动脉 IMT 为因变量, 以与健康对照组有明显差异的指标 (ox-LDL、UA、TC、LDL-C、ApoB、INS、HOMA-IR、hs-CRP、IL-6、TNF- α) 为自变量的多因素 Logistic 回归分析, 结果显示 ox-LDL、LDL-C、TNF- α 和 HOMA-IR 是影响痛风合并 IGR 患者颈动脉 IMT 的独立危险因素, 见表 3。

3 讨论

近年来, 流行病学证据表明, 痛风与血糖代谢异常密切相关, 二者的发生受胰岛素抵抗、血脂紊乱、氧化应激效应等多种因素共同影响, 具有相似的发病机制与流行病学特征^[7]。循证医学证据表明, 高血压、吸烟及肥胖等常见的 AS 危险因素并不能完全解释痛风患者易发 AS 这一现象^[8]。高糖、晚期糖基化产物 (AGE) 及尿酸晶体可诱发血管内膜炎性反应, 募集单

表 1 3 组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	健康对照组 ($n=69$)	痛风组 ($n=32$)	合并症组 ($n=44$)	F/χ^2 值	P 值
年龄 (岁)	46.70 $\pm$ 9.20	44.80 $\pm$ 7.60	47.60 $\pm$ 8.90	0.321	0.781
BMI (kg/m^2)	22.70 $\pm$ 6.20	23.50 $\pm$ 5.70	24.10 $\pm$ 4.60	0.944	0.933
吸烟史 [例 (%)]	9 (13.0)	4 (12.5)	6 (13.6)	0.753	0.695
高血压病史 [例 (%)]	9 (13.0)	5 (15.6)	7 (15.9)	0.655	0.762
IMT (mm)	0.69 $\pm$ 0.29	0.89 $\pm$ 0.43	1.18 $\pm$ 0.51	19.547	0.001
UA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	313.90 $\pm$ 51.30	472.50 $\pm$ 92.50	524.70 $\pm$ 81.30	29.379	0.001
FPG (mmol/L)	4.25 $\pm$ 1.45	4.76 $\pm$ 1.18	5.31 $\pm$ 1.24	0.552	0.072
TG (mmol/L)	1.32 $\pm$ 0.75	1.45 $\pm$ 0.82	1.38 $\pm$ 0.79	0.750	0.074
TC (mmol/L)	4.41 $\pm$ 0.87	5.43 $\pm$ 1.45	6.87 $\pm$ 1.17	18.111	0.025
LDL-C (mmol/L)	2.53 $\pm$ 1.03	2.97 $\pm$ 1.52	3.10 $\pm$ 1.78	14.150	0.003
HDL-C (mmol/L)	1.47 $\pm$ 0.49	1.35 $\pm$ 0.43	1.24 $\pm$ 0.35	0.377	0.113
ApoA (g/L)	1.21 $\pm$ 0.33	1.31 $\pm$ 0.35	1.19 $\pm$ 0.56	0.496	0.085
ApoB (g/L)	0.73 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.26	1.35 $\pm$ 0.32	13.429	0.017
INS ($\mu\text{u}/\text{L}$)	4.41 $\pm$ 0.87	6.43 $\pm$ 1.45	9.87 $\pm$ 1.17	12.328	0.003
HOMA-IR	1.37 $\pm$ 0.22	2.75 $\pm$ 0.83	3.84 $\pm$ 0.96	21.540	0.002

表 2 3 组 ox-LDL 及炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	ox-LDL (ng/L)	hs-CRP (mg/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)	TGF- β (ng/L)
健康对照组	69	467.2 $\pm$ 160.1	7.1 $\pm$ 3.1	14.7 $\pm$ 8.3	37.4 $\pm$ 9.3	28.9 $\pm$ 13.5	28.7 $\pm$ 14.8
痛风组	32	677.9 $\pm$ 215.3	8.5 $\pm$ 4.3	18.6 $\pm$ 9.7	38.8 $\pm$ 10.4	34.5 $\pm$ 12.6	34.8 $\pm$ 17.9
合并症组	44	704.5 $\pm$ 185.7	12.2 $\pm$ 5.5	17.5 $\pm$ 7.9	49.6 $\pm$ 18.5	48.4 $\pm$ 17.7	18.8 $\pm$ 9.5
F 值		17.681	11.754	0.723	29.378	22.595	0.927
P 值		0.001	0.032	0.076	0.002	0.004	0.067

表 3 影响痛风合并 IGR 患者颈动脉 IMT 的多因素 Logistic 回归分析

变量	β 值	SE 值	$Wald$ 值	P 值	OR 值	95% CI
ox-LDL	0.213	0.032	8.332	0.002	1.102	1.032 ~ 1.232
LDL-C	0.837	0.302	4.221	0.024	2.315	1.056 ~ 4.321
TNF- α	0.325	0.047	5.769	0.001	1.982	1.342 ~ 5.432
HOMA-IR	0.774	0.051	4.456	0.021	2.187	1.342 ~ 5.432

核细胞等向血管内膜迁移并转化为巨噬细胞,产生包括 IL-6、TNF- α 等多种细胞因子和炎性介质,放大炎症反应,形成恶性循环,共同促使血管炎症反应向纵深发展,加速高尿酸血症及糖代谢异常相关 AS 进程^[9]。ox-LDL 作为致病性脂质成分,可通过多种生物学作用促进 AS 的发生、发展,ox-LDL 及炎性因子在 T2DM 患者中不同程度升高,二者共同作用所致的血管内皮损伤贯穿于 T2DM 相关性 AS 的发生、发展及不稳定斑块形成的整个过程^[10]。在糖尿病早期阶段痛风患者与未出现糖代谢异常痛风患者发生 AS 是否具有差异性尚不清楚,ox-LDL、炎性因子在痛风患者 AS 发生中的作用亦未被深入研究。

IMT 是目前评价大血管病变危险性的一个独立性指标,临床上常用来观察 AS 的程度,颈动脉 IMT 每增加 1 个标准差,患者心肌梗死和脑卒中发生率增加约 1.36 倍^[11]。本研究结果表明,痛风合并 IGR 组颈动脉 IMT 较单纯痛风组及健康对照组显著增高,提示,痛风合并 IGR 患者较单纯痛风患者存在更高 AS 风险。同时,本研究结果提示,痛风患者血脂谱的主要特征为 TC、LDL-C 和 ApoB 水平均显著增高,符合致动脉粥样硬化血脂谱的特征。Tsutsumi 等^[12]发现原发性痛风患者血浆 ox-LDL 抗体较正常人群显著增高,且 ox-LDL 抗体水平同 LDL-C 颗粒直径及 HDL-C 浓度关系密切。

本研究结果提示,痛风合并 IGR 组患者 ox-LDL 及 IL-6、TNF- α 、hs-CRP 水平均显著高于健康对照组和单纯痛风组,相关性研究提示,痛风合并 IGR 患者颈动脉 IMT 与血清 ox-LDL、hs-CRP、IL-6 及 TNF- α 水平呈正相关,结果提示痛风与 IGR 合并存在时,患者体内呈低度炎症反应状态,脂质过氧化效应增加,存在更高的 AS 风险,分析其原因可能与以下几方面有关:(1)炎症反应是 AS 病理生理中重要的启动环节,高尿酸血症及尿酸钠结晶导致的炎症反应是痛风患者体内炎症反应的重要原因。尿酸钠结晶可引起关节、关节周围及血管内膜淋巴细胞、单核—巨噬细胞等炎症细胞活化,后者通过自分泌和旁分泌方式,使 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎细胞因子产生增加,这些细胞因子相互作用,构成复杂的网络,使炎症反应级联放大^[13]。Cavalcanti 等^[14]发现急性期痛风患者血浆中除 IL-6、TNF- α 等炎性因子增高外,白介素-18(IL-18)也显著增加。(2)在糖尿病早期的糖调节受损阶段,机体出现包括胰岛素抵抗、氧化应激反应增加、血管内皮损伤等一系列致炎性病理反应,IGT 与 IFG 患者循环 TNF- α 和 IL-6 水平均出现不同程度表达增加^[15]。(3)ox-

LDL 与炎性因子增加在 AS 形成中存在相互作用,互为因果。基础研究表明,循环中高浓度的 ox-LDL 通过增加炎症反应启动调控因子 NF- κ B 基因表达,诱导 TNF- α 和 IL-6 等促炎细胞因子释放增加,引起炎症细胞浸润,而 TNF- α 等促炎细胞因子又促进巨噬细胞氧自由基的释放,机体氧化/抗氧化系统失衡,氧化产物 ox-LDL 产生增加,形成恶性循环,最终介导血管内皮损伤和 AS 的形成^[16]。而炎症反应产物 CRP 可与脂蛋白结合,由经典途径激活补体系统,产生大量的终末攻击复合物和终末蛋白 C5b-9,造成血管内膜损伤,氧自由基大量释放,脂质过氧化作用增强,ox-LDL 生成增加,后者被巨噬细胞吞噬后形成 AS 脂质斑块^[17]。

本研究发现单纯痛风患者 ox-LDL 水平也显著高于健康对照组,但患者炎症指标并无明显增高,提示除炎症因素外,还有其他原因导致患者体内 ox-LDL 浓度的变化,推测痛风患者体内高尿酸浓度可能是 ox-LDL 及机体炎症反应的另一重要原因。过去研究表明,尿酸与 OH⁻、ONOO⁻ 等自由基发生复杂的生化反应后,产生亲脂自由基氨基碳酰基(aminocarbonyl),诱导天然型 LDL 向 ox-LDL 转化^[18]。此外,高浓度尿酸可激活 Erk/p38 信号通路,使活性氧(ROS)生成增加,机体氧化/抗氧化系统失衡,促进 LDL 的氧化^[19]。但是其他研究发现,痛风患者体内尿酸浓度同 ox-LDL 水平并不具有明确相关性,其原因可能是体内尿酸浓度存在波动性,仅通过非动态的尿酸浓度测定,未必能够清楚反映其对 ox-LDL 的长期作用^[20]。

本研究以痛风患者颈动脉 IMT 为因变量,ox-LDL、UA、TC、LDL-C、ApoB、INS、HOMA-IR、hs-CRP、IL-6、TNF- α 为自变量,进行 Logisitic 多元线性逐步回归分析,结果显示除年龄、高血脂、吸烟史、高血压病史等传统 AS 危险因素外,ox-LDL 和炎性细胞因子 TNF- α 均可能是影响痛风患者颈动脉 IMT 的独立危险因素。有较多临床研究均表明,痛风与多种代谢紊乱密切相关,常与高血糖、肥胖及胰岛素抵抗合并存在。本研究结果显示,2 组痛风患者空腹 INS 水平和 HOMA-IR 明显高于健康对照组,Logisitic 回归分析结果提示,HOMA-IR 也是影响患者颈动脉 IMT 的危险因素,提示高胰岛素血症及胰岛素抵抗可能也是痛风患者 AS 发生的重要影响因素。

总之,痛风合并 IGR 患者颈动脉 IMT 显著增加,患者体内致动脉粥样硬化脂质谱发生显著变化,且体内 ox-LDL 浓度明显增高,机体炎症反应及脂质过氧化作用增强。促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达增加、持续性高尿酸血症和糖毒性可能是引起 ox-LDL 增高

的重要原因。循环 ox-LDL 浓度增加、炎性反应、高尿酸血症、糖代谢异常及胰岛素抵抗可能是痛风患者发生 AS 的重要病理基础,关于痛风患者体内 ox-LDL 与炎性反应、尿酸、胰岛素抵抗相互作用的分子机制及其对 AS 形成的影响尚需进一步临床与实验研究明确。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李敏:设计研究方案,实施研究过程及论文撰写;郭毅飞、龚丽:资料收集;李雪峰:论文审核

参考文献

- [1] Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout[J]. Lancet, 2016, 388 (10055):2039-2052. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00346-9.
- [2] Eliseev MS, Denisov IS, Markelova EI, et al. Independent risk factors for severe cardiovascular events in male patients with gout: Results of a 7-year prospective study[J]. Ter Arkh, 2017, 89(5):10-19. DOI:10.17116/terarkh201789510-19.
- [3] 吴文军,徐蕾,黄丽梅,等. 2016—2017 年上海市社区糖尿病高危人群筛查结果分析[J]. 中华疾病控制杂志,2019,23(7):802-806. DOI: 10.16462/j.cnki.zhjbkz.2019.07.012.
- [4] 闵宁斌,张少华,刘仲伟,等. 氧化低密度脂蛋白通过氧化应激介导的 MKKs/p38 信号通路诱导巨噬细胞炎症反应[J]. 山西医科大学学报,2019,50(10):1392-1398. DOI:10.13753/j.issn.1007-6611.2019.10.011.
- [5] Polak JF, O'Leary DH. Carotid intima-media thickness as surrogate for and predictor of CVD[J]. Glob Heart, 2016, 11(3):295-312. DOI:10.1016/j.ghheart.2016.08.006.
- [6] Wallace SL, Robinson H, Masi AT, et al. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout [J]. Arthritis Rheum, 1977, 20: 895-900. DOI:10.1002/art.1780200320.
- [7] Collier A, Stirling A, Cameron L, et al. Gout and diabetes: A common combination[J]. Postgrad Med J, 2016, 92(1089):372-378. DOI:10.1136/postgradmedj-2015-133691.
- [8] 赵同德,张强,杨甜甜,等. 原发性高尿酸血症与痛风流行病学及危险因素研究进展[J]. 齐鲁医学杂志,2017,32(1):109-113. DOI:10.13362/j.qlyx.201701037.
- [9] De Pergola G, Cortese F, Termine G, et al. Uric acid, metabolic syndrome and atherosclerosis: The chicken or the egg, which comes first[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2018, 18(3):251-259. DOI:10.2174/1871530318666180212101548.
- [10] 羊壮绵,羊子伦,陈碧燕. 循环氧化低密度脂蛋白在老年冠心病

患者中的表达水平及临床意义[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019,21(8):830-833. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2019.08.012.

- [11] 王秀玲,张敏郁,丁桂春,等. 三维超声灰阶中位数定量评价颈动脉斑块的易损性[J/OL]. 中华医学超声杂志:电子版,2017,14(1):23-28. DOI:10.3877/cma.j.issn.1672-6448.2017.01.008.
- [12] Tsutsumi Z, Moriwaki Y, Takahashi S, et al. Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies in patients with primary gout: Effect of urate-lowering therapy [J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1-2):117-122. DOI:10.1016/j.cccn.2003.09.019.
- [13] Yokose K, Sato S, Asano T, et al. TNF- α potentiates uric acid-induced interleukin-1 β (IL-1 β) secretion in human neutrophils[J]. Mod Rheumatol, 2018, 28(3):513-517. DOI: 10.1080/14397595.2017.1369924.
- [14] Cavalcanti NG, Marques CD, Lins E, et al. Cytokine profile in gout: Inflammation driven by IL-6 and IL-18[J]. Immunol Invest, 2016, 45(5):383-595. DOI:10.3109/08820139.2016.1153651.
- [15] Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, et al. Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes--Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening[J]. Clin Biochem, 2015, 48(9):581-585. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2015.02.015.
- [16] Hartley A, Haskard D, Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis - Novel insights and future directions in diagnosis and therapy[J]. Trends Cardiovasc Med, 2019, 29(1):22-26. DOI:10.1016/j.tcm.2018.05.010.
- [17] Krayem I, Bazzi S, Karam M. The combination of CRP isoforms with oxLDL decreases TNF- α and IL-6 release by U937-derived macrophages[J]. Biomed Rep, 2017, 7(3):272-276. DOI:10.3892/br.2017.949.
- [18] 刘青,江力勤,赵圣刚. 高尿酸血症的氧化应激反应与心血管疾病的关系[J]. 临床医药文献电子杂志,2018,5(91):193-194. DOI:10.16281/j.cnki.jocml.2018.91.140.
- [19] Jiang X, Li M, Yang Q, et al. Oxidized low density lipoprotein and inflammation in gout patients[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(1):65-69. DOI:10.1007/s12013-013-9767-5.
- [20] 罗荔,靳瑾,王敏哲. 痛风合并糖代谢紊乱患者的代谢特征研究[J]. 疑难病杂志,2015,14(10):1033-1035,1038. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2015.10.013.

(收稿日期:2019-11-06)

(上接 366 页)

- [18] 李清靖,单保恩,李宏,等. 胃癌患者 Th17/Treg 细胞失衡的研究[J]. 中国全科医学,2015,18(29):3596-3600. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.2015.29.022.
- [19] Navarro GA, Muoz-Valle JF, Navarro AD, et al. Circulating soluble levels of MIF in women with breast cancer in the molecular subtypes: relationship with Th17 cytokine profile[J]. Clin Exp Med, 2019, 19(3):385-391. DOI:10.1007/s10238-019-00559-6.
- [20] Doulabi H, Rastin M, Shabahangh H, et al. Analysis of Th22, Th17 and CD4⁺ cells co-producing IL-17/IL-22 at different stages of

human colon cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1101-1106. DOI:10.1016/j.biopha.2018.04.147.

- [21] 张卓,王夫景,康悦. 大肠肿瘤微环境中 Th17 细胞与调节性 T 细胞的作用及临床意义[J]. 国际免疫学杂志,2017,40(4):459-462. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2017.04.024.
- [22] 刘勇,周彪,曾金等. 肝癌患者外周血 Th17/Treg 细胞和相关细胞因子的表达及 IL-17 对肝癌细胞侵袭的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(3):700-702. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2018.03.074.

(收稿日期:2019-11-22)

血清肿瘤标记物检测在系统性红斑狼疮诊断中的价值

龙洁, 魏萌

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2018SZ0187)

作者单位: 610031 成都, 西南交通大学医学院研究生院(龙洁、魏萌); 610083 成都, 西部战区总医院肾脏风湿科(魏萌)

通信作者: 魏萌, E-mail: weimengwm@sina.com

【摘要】目的 探讨肿瘤标记物 CEA、CA125、CA199 和 CA153 对系统性红斑狼疮(SLE)的诊断价值。**方法** 分析 2016 年 7 月—2018 年 12 月西部战区总医院肾脏风湿科收治的 SLE 患者 89 例为 SLE 组, 再按 SLEDAI 分为 SLE 活动期亚组 57 例及 SLE 缓解期亚组 32 例。纳入同期性别、年龄相匹配的健康体检者 100 例为健康对照组。检测 2 组受试者红细胞沉降率(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、血清 CEA、CA125、CA199、CA153 及免疫学指标(补体 C3、补体 C4、IgG、IgM、IgA)、抗 dsDNA 抗体等指标, 采用 Pearson 法分析 SLE 患者中肿瘤标志物与 SLEDAI 评分的相关性, 探讨血清肿瘤标志物对 SLE 诊断及活动度判断的临床意义。**结果** 与健康对照组比较, SLE 组患者 ESR、CRP、IgG、IgA、IgM 及血清 CA199、CA125 水平均明显升高, 补体 C3、C4 水平均明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 而血清 CEA、CA153 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 SLE 缓解期亚组比较, SLE 活动期亚组患者补体 C3、C4 水平显著下降, IgG、IgA、IgM、CA125、CA199 水平显著升高($P < 0.01$), 而 CEA、CA153 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。经 Pearson 检验, SLE 患者的 CA125、CA199、抗 dsDNA 抗体与 SLEDAI 评分均呈显著正相关($r = 0.479, 0.587, 0.664, P$ 均 < 0.01), 而 CEA、CA153 与 SLEDAI 无相关性($r = 0.258, 0.228, P > 0.05$)。**结论** SLE 患者血清 CA125、CA199 等肿瘤标记物水平均升高, 与病情活动性相关, 有助于 SLE 的诊断及疾病活动程度的判断。

【关键词】 系统性红斑狼疮; 肿瘤标记物; 疾病活动度

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.013

The value of tumor marker detection in assisting diagnosis of systemic lupus erythematosus Long Jie*, Wei Meng.*

Postgraduate School, Medical College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Corresponding author: Wei Meng, E-mail: weimengwm@sina.com

Funding program: Sichuan Province Bureau of Science and Technology Key Research Project(2018SZ0187)

【Abstract】Objective To investigate the diagnostic value of tumor markers CEA, CA125, CA199 and CA153 in systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** From July 2016 to December 2018, 89 patients with SLE admitted to the Kidney and rheumatology Department of the Western Theater general hospital were analyzed as SLE group. Then, according to SLEDAI, they were divided into 57 active SLE patients and 32 remission SLE patients. 100 cases of health examination matched by gender and age were included in the control group. Erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), serum CEA, CA125, CA199, CA153, immunological indexes (C3, C4, IgG, IgM, IGA) and anti dsDNA antibody were detected, Pearson method was used to analyze the correlation between tumor markers and SLEDAI score in patients with SLE, and to explore the clinical significance of serum tumor markers in the diagnosis and activity judgment of SLE. **Results** Compared with the healthy control group, the levels of ESR, CRP, IgG, IgA, IgM, serum CA199 and CA125 in SLE group were significantly higher, the levels of C3 and C4 were significantly lower, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), but the levels of CEA and CA153 in serum were not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the patients in the remission phase of SLE, the levels of C3 and C4 in the active phase of SLE decreased significantly, while the levels of IgG, IgA, IgM, CA125 and CA199 increased significantly ($P < 0.01$), while the levels of CEA and CA153 had no significant difference ($P > 0.05$). According to Pearson test, CA125, CA199 and anti dsDNA antibody were positively correlated with SLEDAI score ($r = 0.479, 0.587, 0.664, P < 0.01$), but not with CEA and CA153 ($r = 0.258, 0.228, P > 0.05$). **Conclusion** The levels of CA125, CA199 in serum of patients with SLE are increased, which is related to the activity of the disease. It is helpful for the diagnosis of SLE and the judgment of disease activity.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; Tumor markers; Disease activity

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种复杂的自身免疫性疾病,其临床特征具有多样性,与多种自身抗体、免疫复合物形成、沉积以及其他免疫过程相关^[1]。其免疫特征为慢性免疫激活和多种免疫表型,包括全身各器官系统,如皮肤、肌肉、骨骼系统、神经系统、血液系统、肾脏和浆膜等。因此, SLE 的诊断通常依赖于临床表现和免疫学相关检查^[2-3]。有研究发现 SLE、类风湿性关节炎或系统性硬化等患者会出现肿瘤标记物升高^[4-5]。肿瘤标志物是由恶性细胞产生的物质,可以用于癌症的诊断或随访,同时肿瘤标记物也具有免疫和炎性反应功能,可在炎症性疾病中增高^[6]。为验证肿瘤标志物水平与 SLE 活动性的相关性,本研究检测 SLE 患者癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA)、糖类抗原 125 (carbohydrate antigen 125, CA125)、CA 153 和 CA 199 的血清水平,分析上述标志物水平与 SLE 患者疾病活动性之间的相关性,探讨各肿瘤标志物对于 SLE 诊断及活动度的临床价值,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2016 年 7 月—2018 年 12 月西部战区总医院肾脏风湿科收治的 SLE 患者 89 例,其中男 20 例,女 69 例,平均年龄 (38.0 ± 10.0) 岁。全部患者均符合美国风湿病学会 (ACR) 修订的 SLE 分类标准^[7-8],并按 SLE 疾病活动指数 (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 判定患者疾病活动情况^[9]。根据 SLEDAI-2000 评分分为活动期亚组 (SLEDAI 评分 >4 分) 57 例和稳定期亚组 (SLEDAI 评分 $0 \sim 4$ 分) 32 例。纳入标准:符合 SLE 诊断标准,年龄 $20 \sim 49$ 岁;临床资料完整;遵医嘱服药,治疗过程中配合相关检查。排除标准:患有其他自身免疫性疾病;患有血液系统疾病,有恶性肿瘤病史;合并心、肺、肝、肾等器官功能障碍者;妊娠或哺乳期妇女;精神障碍不能正常交流者。选取同期于医院体检科健康体检者 100 例作为健康对照组,其中男 31 例,女 69 例,平均年龄 (36.0 ± 8.0) 岁。本研究经医院医学伦理委员会审核通过,全部受试者或其家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 检测指标与方法

1.2.1 红细胞沉降率 (ESR) 和血清 C 反应蛋白 (CRP) 测定 SLE 组患者于入院次日、健康对照组于体检当天采集空腹外周静脉血 1.6 ml 至 EDTA-K2 抗凝采血管中,混匀后垂直嵌在血沉架上,室温下置 1 小时,观察记录 ESR 测定结果。CRP 水平采用免疫荧光法检测,试剂盒购自广州阳普医疗科技股份有限公司,

全部操作按试剂盒说明进行。

1.2.2 血清补体和免疫球蛋白检测 抽取空腹肘静脉血 10 ml, $2\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 取上层血清,置 -70°C 低温下保存, 30 min 内送检,血清补体 (C3、C4) 和免疫球蛋白 (IgA、IgG、IgM) 水平采用免疫比浊法测定,试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供。采用免疫荧光法检测抗双链 DNA 抗体 (anti-double-stranded DNA antibody, 抗 dsDNA 抗体) 水平,试剂盒购自广州阳普医疗科技股份有限公司,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 血清 CEA、CA125、CA153、CA199 水平检测 空腹状态下采集外周静脉血 5 ml, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min。采用全自动电化学发光免疫分析仪 (北京迈润医疗医疗器械有限公司) 使用电化学发光法检测,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 SLEDAI-2000 评分方法 SLEDAI 评分方法是对 SLE 疾病活动程度评估的公认的方法。判断标准: $0 \sim 4$ 分基本无活动, $5 \sim 9$ 分轻度活动, $10 \sim 14$ 分中度活动, ≥ 15 分重度活动,其中 SLEDAI 评分 >4 分为 SLE 活动期;评分 $0 \sim 4$ 分为 SLE 稳定期。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两独立样本 t 检验;计数资料以频数或率 (%) 表示,采用 χ^2 检验;各变量间的相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较 SLE 组与健康对照组性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与健康对照组相比, SLE 组 ESR、CRP、IgG、IgA、IgM、CA125、CA199 水平均明显升高,补体 C3、C4 水平显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而 CEA、CA153 差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。SLE 活动期亚组 SLEDAI 评分为 (10.15 ± 3.16) 分, SLE 稳定期亚组 SLEDAI 评分为 (2.8 ± 0.9) 分。

2.2 SLE 患者不同亚组血清补体和免疫球蛋白比较 SLE 活动期亚组患者血清补体 C3 及 C4 水平较稳定期亚组明显降低,而血清免疫球蛋白 IgG、IgA 和 IgM 水平明显升高,差异有统计学意义 (P 均 < 0.01),见表 2。

2.3 SLE 患者不同亚组抗 dsDNA 抗体及肿瘤标志物水平比较 SLE 活动期亚组患者抗 dsDNA 抗体及 CA125、CA199 水平均显著高于 SLE 稳定期亚组患者,差异有统计学意义 (P 均 < 0.01);而 CEA 和 CA153 水平比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05),见表 3。

表 1 SLE 组与健康对照组临床资料比较

项 目	健康对照组 (<i>n</i> = 100)	SLE 组 (<i>n</i> = 89)	<i>t</i> / χ^2 值	<i>P</i> 值
性别(男/女)	31/69	20/69	1.738	0.187
年龄(岁)	36.12 ± 8.05	38.20 ± 10.01	1.520	0.187
ESR(mm/h)	12.10 ± 9.20	49.30 ± 18.40	17.860	0.000
CRP(mg/L)	6.60 ± 4.20	48.20 ± 11.70	33.230	0.000
补体 C3(g/L)	1.09 ± 0.38	0.77 ± 0.30	6.370	0.000
补体 C4(g/L)	0.39 ± 0.18	0.11 ± 0.09	13.270	0.000
IgG(mg/dl)	9.67 ± 2.43	19.01 ± 5.34	15.750	0.000
IgA(mg/dl)	1.26 ± 0.79	2.97 ± 0.68	7.022	0.000
IgM(mg/dl)	1.98 ± 0.05	1.03 ± 0.08	15.850	0.000
CEA(ng/ml)	2.50 ± 1.20	2.60 ± 2.70	0.330	0.970
CA125(U/ml)	8.40 ± 5.20	22.80 ± 12.10	10.830	0.000
CA153(U/ml)	20.60 ± 2.40	22.20 ± 12.30	1.270	0.210
CA199(U/ml)	12.10 ± 7.75	17.90 ± 11.20	4.170	0.000

2.4 SLE 患者肿瘤标志物与 SLEDAI 评分的相关性

经 Pearson 检验, SLE 患者的 CA125、CA199、抗 dsDNA 抗体与 SLEDAI 评分均呈显著正相关($r = 0.479$ 、 0.587 、 0.664 , P 均 < 0.01), 而 CEA、CA153 与 SLEDAI 评分无相关性($r = 0.258$ 、 0.228 , $P > 0.05$)。

3 讨 论

SLE 是一种常见的慢性自身免疫疾病, 可影响多个器官和组织。SLE 损伤不仅来自直接免疫介导的组织损伤, 还来自与 SLE 治疗相关的并发症^[10]。因此探索对 SLE 诊断及病情评估有帮助的实验室指标至关重要。自身免疫性疾病和肿瘤的发生有交叉存在的可能, 一些结缔组织疾病中恶性肿瘤的发病率可能会增加^[11]。此外, 慢性炎性反应可能导致肿瘤的发展, 抗原呈递过程的延长和淋巴细胞活化可能导致内源性共刺激因子的产生, 这种内源性信号传导可能与细胞的转化有关^[12-14]。因此, 自身免疫和慢性炎性反应可能导致肿瘤, 尤其是恶性血液病的发展。另一个重要方面是炎性细胞和肿瘤细胞可能共有几种细胞表面抗

原, 可在白细胞表面以及癌细胞中检测到。这些细胞表面脱落的肿瘤相关抗原以可溶形式出现, 并且很容易在患者的血清中检测到^[15-16]。有研究发现类风湿性关节炎中 CA125 和 CA199 产生增加^[17], 在 SLE 合并浆膜炎的患者中检测到血清可溶性 CA125 浓度升高^[18]。然而, 关于肿瘤相关抗原参与 SLE 相关性的研究较少。本研究通过比较 SLE 患者肿瘤标志物与健康对照组的差异, 表明肿瘤标志物表达水平对 SLE 诊断有辅助参考意义。

CEA 在炎性细胞如巨噬细胞和中性粒细胞的表面有增加的可能^[19]。本研究发现, SLE 患者 CEA 水平与健康对照组相比无明显差异。SLE 患者的血清 CEA 水平与 CA125、CA199、CA153 水平相关, 但与 SLE 疾病活动度 SLEDAI 评分无关。CA125 是黏蛋白家族的蛋白质, 在细胞黏附、增殖和凋亡中起作用。有研究描述了 SLE 患者腹腔积液出现 CA125 水平升高^[20], 且 CA125 与 SLE 浆膜炎的诊断有良好的相关性, 可以作为一种有用的血清标志物辅助诊断和监测系统性红斑狼疮浆膜炎^[18]。本研究发现 SLE 患者血清 CA125 水平明显升高, 并且与 SLEDAI 评分、抗 dsDNA 抗体明显相关, 可以辅助诊断 SLE 及疾病的活动度。CA 199 作为 E-选择蛋白配体起作用, 它参与癌细胞与内皮细胞的细胞黏附。炎性反应可以增加 CA199 的表达, 研究表明 SLE、系统性硬化症、炎性肌病等风湿性疾病可能会增加其水平^[21]。本研究中 SLE 患者 CA199 水平较健康对照组明显升高, 且与 SLE 的 SLEDAI 评分呈正相关性。CA153 是一种参与转移瘤细胞黏附和 T 细胞迁移的蛋白质^[22-23]。本研究发现, 与健康对照组比较, SLE 患者 CA153 水平差异无统计学意义。此外, 该标志物与 SLE 的 SLEDAI 评分亦未发现相关性。

表 2 SLE 患者不同亚组补体和血清免疫球蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	补体 C3(g/L)	补体 C4(g/L)	IgG(mg/dl)	IgA(mg/dl)	IgM(mg/dl)
SLE 稳定期亚组	32	0.83 ± 0.21	0.13 ± 0.07	18.22 ± 2.11	1.96 ± 0.68	1.39 ± 0.66
SLE 活动期亚组	57	0.33 ± 0.18	0.09 ± 0.04	21.53 ± 2.97	3.14 ± 0.65	2.16 ± 0.84
<i>t</i> 值		7.100	3.432	5.561	8.089	4.433
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 SLE 患者不同亚组患者抗 dsDNA 抗体及肿瘤标志物水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	抗 dsDNA 抗体(U/ml)	CEA(ng/ml)	CA125(U/ml)	CA153(U/ml)	CA199(U/ml)
SLE 稳定期亚组	32	52.10 ± 3.00	2.56 ± 1.44	15.43 ± 5.16	21.23 ± 9.54	15.90 ± 8.75
SLE 活动期亚组	57	75.60 ± 3.10	2.76 ± 1.76	24.55 ± 9.75	22.18 ± 10.23	21.22 ± 8.89
<i>t</i> 值		3.290	0.553	4.917	0.473	2.720
<i>P</i> 值		0.000	0.581	0.000	0.610	0.000

SLE 最重要的治疗目标之一为缓解患者全身症状及各器官表现,明确 SLE 缓解期对于狼疮的基础、临床流行病学研究、临床试验以及临床实践均至关重要^[24]。本研究发现血清免疫球蛋白、补体及 CA125 和 CA199 在 SLE 的活动期和缓解期差异明显,可辅助临床医师确定患者疾病的活动状态。

综上,SLE 患者肿瘤标志物有升高的可能,但这些标志物的升高并不一定表示存在肿瘤可能。在 SLE 患者中 CA125 和 CA199 水平可能出现较大幅度的升高,对 SLE 的诊断及疾病活动程度的判断有一定帮助,但尚需要进一步扩大样本进行临床研究及 RCT 研究证实。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

龙洁:设计研究方案,实施研究过程,分析试验数据,论文撰写;魏萌:资料搜集整理,进行统计学分析,论文修改

参考文献

- [1] Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European league against rheumatism/American college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(9):1400-1412.
- [2] Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management[J]. *J Autoimmun*, 2019, 96(1):1-13.
- [3] Durcan L, O'Dwyer T, Petri M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults[J]. *Lancet*, 2019, 393(10188):2332-2343.
- [4] Bevan J, Richardson M. Diminution of falsely elevated tumour markers following immunosuppression for systemic lupus erythematosus with neurological involvement[J]. *BMJ Case Rep*, 2016, 2016. bcr2016214549. DOI:10.1136/bcr-2016-214549.
- [5] Szekanecz E, Szucs G, Szekanecz Z, et al. Tumor-associated antigens in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus: associations with organ manifestations, immunolaboratory markers and disease activity indices[J]. *J Autoimmun*, 2008, 31(6):372-376. DOI:10.1016/j.jaut.2008.08.008.
- [6] Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(4):624-630. DOI:10.1093/clinchem/47.4.624
- [7] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1982, 25:1271-1277.
- [8] Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40:1725.
- [9] Romero-Diaz J, Isenberg D, Ramsey-Goldman R. Measures of adult systemic lupus erythematosus: updated version of British Isles Lupus Assessment Group (BILAG 2004), European Consensus Lupus Activity Measurements (ECLAM), Systemic Lupus Activity Measure, Revised (SLAM-R), Systemic Lupus Activity Questionnaire for Population Studies (SLAQ), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI) [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011, 63 Suppl 11:S37-46.
- [10] 陆前进, 罗帅寒天. 系统性红斑狼疮的诊疗进展[J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 54(1):1-4.
- [11] Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers[J]. *Med Princ Pract*, 2013, 22(1):4-11.
- [12] Gregory CD. Inflammation and cancer revisited: an hypothesis on the oncogenic potential of the apoptotic tumor cell[J]. *Autoimmunity*, 2013, 46(5):312-316.
- [13] 平利峰, 王晓磊, 孙凤艳, 等. 狼疮性肾炎患者血清自身免疫抗体水平变化及相关性研究[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(3):289-292. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.03.017.
- [14] 李敏, 郭毅飞, 龚丽, 等. 系统性红斑狼疮患者氧化低密度脂蛋白水平与颈动脉硬化关系分析[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(11):1256-1260. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2018.11.017.
- [15] Liu CC, Yang H, Zhang R, et al. Tumour-associated antigens and their anti-cancer applications[J]. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2017, 26(5):e12446.
- [16] 李婷婷. 系统性红斑狼疮发病机制的新视角——单基因狼疮[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(12):1395-1399. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2018.12.025.
- [17] Wang T, Zheng XJ, Ji YL, et al. Tumour markers in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(7):587-591.
- [18] Yang Z, Liang Y, Li C, et al. Serum CA125 elevation is independently associated with serositis in SLE patients[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2012, 30(1):93-98.
- [19] Hao C, Zhang G, Zhang L. Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162(3):213-227.
- [20] Basaran A, Zafer Tuncer S. Ascites is the primary cause of cancer antigen-125 (CA-125) elevation in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with nephrotic syndrome[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68(2):197-201.
- [21] Szekanecz Z, Szekanecz E, Bako G, et al. Malignancies in autoimmune rheumatic diseases: a mini-review[J]. *Gerontology*, 2011, 57(1):3-10.
- [22] Li X, Xu Y, Zhang L. Serum CA153 as biomarker for cancer and noncancer diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162(3):265-276.
- [23] Valerio Marzano A, Morabito A, Berti E, et al. Elevated circulating CA 15.3 levels in a subset of systemic sclerosis with severe lung involvement[J]. *Arch Dermatol*, 1998, 134(9):645.
- [24] van Vollenhoven R, Voskuyl A, Bertsias G, et al. A framework for remission in SLE: consensus findings from a large international task force on definitions of remission in SLE (DORIS) [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(3):554-561.

(收稿日期:2019-11-24)

红花黄色素联合倍他司汀对突发性耳聋患者听阈水平、血液流变学及血脂指标的影响

文科, 侯楠, 陈嘉

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(19ZDYF0944); 四川省教育厅创新团队与科研项目(16ZB0274)

作者单位: 610500 成都医学院第一附属医院耳鼻喉科

通信作者: 侯楠, E-mail: 110565888@qq.com

【摘要】目的 探讨红花黄色素联合倍他司汀对突发性耳聋患者听阈水平、血液流变学及血脂指标的影响。**方法** 选取 2018 年 1 月—2019 年 1 月成都医学院第一附属医院耳鼻喉科收治的突发性耳聋患者 118 例, 经随机数字表法分为对照组、研究组, 每组各 59 例。对照组患者接受倍他司汀治疗, 研究组患者接受红花黄色素联合倍他司汀治疗。治疗前后检测 2 组患者听阈水平及血液流变学指标(全血高切黏度、全血中切黏度、全血低切黏度)、血脂指标[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)]水平, 记录治疗期间药物相关不良反应的发生情况。**结果** 治疗 1 个月后, 研究组总有效率为 94.92%, 高于对照组的 81.36% ($\chi^2 = 5.187, P < 0.05$); 研究组治疗后听阈水平降低优于对照组 ($t = 13.539, P = 0.000$)。研究组治疗后全血高切黏度、全血中切黏度、全血低切黏度低于对照组 ($t = 4.071, 3.934, 7.681, P < 0.01$); 研究组治疗后外周血中 TG、TC、LDL-C 的水平低于对照组, HDL-C 水平高于对照组 ($t = 8.737, 4.082, 5.249, 7.231, P < 0.01$)。2 组患者治疗期间均未出现明显药物相关不良反应。**结论** 红花黄色素联合倍他司汀治疗突发性耳聋, 可有效改善患者听阈水平和调节患者血液流变学及血脂指标, 且用药安全性较好。

【关键词】 突发性耳聋; 红花黄色素; 听阈; 血液流变学; 血脂

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.014

Effect of carthamin yellow combined with betahistine on hearing threshold, hemorheology and blood lipid in patients with sudden deafness Wen Ke, Hou Nan, Chen Jia. Department of ENT, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Sichuan Province, Chengdu 610500, China

Corresponding author: Hou Nan, E-mail: 110565888@qq.com

Funding program: Key R & D Projects of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (19ZDYF0944); Innovation Team and Scientific Research Projects of Sichuan Provincial Department of Education (16ZB0274)

【Abstract】Objective To explore the effect of carthamin yellow combined with betahistine on hearing threshold, hemorheology and blood lipid in patients with sudden deafness. **Methods** One hundred and eighteen patients with sudden deafness were selected from the Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College from January 2018 to January 2019. Randomly divided into control group and study group, 59 cases in each group. Patients in the control group were treated with betahistine, while those in the study group were treated with carthamin yellow and betahistine. Before and after treatment, the hearing threshold level, hemorheology index (whole blood high shear viscosity, whole blood medium shear viscosity, whole blood low shear viscosity), blood lipid index (TG, TC, HDL-C, LDL-C) were measured, and the occurrence of drug-related adverse reactions was recorded. **Results** After one month of treatment, the total effective rate of the study group was 94.92%, higher than 81.36% of the control group ($\chi^2 = 5.187, P < 0.05$); the hearing threshold level of the study group was lower than that of the control group ($t = 13.539, P = 0.000$). After treatment, the whole blood high shear viscosity, middle shear viscosity and low shear viscosity in the study group were lower than those in the control group ($t = 4.071, 3.934, 7.681, P < 0.01$); the levels of TG, TC, LDL-C in the peripheral blood in the study group were lower than those in the control group, and the levels of HDL-C were higher than those in the control group ($t = 8.737, 4.082, 5.249, 7.231, P < 0.01$). No drug-related adverse reactions were found in the two groups. **Conclusion** Carthamin yellow combined with betahistine in the treatment of sudden deafness can effectively improve the hearing threshold level and regulate

the hemorheology and blood lipid index of patients, and the drug safety is well.

[Key words] Sudden deafness; Carthamin yellow; Auditory threshold; Hemorheology; Blood lipid

突发性耳聋是突发且病因不明的感音神经性听力损失,患者以听力下降为主要表现,可伴有耳鸣、眩晕、恶心、呕吐等不适感受^[1-2]。突发性耳聋的病因尚未完全明确,目前推测与病毒感染、循环障碍、自身免疫系统功能异常、膜迷路破裂等因素相关^[3]。目前西医治疗突发性耳聋的手段主要包括糖皮质激素、神经营养类药物、溶栓和抗凝药物等,倍他司汀是一种血管扩张剂,用于美尼尔综合征、血管性头痛等治疗,其用于突发性耳聋的治疗可一定程度上减轻患者不适感受并优化听力,但存在疗效局限性^[4],如何打破西医治疗的局限性、提高患者的临床获益是当下研究的热点。红花黄色素是从红花花瓣中提取出的天然黄色素,属于国家级新药,具有调节微循环等多种作用,已经被证实高血压肾病、缺血性心肌病、急性脑卒中等心脑血管疾病的治疗中获得成功应用^[5-7]。突发性耳聋的出现可能与局部微循环异常相关,故推测红花黄色素在该病治疗中也具有一定作用,但目前相关研究开展有限。本研究将红花黄色素联合倍他司汀用于突发性耳聋的治疗,以期明确该联合治疗的有效性及其可行性,并为日后临床治疗方案的制定提供新选择,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月—2019 年 1 月成都医学院第一附属医院耳鼻喉科收治的突发性耳聋患者 118 例作为研究对象。纳入标准:(1)参照“突发性聋诊断和治疗指南(2015)”^[8]确诊,突然耳聋、耳鸣、眩晕等,查体未见鼓膜病变,音叉试验提示感音神经性聋;(2)既往听力良好;(3)年龄 ≥ 18 周岁;(4)心、肝、肾等重要脏器功能基本正常;(5)认知功能正常,可配合相关检查。排除标准:(1)合并其他可能影响听力的耳部疾病;(2)合并颅脑肿瘤;(3)入组前 1 个月内进行过降脂和抗凝治疗;(4)对红花黄色素、倍他司汀严重过敏反应。参照随机数字表法将入组患者分为对照组、研究组,每组各 59 例。对照组男 30 例,女 29 例,年龄 32 ~ 58 (38.92 $\pm$ 4.61) 岁;病程 1 ~ 14 (4.28 $\pm$ 0.61) d;位置,单侧 50 例,双侧 9 例。研究组男 29 例,女 30 例,年龄 30 ~ 57 (38.71 $\pm$ 4.75) 岁;病程 2 ~ 13 (4.19 $\pm$ 0.52) d;位置,单侧 49 例,双侧 10 例。2 组患者基础资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究已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 治疗方法 2 组患者均常规接受地塞米松、维生

素 B₁、维生素 B₂ 治疗,对照组患者在此基础上加入倍他司汀治疗,具体如下:倍他司汀(卫材药业有限公司生产)口服,6 mg/次,3 次/d,治疗 1 个月后评估疗效。研究组患者在常规治疗基础上接受红花黄色素联合倍他司汀治疗,注射用红花黄色素(浙江永宁药业股份有限公司生产)150 mg 加入生理盐水 250 ml 中,静脉滴注,1 次/d,以 10 d 为 1 疗程,治疗 1 个月后评估疗效。倍他司汀用法用量同对照组患者。

1.3 疗效评估 治疗后对疗效进行评价^[8],患耳听阈恢复至发病前水平或正常范围,或达健耳水平为痊愈;患耳受损频率听力提高 > 30 dB 为显效;患耳受损频率听力提高 15 ~ 30 dB 为有效;患耳受损频率听力提高 < 15 dB 为无效。总有效率 = (痊愈 + 显效 + 有效) / 总例数 $\times 100\%$ 。

1.4 观察指标与方法 (1)纯音听阈水平:治疗前后,采用北京必拓必达 TD-5000 纯音听力计测定 2 组患者的纯音听阈水平。(2)血黏度和血脂指标检测:留取 2 组患者空腹肘静脉血标本,采用普利生 lby-n6compact 全自动血液流变仪测定血黏度,包括全血高切黏度、全血中切黏度、全血低切黏度;采用雅培 c16000 全自动生化分析仪测定三酰甘油(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)水平。

1.5 药物不良反应 治疗期间,记录 2 组患者药物不良反应发生情况,包括皮疹、恶心呕吐、腹泻便秘、心律失常、休克等。

1.6 统计学方法 使用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。计数资料用频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;等级资料的组间比较采用 U 检验;符合正态分布计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组近期疗效比较 治疗 1 个月后,研究组患者的治疗总有效率高干对照组患者,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.187, P < 0.05$),见表 1。

2.2 2 组纯音听阈水平比较 治疗前对照组患者听阈为(88.93 $\pm$ 5.12) dB,研究组为(89.11 $\pm$ 5.36) dB,2 组治疗前听阈水平比较差异无统计学意义($t = 0.187, P = 0.426$)。治疗后对照组患者听阈为(70.16 $\pm$ 5.74) dB,研究组为(55.28 $\pm$ 6.19) dB,治疗后 2 组听阈水平均低于治疗前($t/P = 18.744/0.000, 31.735/$

0.000), 且研究组优于对照组 ($t = 13.539, P = 0.000$)。

2.3 2 组血液流变学指标比较 2 组患者治疗前各血液流变学指标水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。2 组患者治疗后各血液流变学指标水平均低于治疗前, 且研究组低于对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 2 组患者治疗前后血液流变学指标水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mPa} \cdot \text{s}$)

组别	时间	全血高切黏度	全血中切黏度	全血低切黏度
对照组 ($n = 59$)	治疗前	4.93 ± 0.67	6.04 ± 0.67	10.74 ± 1.68
	治疗后	4.68 ± 0.54	5.28 ± 0.72	8.95 ± 0.92
研究组 ($n = 59$)	治疗前	4.91 ± 0.63	6.02 ± 0.71	10.69 ± 1.77
	治疗后	4.26 ± 0.58	4.79 ± 0.63	7.67 ± 0.89
t/P 对照组内值		2.232/0.014	5.936/0.000	7.178/0.000
t/P 研究组内值		5.830/0.000	9.953/0.000	11.709/0.000
t/P 治疗后组间值		4.071/0.000	3.934/0.000	7.681/0.000

2.4 2 组血脂指标比较 2 组患者治疗前血脂水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。2 组患者治疗后 TG、TC、LDL-C 水平低于治疗前, HDL-C 水平高于治疗前, 且研究组患者治疗后血脂水平优于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.5 2 组药物不良反应比较 治疗期间, 2 组患者均无明显不良反应发生。

3 讨论

突发性耳聋的发病机制未明, 故其最佳治疗方法也无定论, 但改善局部微循环被认为是该病治疗的重要环节之一。倍他司汀对心脑血管具有明显的扩张作用, 对耳蜗及前底血流量的增加作用十分明显, 同时可

增加毛细血管通透性, 促进细胞外液吸收。阿不都许库尔·吾买尔等^[4]研究表明, 倍他司汀在突发性耳聋治疗中具有积极作用, 但单药治疗的有效率在 75% 左右, 存在一定局限性。红花黄色素具有扩张冠状动脉及周围血管、抑制血栓形成、降低血浆黏度及抗氧化等作用, 已试用于突发性耳聋的治疗且疗效满意^[9-10], 但关于该药物的具体作用机制等涉及不多。笔者将红花黄色素用于治疗突发性耳聋患者, 发现研究组总有效率较对照组有一定提升, 与既往研究结果吻合^[11], 说明红花黄色素是治疗突发性耳聋的有效药物。突发性耳聋患者存在纯音听阈水平的迅速升高, 且升高程度与病情严重程度一致, 研究组患者治疗后的听阈水平较治疗前下降且低于对照组患者, 进而量化佐证该药物治疗的有效性。

血液流变学多用于评估机体微循环状态, 有研究指出^[12-14], 突发性耳聋发生与患者血液流变学状态改变相关, 当血液黏度增加时机体循环阻力上升、血液流动速度减慢, 导致耳内微循环灌注量减少并出现缺血缺氧, 影响耳蜗等听力器官的正常功能。本研究 2 组患者经治疗后血液流变学指标均发生明显改变, 说明血液黏度的增加可能是疾病发生的重要因素之一。同时治疗后研究组患者各指标水平下降更为显著, 一方面说明红花黄色素在优化机体微循环方面的积极作用, 与其药理作用吻合, 另一方面提示红花黄色素可能通过改善微循环而发挥突发性耳聋的治疗作用^[15-16]。红花黄色素降低血黏度的作用与其扩血管作用直接相关, 通过降低细胞外钙离子内流而抑制氯化钾、肾上腺素对血管内皮的收缩作用, 从而扩张血管、增加器官

表 1 2 组患者近期疗效比较 [例(%)]

组别	例数	痊愈	显效	有效	无效	总有效率(%)
对照组	59	10(16.94)	15(25.42)	23(30.00)	11(18.64)	81.36
研究组	59	18(30.51)	22(37.29)	16(27.12)	3(5.08)	94.92
U/χ^2 值			$U = 9.438$			$\chi^2 = 5.187$
P 值			0.024			0.023

表 3 2 组患者治疗前后血脂指标水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别	时间	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照组 ($n = 59$)	治疗前	1.93 ± 0.26	5.30 ± 0.61	1.21 ± 0.16	3.61 ± 0.45
	治疗后	1.60 ± 0.19	4.72 ± 0.57	1.40 ± 0.17	2.75 ± 0.38
研究组 ($n = 59$)	治疗前	1.92 ± 0.24	5.27 ± 0.63	1.20 ± 0.18	3.58 ± 0.43
	治疗后	1.31 ± 0.17	4.31 ± 0.52	1.59 ± 0.22	2.30 ± 0.29
t/P 对照组内值		7.871/0.000	5.336/0.000	6.251/0.000	11.216/0.000
t/P 研究组内值		15.931/0.000	9.027/0.000	10.539/0.000	18.957/0.000
t/P 治疗后组间值		8.737/0.000	4.082/0.000	5.249/0.000	7.231/0.000

血供^[17-18]。

血脂水平也是影响机体微循环的重要环节之一,血脂水平增加可直接导致血黏度升高、血流速度减缓,是血管内堵塞及血栓形成的关键因素之一。研究发现^[19-21],很大一部分耳聋患者存在血管堵塞并使血管内皮损伤,进一步阻滞内耳微循环。本研究中 2 组患者经治疗后血脂水平均得到不同程度的改善,这与倍他司汀的作用密不可分,但研究组患者在加入红花黄色素治疗后 TG、TC、LDL-C 水平进一步下降,而 HDL-C 水平进一步上升,说明红花黄色素在调节血脂方面也有积极作用,与徐智^[22]研究结果相似。

本研究中 2 组患者治疗期间均未出现明显不良反应,可见用药安全性较好。综上,红花黄色素联合倍他司汀应用于突发性耳聋的治疗,可有效提升疗效,具体作用机制与该药调节机体血液流变学、血脂水平等相关。本研究并未涉及红花黄色素发挥药效的具体机制,有待后续开展基础实验进一步深入明确。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

文科:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;侯楠:提出研究思路,论文审核;陈嘉:参与撰写,进行统计学分析

参考文献

- [1] Bing D, Wang DY, Lan L, et al. Serum bilirubin level as a potential marker for the hearing outcome in severe-profound bilateral sudden deafness[J]. *Otol Neurotol*, 2019, 40(6): 728-735. DOI:10.1097/MAO.0000000000002287.
- [2] 刘岩,田彦静,许尧生,等. 突发性耳聋患者焦虑抑郁状况及其影响因素分析[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(5): 933-937. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.031.
- [3] 吴旋,刘敏,陈垲钿,等. 伴眩晕的突发性聋患者临床特征与病因分析[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(28): 2197-2202. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.28.009.
- [4] 阿不都许库尔·吾买尔,王祥升,姜蕊蕊. 银杏叶提取物注射液联合倍他司汀治疗突发性耳聋的疗效观察[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(10): 2677-2680. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.10.046.
- [5] 黄培华,余佩芝,刘文星,等. 红花黄色素注射液治疗早期高血压肾病的临床观察[J]. *数理医药学杂志*, 2019, 32(1): 78-80. DOI:10.3969/j.issn.1004-4337.2019.01.038.
- [6] 孙政,李海新,陈建强. 红花黄色素联合磷酸肌酸治疗缺血性心肌病的临床效果[J]. *实用临床医学*, 2019, 20(2): 4-5. DOI: 10.1374/j.cnki.lcsy.2019.02.002.
- [7] 毛士明,曹金强,汪万国. 红花黄色素治疗急性脑卒中的效果及对凝血-纤溶系统和血清 FIB 水平的影响[J]. *河北医药*, 2019, 41(14): 2157-2160. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2019.14.018.
- [8] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会. 突发性聋诊断和治疗指南(2015)[J]. *中华*

耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 50(6): 443-447. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2015.06.002.

- [9] 张炜,贾国章,杨斌,等. 红花黄色素联合长春西汀对突发性耳聋疗效及血清 CRP 和 NO 的影响[J]. *贵州医药*, 2018, 42(7): 819-822. DOI:10.3969/j.issn.1000-744X.2018.07.019.
- [10] 刘晓斌,马俊杰,郝少君,等. 耳复康口服液治疗突发性耳聋 150 例[J]. *河南中医*, 2019, 39(1): 110-112. DOI:10.16367/j.issn.1003-5028.2019.01.0027.
- [11] Becatti M, Marcucci R, Mannucci A, et al. Erythrocyte membrane fluidity alterations in sudden sensorineural hearing loss patients: The role of oxidative stress[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(12): 2334-2345. DOI:10.1160/TH17-05-0356.
- [12] Mutlu A, Cam I, Dasli S, et al. Doppler ultrasonography can be useful to determine the etiology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2018, 45(3): 456-460. DOI:10.1016/j.anl.2017.08.013.
- [13] Salvago P, Rizzo S, Bianco A, et al. Sudden sensorineural hearing loss: Is there a relationship between routine haematological parameters and audiogram shapes[J]. *Int J Audiol*, 2017, 56(3): 148-153. DOI:10.1080/14992027.2016.1236418.
- [14] 邹礼军. 红花注射液的临床应用研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17(5): 718-720. DOI:10.14009/j.issn.1672-2124.2017.05.050.
- [15] 李树铁,于慧丹,姜伟,等. 小剂量肝素钠联合红花黄色素对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者机械通气时间和呼吸机相关性肺炎发生率及脱机后住院时间的影响[J]. *中国医药*, 2019, 14(2): 212-214. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2019.02.013.
- [16] 刘晶晶,卢丽,胡凤琪,等. 红花黄色素对早期 2 型糖尿病肾病患者胰岛素抵抗和血液高凝状态的影响[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(8): 805-808. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.08.012.
- [17] 黄明丽,宋慧鹏,庞汉青,等. 红花黄色素类化合物的药代动力学研究进展[J]. *药学与临床研究*, 2018, 26(4): 287-290. DOI: 10.13664/j.cnki.pcr.2018.04.012.
- [18] Kaneva AM, Yanov YK, Bojko SG, et al. The atherogenic index (ATH index) as a potential predictive marker of idiopathic sudden sensorineural hearing loss: A case control study[J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 64. DOI:10.1186/s12944-019-1016-5.
- [19] 房娟. 龙胆泻肝汤联合前列地尔对突发性耳聋患者血清内皮素、一氧化氮、超氧化物歧化酶、可溶性血管细胞黏附分子水平的影响[J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(13): 1575-1577. DOI:10.3969/j.issn.0253-9926.2019.13.018.
- [20] 王洪桥,周洁信,毋玉元,等. 阿加曲班序贯疗法结合红花黄色素治疗老年多发性腔隙性脑梗死的效果[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(35): 74-77, 81.
- [21] 傅桥菲,肖秀英,罗云,等. 红花黄色素联合丹参多酚酸盐治疗急性脑梗死的临床研究[J]. *中国现代医生*, 2018, 56(23): 110-113.
- [22] 徐智. 注射用红花黄色素治疗心血瘀阻证冠心病心绞痛患者的临床观察[J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(1): 34-36. DOI:10.14035/j.cnki.hljyy.2018.01.014.

(收稿日期:2019-11-27)

SIX1 和 TGF- β 对原代人喉鳞癌细胞上皮-间质转化的影响

张继华, 董凯峰, 苏静, 李丹, 田君海

基金项目: 河北省科学技术计划项目 (162777262)

作者单位: 050031 石家庄, 河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科

通信作者: 田君海, E-mail: 2089259496@qq.com

【摘要】目的 探讨原代培养的人喉鳞癌细胞中 SIX1 和转化生长因子- β (TGF- β) 共同作用对上皮-间质转化(EMT)的影响及相关机制。**方法** 收集 2016 年 1 月—2018 年 1 月于河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科行喉鳞癌手术患者 21 例,均留存切除组织,并对其进行人喉鳞癌原代细胞培养,制备 SIX1、TGF- β 及 SIX1 + TGF- β 靶向 siRNA,并转染至原代人喉鳞癌细胞,成功转染后分 5 组,即未转染组、空转组、SIX1 转染组、TGF- β 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组。应用免疫组化荧光法及蛋白印记 Western-blot 法检测细胞中 SIX1、TGF- β 及上皮标志物 E-cadherin 的蛋白表达。PCR 方法检测各组细胞中 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin mRNA 表达。**结果** 与未转染组比较,空转组细胞中 SIX1、TGF- β 、E-cadherin mRNA 及蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),SIX1 转染组、TGF- β 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组 E-cadherin 蛋白及 mRNA 表达均上调,差异均有统计学意义 ($F/P = 6.846/0.006, 13.396/0.000, 9.673/0.000$)。SIX1 转染组、TGF- β 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组 3 组比较,E-cadherin mRNA 及其蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 人喉鳞癌细胞上皮-间质转化呈 SIX1 及 TGF- β 依赖性。SIX1 和 TGF- β 共同作用可能是人喉鳞癌细胞上皮-间质转化的关键;SIX1 和 TGF- β 是人喉鳞癌细胞转移潜能的重要标志。

【关键词】 上皮-间质转化;SIX1; 转化生长因子- β ;人喉鳞癌细胞

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.015

Effect of SIX1 and TGF- β on epithelial-mesenchymal transition in the human laryngeal squamous cell of primary cultured Zhang Jihua, Dong Kaifeng, Su Jing, Li Dan, Tian Junhai. Department of Otolaryngology, The First Hospital of Hebei Medical University, Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China

Corresponding author: Tian Junhai. E-mail: 2089259496@qq.com

Funding program: Hebei Science and Technology Plan Program (162777262)

【Abstract】Objective To investigate the effects of SIX1 and TGF- β on epithelial-mesenchymal transition(EMT) and related mechanisms in the human laryngeal squamous cell of Primary culture. **Methods** 21 patients operated at the First Hospital of Hebei Medical University from January 2016 to January 2018. The human laryngeal squamous cell carcinoma tissue was preserved during surgery. Primary laryngeal squamous carcinoma cell culture was performed in vitro. Preparation SIX1-siRNA, TGF- β -siRNA for transfecting into laryngeal squamous cell carcinoma, after successfully transfected, cells were divided into five groups, un-transfected, empty vector, SIX1 transfected, TGF- β transfected and SIX1 + TGF- β transfected. The protein expression of SIX1, TGF- β , and E cadherin was determined by Western blotting and immunohistochemistry. The mRNA of SIX1, TGF- β , and E cadherin was determined by PCR. **Results** Compared with the un-transfected group, all of SIX1, TGF- β , E cadherin protein and mRNA expression in empty vector group had no difference ($P > 0.05$), and the protein and mRNA expression in SIX1 transfected, TGF- β transfected and SIX1 + TGF- β transfected group all show an up-regulated ($F/P = 6.846/0.006, F/P = 13.396/0.000$). Among SIX1 transfected, TGF- β transfected and SIX1 + TGF- β transfected group, the expression of E cadherin mRNA and protein had no obvious change, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Laryngeal squamous cell carcinoma EMT is SIX1 and TGF- β dependent. The interaction of SIX1 with TGF- β may be the key to EMT in human laryngeal squamous cell carcinoma cells. SIX1 and TGF- β are an important marker of the metastatic potential of human laryngeal squamous cell carcinoma.

【Key words】 Epithelial-mesenchymal transition; SIX1; TGF- β ; Human laryngeal squamous cell

大量实验显示,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在诱导恶性肿瘤局部浸润和远处转移过程中起着不可替代的作用。这一过程是由多个信号传导途径触发和调控的,这些信号途径能够对细胞外的刺激产生应答而激活。在这些传导途径中,转化生长因子- β (TGF- β)途径被认为是最重要的途径之一^[1-2]。以往研究表明,SIX1 同 TGF- β 相互作用能够促进多种恶性肿瘤细胞淋巴结转移^[3],推测 SIX1 及 TGF- β 在喉鳞癌细胞中表达的变化,会进一步影响肿瘤细胞上皮-间质转化的过程,进而影响喉癌的转移,但它们之间的相互作用机制及对喉癌细胞 EMT 的影响尚未见报道。本研究通过原代细胞培养,对喉鳞癌细胞中 SIX1、TGF- β 及上皮标志物 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达进行了检测,旨在探讨人喉鳞癌细胞上皮-间质转化过程中 SIX1 和 TGF- β 的相互作用及机制,为临床诊治提供理论依据,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)试剂试药:SIX1 免疫组化用多克隆抗体(工作浓度为 1:75)、TGF- β 免疫组化用多克隆抗体(工作浓度为 1:55)由武汉博士德公司提供, E-cadherin 免疫组化用多克隆抗体(工作浓度为 1:50)由北京奥维亚生物技术有限公司提供,免疫组化用 S-P 染色试剂盒、DAB 显色用试剂由北京中杉金桥公司提供。转染用 SIX1 和 TGF- β 试剂盒由美国 Invitrogen 公司提供。胎牛血清(购自杭州四季青生物材料研究所)置于 -20℃ 冰箱低温保存备用。胰蛋白酶(购自 GIBCO 公司,北京邦定生物医学公司分装)。用 D-hank's 液配成 0.25% 溶液,无菌条件下滤过孔径 0.22 μm 的混合纤维素微孔滤膜,无菌分装后, -20℃ 冰箱低温保存备用。硫酸庆大霉素注射液(辅仁药业有限公司)。(2)仪器设备: MCO175 型二氧化碳培养箱(日本三洋产品)。CX-PC-2 型倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代细胞培养:收集 2016 年 1 月—2018 年 1 月河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科行喉鳞状细胞癌手术患者 21 例,均留存切除组织,置于 4℃ 的 0.9% 氯化钠注射液中无菌保存。部分组织块尽快转移至实验室超净台,进行处理并原代细胞培养,修剪留取新鲜、正常肿瘤组织,庆大霉素杀菌处理 15 min,0.9% 氯化钠注射液冲洗 2 次,将组织块剪碎(初步使组织块分离成单细胞),庆大霉素液冲洗 2 次,0.9% 氯化钠注射液冲洗 2 次,加入 I 型胶原酶消化 1 h,每间隔 10 min 进行一次吹打混合,促进喉癌组织块分解成单个

肿瘤细胞。消化结束后,生理盐水冲洗细胞混合液 2 次,加入细胞培养液,内含 20% 胎牛血清,将细胞悬液接种于 6 孔灭菌细胞培养板,上述接种的细胞转移至培养箱,常规培养 48 h。取出培养板,培养孔内加入消化用胰蛋白酶,利用杂质细胞(成纤维细胞为主)与喉鳞癌肿瘤细胞对胰蛋白酶消化作用不同,而出现不同细胞脱离培养板底壁时间差异,去除杂质细胞。反复进行上述纯化,直至得到纯化的肿瘤细胞。待其稳定传代后,对培养细胞进行鉴定并确认为鳞状细胞癌细胞(由 2 名高年资病理科医生共同鉴定),扩增细胞,进行试验。

1.2.2 原代细胞转染及分组:待细胞生化稳定后,制作 SIX1 siRNA、TGF- β siRNA 和 SIX1 + TGF- β siRNA, siRNA 转染至原代人喉癌细胞,沉默细胞内的 SIX1、TGF- β 及 SIX1 + TGF- β 基因表达。具体步骤如下,接种原代人喉鳞癌细胞至 6 孔细胞培养板,每孔肿瘤细胞量约为 3×10^5 个,每孔内加入细胞培养液约 2 ml,放于培养箱,常规培养过夜。观察细胞生长状态,单层细胞量约 60% 汇合时进行试验。A 溶液配制(用于转染的纯 DNA 2 μg 加入不含血清培养液中,最终体积约 100 μl),B 溶液(LipofectAMINE 100 μl ,加入不含血清培养液中,最终体积 120 μl),混合 A 和 B 2 种溶液,轻摇匀,室温下放置 30 min。用细胞培养液 2 ml 轻洗涤肿瘤细胞,培养孔内加入细胞培养液(不含血清)0.8 ml,加入上述复合物,轻轻摇动混匀混合液,转移至细胞培养箱,常规孵育 24 h。用完全细胞培养基替换孔内转染液,继续培养 48 h,PCR 法对 SIX1、TGF- β 及 SIX1 + TGF- β 表达检测,检测确定转染成功后分组:未转染组、空转组、SIX1 转染组、TGF- β 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 免疫细胞化学法检测 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin 蛋白表达:消化原代人喉鳞状细胞癌细胞,用细胞培养液配制细胞悬液,使其浓度为 1×10^5 个/ml,取 24 孔细胞培养板,板内置已灭菌玻璃片,每组设 6 孔,向孔内灭菌玻璃片上接种肿瘤细胞,每孔接种上述细胞悬液 1 滴。细胞移至细胞培养箱,常规培养 4 h,倒置显微镜下观察细胞贴壁情况,待玻璃片上 >80% 细胞已经贴壁,向培养板内加 DMEM 培养液每孔约 1 ml。培养箱中培养 48 h,培养板内肿瘤细胞已达 80% ~ 90% 汇合,取出培养板,PBS 溶液冲洗 1 次,甲醛溶液固定 10 min,PBS 溶液冲洗 2 次,每次 5 min。留取玻璃片上爬片细胞,参照免疫组化试剂说明,进行爬片细胞免疫荧光染色,盖玻片封存,镜检。

结果判断。采用半定量双评分法,倒置荧光显微镜高倍镜视野下根据阳性细胞所占比例及细胞绿色荧光强度做综合判定。高倍镜下视野内阳性细胞比例:阳性细胞比例 < 25%, 记 0 分; 阳性细胞比例 25% ~ 50%, 记 1 分; 阳性细胞比例 51% ~ 75%, 记 2 分; 阳性细胞比例 > 75%, 记 3 分。表达强度评分标准, 未见荧光或仅见极弱荧光, 记 0 分; 荧光微弱但明显可见, 记 1 分; 荧光可见且光色明亮, 记 2 分; 荧光可见且光色闪亮, 记 3 分。2 种方法所得评分相加为总分, 得分 0 ~ 1 分为目的蛋白阴性 (-); 2 分为目的蛋白弱阳性 (+); 3 ~ 4 分为目的蛋白阳性 (++) , 5 ~ 6 分为目的蛋白强阳性 (+++)。

1.3.2 Western-blot 法检测肿瘤细胞内 SIX1、TGF- β 、E-cadherin 蛋白表达: 参照试剂说明书, 提取样本蛋白, 制备 Western-blot 检测样品, 检测各组样品蛋白浓度, 常规上样, 配制选用 12% 分离胶及 4% 浓缩胶, 每组样品上样量 65 μ g, 同时设置 Marker 预染蛋白, 100 V 电泳约 85 min, 转膜 30 V, 0.9 mA 过夜。洗膜, 定影后进行图像分析。

1.3.3 RT-PCR 法测定各组肿瘤细胞 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin mRNA; Trizol 法提取样本肿瘤细胞总 RNA, 检测各组样本细胞浓度, 确定样本细胞 RNA 完整, cDNA 反转录合成, 取转录产物 2 μ l 进行 PCR 反应。GAPDH 引物序列上游 5'-GACAGTCAGCCGCATCT-TCT-3', 下游 5'-TTAAAAGCAGCCCTGCTGAC-3; SIX1 引物序列上游 5'-CCACTAGAAGAGGAATT-3', 下游 5'-CACGCCGAGCCAAACT-3', 产物大小 254 bp, 退火温度 56.3 $^{\circ}$ C; TGF- β 引物序列上游 5'-CTGTAATTCT-GCTGTAATA-3', 下游 5'-GGCTTAGTATTCTGGGAAA-3', 产物大小 287 bp, 退火温度 54.2 $^{\circ}$ C; E-cadherin 引物序列上游 5'-AGGCCAAGCAGCAGTACATT-3', 下游 5'-ATTCACATCCAGCACATCCA-3, 产物大小为 288 bp, 退火温度为 56.6 $^{\circ}$ C。反应条件如下, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,

57 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 75 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共设计 32 个循环, 最后设计 75 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 GAPDH 的荧光表达量度作为检测基因表达参照量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 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, 多组比较采用方差分析, 多组间两两比较采用 q 检验; 计数资料以频数或率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验。变量间关系采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学法检测各组人喉鳞癌细胞 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin 蛋白表达比较 与未转染组比较, 空转组细胞中 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与未转染组比较, SIX1 转染组 SIX1 蛋白表达明显下调, TGF- β 蛋白表达无明显差异; TGF- β 转染组 TGF- β 蛋白表达明显下调, SIX1 蛋白表达无明显差异; SIX1 + TGF- β 转染组 SIX1 蛋白及 TGF- β 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.01$)。与未转染组比较, SIX1 转染组、TGF- β 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组 E-cadherin 蛋白表达均上调, 差异均有统计学意义 ($F/P = 6.846/0.006$)。TGF- β 转染组、SIX1 转染组及 SIX1 + TGF- β 转染组比较, E-cadherin 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1、表 1。

表 1 免疫细胞化学法检测各组细胞 SIX1、TGF- β 及 E-cadherin 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	SIX1	TGF- β	E-cadherin
未转染组	3.511 $\pm$ 0.068	3.240 $\pm$ 0.779	3.256 $\pm$ 0.215
空转组	3.459 $\pm$ 0.608	3.903 $\pm$ 0.658	3.575 $\pm$ 0.357
SIX1 转染组	1.653 $\pm$ 0.648	3.264 $\pm$ 0.326	6.831 $\pm$ 0.287
TGF- β 转染组	3.562 $\pm$ 0.878	1.568 $\pm$ 0.873	6.597 $\pm$ 0.389
SIX1 + TGF- β 转染组	1.246 $\pm$ 0.989	1.665 $\pm$ 0.738	6.580 $\pm$ 0.732
F/P 值	6.042/0.017	5.652/0.023	6.846/0.006

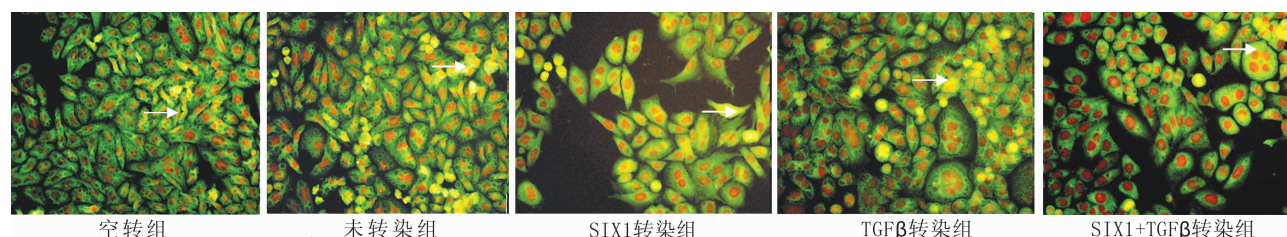


图 1 各组喉鳞癌细胞中 E-cadherin 表达情况 (免疫荧光染色, $\times 100$)

2.2 Western-blot 法检测各组人喉鳞癌细胞 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin 蛋白表达比较 与未转染组比较,空转组细胞中 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin 蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。与未转染组比较,SIX1 转染组 SIX1 蛋白表达明显下调,TGF-β 蛋白表达无明显差异;TGF-β 转染组 TGF-β 蛋白表达明显下调,SIX1 蛋白表达无明显差异;SIX1 + TGF-β 转染组 SIX1 蛋白及 TGF-β 蛋白表达均明显下调($P<0.01$)。与未转染组比较,SIX1 转染组、TGF-β 转染组及 SIX1 + TGF-β 转染组 E-cadherin 蛋白表达均上调,差异有统计学意义($F/P=13.396/0.000$),TGF-β 转染组、SIX1 转染组及 SIX1 + TGF-β 转染组比较,E-cadherin 蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.3 RT-PCR 法测定各组人喉鳞癌细胞 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin mRNA 表达水平比较 与未转染组比较,空转组细胞中 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin mRNA 表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。与未转染组比较,SIX1 转染组 SIX1 mRNA 表达明显下调,TGF-β mRNA 表达无明显差异;TGF-β 转染组 TGF-β mRNA 表达明显下调,SIX1 mRNA 表达无明显差异;SIX1 + TGF-β 转染组 SIX1 mRNA 及 TGF-β mRNA 表达均明显下调($P<0.01$)。与未转染组比较,SIX1 转染组、TGF-β 转染组及 SIX1 + TGF-β 转染组 E-cadherin mRNA 表达均上调,差异有统计学意义($F/P=9.673/0.000$),TGF-β 转染组、SIX1 转染组及 SIX1 + TGF-β 转染组比较,E-cadherin mRNA 表达量差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、表 3。

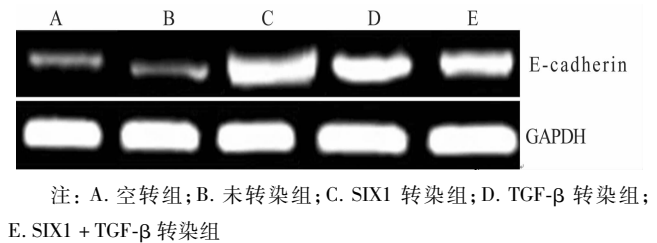


图 2 E-cadherin mRNA 在各组人喉鳞癌细胞中的表达情况

3 讨论

上皮-间质转化(EMT)是指肿瘤上皮细胞在一定的环境及相应转化因子等因素共同影响下逐步转变成充质细胞的现象。目前多数学者认为,EMT 是恶性肿瘤生长、转变的过程之一,与恶性肿瘤细胞的局部浸润及远处淋巴结转移紧密相关。EMT 转化的过程主要表现为原肿瘤上皮细胞极性逐渐消失,上皮细胞与周围其他细胞的接触相应减少,细胞间的连接包括黏附连接及紧密连接减少,使得细胞脱离的机会增加,易于发生局部浸润及远处迁移;EMT 的发生会出现原有上皮细胞表型的转变,其上皮表型如 E-cadherin、角蛋白丝等消失,间质表型纤维连接蛋白、N-钙黏素等逐渐形成。其中代表细胞间黏附力的 E-cadherin 表达下降是 EMT 的主要表现,也被视为 EMT 转化的标志^[4]。实验研究表明,EMT 与肿瘤细胞向局部浸润和淋巴转移的过程密切相关,EMT 可诱导多种恶性肿瘤细胞局部浸润和淋巴转移,如卵巢癌、肝癌、结肠癌及恶性黑色素瘤等^[5-8]。因此,EMT 被认为是多种上皮来源肿瘤转移潜能的标志。

表 2 Western-blot 法检测各组细胞 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	SIX1	TGF-β	E-cadherin
未转染组	1 556.578 ± 87.549	1 623.823 ± 38.977	323.376 ± 73.832
空转组	1 469.329 ± 94.503	1 573.817 ± 49.865	387.827 ± 58.948
SIX1 转染组	347.287 ± 38.973	1 764.284 ± 47.283	1 850.360 ± 109.137
TGF-β 转染组	1 783.265 ± 48.987	403.376 ± 38.937	1 616.353 ± 116.203
SIX1 + TGF-β 转染组	358.247 ± 75.297	338.037 ± 30.627	1 984.625 ± 93.291
F/P 值	10.376/0.000	11.327/0.000	13.396/0.000

表 3 RT-PCR 法检测各组细胞 SIX1、TGF-β 及 E-cadherin mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	SIX1	TGF-β	E-cadherin
未转染组	1 136.649 ± 35.549	1 280.307 ± 28.657	156.503 ± 33.250
空转组	1 053.064 ± 53.503	1 163.713 ± 25.659	208.652 ± 39.562
SIX1 转染组	237.862 ± 28.973	1 296.473 ± 27.382	1 370.603 ± 59.649
TGF-β 转染组	1 356.635 ± 37.987	198.280 ± 27.739	1 158.352 ± 36.332
SIX1 + TGF-β 转染组	263.714 ± 27.297	218.176 ± 24.726	1 472.205 ± 33.192
F/P 值	8.380/0.000	7.732/0.000	9.673/0.000

上皮-间质转化的过程是由多个信号传导通路触发和调控的,在这些信号传导通路中,TGF- β 被认为是最重要的途径之一。TGF- β 能够通过 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 通路、SMAD 通路及 Wnt 通路等途径对肿瘤的浸润及转移进行调节,在大肠癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中均存在 TGF- β 的高表达,其表达强度与肿瘤的分化、淋巴结转移及预后密切相关^[9-11]。以往的研究证实,TGF- β 能够被细胞中的多种活性因子激活,并与这些因子共同作用,激活及影响细胞内多种传导通路,但肿瘤细胞中转录因子的高表达能否增强 TGF- β 途径在诱导人喉鳞癌 EMT 过程中的作用尚不清楚。

SIX1(sine oculis homeobox homolog 1)是一种与细胞成熟相关的细胞因子,在发育成熟的细胞内很少表达,然而最近研究表明,SIX1 在多种恶性肿瘤组织中却呈现出高表达,SIX1 能够影响 Cyclin A1、Cyclin D1 及 Ezrin 等多种下游编码基因的表达。SIX1 在卵巢癌、乳腺癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中表达强度与肿瘤的预后密切相关^[12-14]。最近研究证明,SIX1 能够与 TGF- β 共同作用,并通过 SMAD2/3 途径调节 VEGF 等多种基因的表达,进而发挥其促进肿瘤细胞淋巴结转移功能,基于以上研究结果,本研究探讨 SIX1 与 TGF- β 是否在人喉鳞癌 EMT 的过程中起着促进作用。

Sun 等^[15]的研究结果显示,SIX1 能够同 TGF- β 共同作用促进卵巢癌细胞上皮-间质转化,进一步提高卵巢癌细胞局部浸润及远处转移的能力。本结果也发现,喉癌细胞内 SIX1 表达降低的同时出现了 E-cadherin mRNA 及蛋白表达的上调,同样,TGF- β 表达降低的同时也出现了喉癌细胞 E-cadherin mRNA 及蛋白表达的上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。说明 SIX1 及 TGF- β 均参与了人喉鳞癌细胞 EMT 的过程,SIX1 和/或 TGF- β 表达降低均能抑制人喉鳞癌细胞 EMT 的发生。同时,本研究结果还显示,抑制 TGF- β 表达、抑制 SIX1 表达同抑制 SIX1 + TGF- β 表达均能导致人喉鳞癌细胞 E-cadherin mRNA 及其蛋白表达的上调,且 3 组间 E-cadherin mRNA 及其蛋白的表达差异无统计学意义。提示在人喉鳞癌细胞 EMT 的过程中 TGF- β 及 SIX1 并不能单独发挥作用,而需要 TGF- β 和 SIX1 共同作用。SIX1 和 TGF- β 共同诱导人喉鳞癌细胞 EMT 的过程是通过 TGF- β 及 SIX1 共同作用途径实现的。推测 SIX1 在人喉鳞癌细胞中表达升高能够增强 TGF- β 对肿瘤细胞的敏感性,进而通过 TGF- β 途径促进喉鳞癌细胞的上皮-间质转化。与此同时,TGF- β 促进喉鳞癌细胞上皮-间质转化的过程需要

SIX1 的存在,但其具体的作用机制尚待进一步研究。

综上,SIX1、TGF- β 共同作用可能是人喉鳞癌细胞上皮-间质转化的关键,SIX1 和 TGF- β 是人喉鳞癌细胞转移潜能的重要标志,有望成为临床治疗人喉鳞癌细胞上皮-间质转化及淋巴结转移的新靶点。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张继华:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,论文修改;董凯峰:实施研究过程,资料搜集整理;苏静:进行统计学分析;李丹:实施研究过程,资料搜集整理,论文撰写;田君海:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

参考文献

- [1] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196. DOI: 10.1038/nrm3758.
- [2] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(1): 76-84. DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b6371.
- [3] 张继华, 陈春菊, 宋冬梅, 等. 人参皂甙 Rg3 对人喉鳞癌裸鼠移植瘤中 SIX1、TGF- β 、VEGF-C 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 91-94. DOI: 10.13412/j.cnki.zyy.2012.02.026.
- [4] Ma Y, Zhang H, Xiong C, et al. CD146 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during TGF- β signaling-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2018, 35(18): 303-309. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.05.016.
- [5] Weingarten C, Jenudi Y, Tshuva RY, et al. The interplay between epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the thyroid hormones- $\alpha\beta$ 3 axis in ovarian[J]. Horm Cancer, 2018, 9(1): 22-32. DOI: 10.1007/s12672-017-0316-3.
- [6] Oh SH, Swiderska-Syn M, Jewell ML, et al. Liver regeneration requires Yap1-TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes[J]. J Hepatol, 2018, 5(8): 120-126. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.008.
- [7] Zacharopoulou N, Tsapara A, Kallergi G, et al. The epigenetic factor KDM2B regulates EMT and small GTPases in colon tumor cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(1): 368-377. DOI: 10.1159/000489917.
- [8] Kosnopfel C, Sinnberg T, Sauer B, et al. YB-1 expression and phosphorylation regulate tumorigenicity and invasiveness in melanoma by influencing EMT[J]. Cancer Res, 2018, 5(9): 17037-17043. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0528.
- [9] 马建波, 戴金华, 余秋云, 等. 非小细胞肺癌患者血清 TGF- β 1 检测水平的临床研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6): 1456-1457.
- [10] 张梁, 黄韵, 黄永秩, 等. TGF- β 1 和 Smad4 在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. 右江医学, 2010, 38(1): 10-11. DOI: 10.3969/j.issn.1003-1383.2010.03.004.

(下转 398 页)

人参多糖对脑出血模型大鼠的干预效果及对海马区细胞凋亡的影响

郑希院, 翟洁敏, 李会琪, 赵龙斌, 高章代

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2017SF-282)

作者单位: 710038 西安医学院第二附属医院神经内科(郑希院、赵龙斌、高章代); 710077 西安, 西电集团医院神经内科(翟洁敏、李会琪)

通信作者: 翟洁敏, E-mail: z2116g@163.com

【摘要】目的 观察人参多糖对脑出血模型大鼠的干预效果及对海马区细胞凋亡的影响。**方法** 2019 年 5—7 月于西安医学院第二附属医院神经内科实验室进行实验, 选取健康雄性 SD 大鼠 50 只, 随机选取 10 只为正常组, 制作脑出血模型大鼠 40 只, 随机数字表法分为模型组及人参多糖低剂量组、中剂量组、高剂量组各 10 只。正常组及模型组给予生理盐水灌胃, 人参多糖低剂量组给予 2 mg/kg 人参多糖, 中剂量组 4 mg/kg, 高剂量组 8 mg/kg, 均灌胃干预 3 周。5 组大鼠均进行脑组织观察, 比较各组大鼠脑含水量、神经缺损评分、学习记忆能力评分、肿瘤坏死因子(TNF- α)、丙二醇(MDA)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt) 通路蛋白表达及细胞凋亡率。**结果** 与正常组比较, 模型组出现脑出血组织细胞间隙增大, 神经细胞固缩, 胶质细胞增生等变化; 与模型组比较, 低剂量组、中剂量组、高剂量组均显著减轻。模型组脑含水量、脑神经缺损评分及学习记忆能力评分高于正常组, 而人参多糖干预后上述改变均减轻, 且呈剂量依赖性($F/P = 41.499/0.001, 12.442/0.001, 34.601/0.001$), 模型组 TNF- α 、MDA 含量高于正常组, 而人参多糖干预后上述改变均减轻, 且呈剂量依赖性($F/P = 10.221/0.001, 139.435/0.001$); 模型组 24 h、48 h、72 h 海马区细胞凋亡率均高于正常组, 而人参多糖干预后上述改变均减轻, 且呈剂量依赖性($F/P = 17.806/0.001, 14.978/0.001, 22.363/0.001$); 模型组 Bcl-2、Akt、PI3K 低于正常组, 而人参多糖干预后上述改变均减轻, 且呈剂量依赖性($F/P = 34.193/0.001, 34.546/0.001, 42.837/0.001$)。**结论** 人参多糖对脑出血模型大鼠作用显著, 能够改善大鼠记忆能力, 减少脑含水量、海马区细胞凋亡, 降低脑出血后继发性损伤。

【关键词】 人参多糖; 脑出血; 细胞凋亡; 脑含水量; 大鼠

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.016

Effect of ginseng polysaccharide on apoptosis in the hippocampus of rats with cerebral hemorrhage Zheng Xiyuan*, Zhai Jiemin, Li Huiqi, Zhao Longbin, Gao Zhangdai. *Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, China

Funding program: Key R & D projects of Shaanxi Province (2017SF-282)

【Abstract】Objective To observe the intervention effect of ginseng polysaccharide on cerebral hemorrhage model rats and the effect on apoptosis of hippocampal cells. **Methods** The experiment was conducted in the neurology Laboratory of the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College from May 2019 to July 2019. 50 healthy male SD rats were selected, 10 of them were randomly selected as a normal group, 40 of them were made into cerebral hemorrhage model rats, all of which were successfully modeled, and randomly divided into model group, low dose group, middle dose group and high dose group. Normal group and model group were given normal saline, low dose group of ginseng polysaccharide was given 2 mg/kg, middle dose group was 4 mg/kg, high dose group was 8 mg/kg. The brain tissues of the five groups were observed, and the scores of nerve defect, brain water content, learning and memory ability were counted. The expression of tumor necrosis factor (TNF- α), propylene glycol (MDA), B lymphoma-2 (Bcl-2), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K / Akt) pathway protein and apoptosis rate were detected. **Results** The brain water content, neurological deficit, and learning and memory ability of high dose group were lower than those of low dose group and middle dose group ($F/P = 41.499/0.001, F/P = 12.442/0.001, F/P = 34.601/0.001$), while the content of TNF- α and MDA were lower than those of low dose group and middle dose group ($F/P = 10.221/0.001, F/P = 139.435 / 0.001$), and the apoptosis rate was lower than those of low

dose group and middle dose group ($F/P = 17.806/0.001$, $F/P = 14.978/0.001$, $F/P = 22.363/0.001$), Bcl-2, Akt and p13k were higher than those of low dose group and middle dose group ($F/P = 34.193/0.001$, $F/P = 34.546/0.001$, $F/P = 42.837/0.001$). **Conclusion** Ginseng polysaccharide has a significant effect on cerebral hemorrhage model rats, which can improve memory ability, reduce brain water content, apoptosis of hippocampal cells, and reduce secondary damage after cerebral hemorrhage.

【Key words】 Ginseng polysaccharide; Cerebral hemorrhage; Apoptosis; Brain water content; Rats

脑出血是非外伤性脑组织内血管破裂引起的出血,是一种常见疾病、多发疾病,发病率与病死率呈上升趋势,属于急性脑血管病中的危重类型,严重危害人类的身体健康^[1]。患者在脑出血时,不但会出现血肿性病变,还会继发脑水肿、缺血、炎症反应、血肿周围组织能量代谢紊乱等一系列脑损伤^[2]。脑出血患者发病年龄逐渐年轻化,即使幸存者亦会遗留不同程度的神经功能障碍,对患者的生活质量造成了严重影响,带来了沉重的经济负担^[3]。脑出血造成的脑损伤,主要由血肿扩大导致的机械性压迫所致周围组织缺血及在血块形成过程中和形成后导致^[4]。现观察人参多糖对脑出血模型大鼠的干预效果及对海马区细胞凋亡的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:健康雄性 SD 大鼠 50 只,月龄 6~10(8.8 ± 0.7)月,体质量 340~480(360.0 ± 58.6)g,由北京科奥力饲料有限公司提供[合格证号:京动(2000)第 015 号]。大鼠均生活于(24.0 ± 2.1)℃的环境、无病原菌的饲养笼中,予高温及高压消毒的食物和水喂养。(2)试剂:人参多糖(陕西斯诺特生物科技有限公司),水合氯醛[生工生物工程(上海)股份有限公司],酶联免疫试剂盒(北京维德维康生物技术有限公司),TBARS 试剂盒(江苏江莱生物科技有限公司)。(3)仪器:光镜(美国 Ted Pella);冰箱(Eppendorf 艾本德中国有限公司,型号 ep000000);电子天平(北京金达阳光科技有限公司,型号 CP153);恒温干燥箱(东莞市谱标实验器材科技有限公司,型号 SPCC);SuperMaze Morris 水迷宫实验装置(上海欣软信息科技有限公司,型号 XR-XM101);BD FAC SCanto II 流式细胞仪(北京德利卡生物科技有限公司,型号 DLK0002051)。

1.2 实验方法 2019 年 5—7 月于西安医学院第二附属医院神经内科实验室进行实验。

1.2.1 人参多糖提取物制作:人参 50 g 加入蒸馏水 100 ml 中,冷浸过夜后,加热煮沸 30 min,留取清亮液体小火加热浓缩到 10 ml,制成含生药 2 g/ml 的药液,阴凉后以滤纸过滤药液,再用一次性针头滤器过滤后,

分装于安瓿灭菌后放入冰箱备用。

1.2.2 大鼠脑出血模型建立:随机选取大鼠 10 只作为正常组,余大鼠 40 只使用 Rosenberg 法制作脑出血模型^[5],以 10% 水合氯醛 400 mg/kg 于大鼠腹部注射麻醉,固定在立体仪上,在头部正中进行纵行切口,剥离骨膜,使冠状缝和前囟裸露;在前囟前中线右侧 2.0~3.0 mm 处钻直径 > 1.0 mm 小孔。使用微量注射器抽取股动脉 50 μ l 血液,在钻孔处垂直进针 6.0 mm 左右,注入 10 μ l 血液,2 min 后以 10 μ l/min 的速度将剩余的 40 μ l 血液注入,留针 10 min 后,将针退出,并用消毒针将切口缝合,完成建模。大鼠脑横断面中出现明显血肿,血液无针道反流情况,无蛛网膜下腔出血,无血肿破入脑室视为造模成功。

1.2.3 分组及用药:将建模成功的大鼠 40 只以随机数字表法分为模型组及人参多糖低剂量组、中剂量组、高剂量组,各 10 只。人参多糖低剂量组给予 2 mg/kg 人参多糖,中剂量组 4 mg/kg,高剂量组 8 mg/kg,均灌胃 3 周。正常组及模型组大鼠均给予同等体积的无菌生理盐水灌胃。治疗期间所有大鼠均自由饮食。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 大鼠脑出血组织观察:大鼠在最后 1 次给药后 4 h 进行麻醉断头处理,取脑组织放置于 4℃ 冰箱固定 48 h,石蜡包埋切片、常规脱蜡、乙醇浸水,HE 染色,光镜下常规组织学检查。

1.3.2 脑含水量、神经缺损评分及学习记忆能力评分测定:(1)脑组织含水量:使用干湿质量法检测,用精确度 0.1 mg 的电子天平分别测量 5 组大鼠的脑组织湿重,放在 100℃ 的恒温干燥箱烘 24 h 至脑组织不再减轻为止,然后测量烘培后大鼠脑组织质量。脑组织含水量 = (脑组织湿质量 - 脑组织干质量) / 脑组织湿重 $\times 100\%$ 。(2)神经功能评分:使用 Longa 评分法^[6],分为 0~4 级即为 0~4 分,无体征为 0 级,记 0 分;大鼠不能完全伸直前肢为 1 级,记 1 分;大鼠一侧肢体瘫痪,有追尾现象为 2 级,记 2 分;大鼠不能打滚或者站立为 3 级,记 3 分;无自发性活动,有意识障碍为 4 级,记 4 分。分值越高说明大鼠神经功能损伤越严重。(3)学习记忆能力评分:参照彭璇等^[7]介绍的方

法采用 Morris 水迷宫实验装置进行动态图像采集,分析大鼠学习记忆能力评分。大鼠在 Morris 水迷宫中训练 5 d 后,在第 6 天记录时间均值作为最终测定效果。

1.3.3 大鼠海马区细胞凋亡率检测:使用流式细胞仪检测细胞凋亡,以 37 ℃、5% CO₂ 环境中进行培养传代至 5 孔板中的细胞,加入 0.25% 胰蛋白酶进行消化,使用 2 000 r/min 的离心机处理海马区细胞 5 min 后使用 PBS 缓冲液清洗 2 次,在避光常温环境中收取离心的海马区细胞,加入 PI 染液 1 ml,放置 1 h,然后用特异荧光标记后,使用鞘液包裹,在高速流动条件下,严格按照流式细胞仪操作说明检测细胞凋亡率。

1.3.4 脑匀浆 TNF-α、MDA 含量检测:取大鼠血肿周围的新鲜脑组织 200 mg 加入 PBS 缓冲液,离心处理 15 min 后弃去清液,待测。使用酶联免疫吸附实验法检测 TNF-α 浓度,严格按照酶联免疫试剂盒说明书操作。将采集后的脑组织匀浆使用硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量,严格按照 TBARS 试剂盒说明书进行操作。

1.3.5 大鼠海马区相关蛋白 Bcl-2、Akt、PI3K 表达检测:采用 Western-blot 法检测各组大鼠海马组织中 Bcl-2、Akt、PI3K 表达量,以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 组大鼠脑出血组织观察比较 与正常组比较,模型组出现脑出血组织细胞间隙增大,神经细胞固缩,胶质细胞增生等变化。与模型组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组脑组织的神经细胞和胶质细胞肿胀、间质水肿和炎性细胞浸润等均减轻。与低剂量组、中剂量组比较,高剂量组脑组织排列规整,间质水肿、胶质细胞肿胀等明显消退,见图 1。

2.2 5 组大鼠脑含水量、脑神经缺损评分及学习记忆能力评分比较 模型组大鼠脑含水量、脑神经缺损评

分及学习记忆能力评分高于正常组(*P* 均 < 0.05),低剂量组、中剂量组、高剂量组低于模型组(*P* 均 < 0.05),中剂量组低于低剂量组,高剂量组低于中剂量组(*P* 均 < 0.05),见表 1。

表 1 5 组大鼠脑含水量、脑神经缺损评分及学习记忆能力评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	脑含水量 (%)	神经功能评分(分)	学习记忆能力评分(分)
正常组	10	67.13 ± 5.61	0	12.16 ± 2.14
模型组	10	89.14 ± 6.24	3.63 ± 0.32	36.78 ± 2.61
低剂量组	10	80.16 ± 5.32	2.24 ± 0.25	30.14 ± 2.26
中剂量组	10	74.12 ± 4.21	1.24 ± 0.41	22.64 ± 2.52
高剂量组	10	69.16 ± 2.14	0.64 ± 0.12	14.25 ± 2.01
<i>F</i> 值		41.499	12.442	34.601
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

2.3 5 组大鼠海马区细胞凋亡率比较 模型组细胞凋亡率高于正常组(*P* 均 < 0.05),低剂量组、中剂量组、高剂量组低于模型组(*P* 均 < 0.05);中剂量组低于低剂量组,高剂量组低于中剂量组(*P* 均 < 0.05),见表 2。

表 2 5 组大鼠海马区细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	<i>n</i>	24 h	48 h	72 h
正常组	10	3.12 ± 0.41	3.01 ± 0.33	3.13 ± 0.34
模型组	10	35.14 ± 8.52	48.24 ± 14.32	62.13 ± 12.51
低剂量组	10	25.12 ± 4.42	22.23 ± 5.14	19.21 ± 4.26
中剂量组	10	20.52 ± 3.14	18.12 ± 2.52	16.65 ± 2.14
高剂量组	10	15.16 ± 3.12	11.21 ± 2.01	8.62 ± 1.45
<i>F</i> 值		17.806	14.978	22.363
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

2.4 5 组大鼠脑匀浆 TNF-α、MDA 含量变化 模型组 TNF-α、MDA 含量高于正常组(*P* 均 < 0.05),低剂量组、中剂量组、高剂量组低于模型组(*P* 均 < 0.05);中剂量组低于低剂量组,高剂量组低于中剂量组(*P* 均 < 0.05),见表 3。

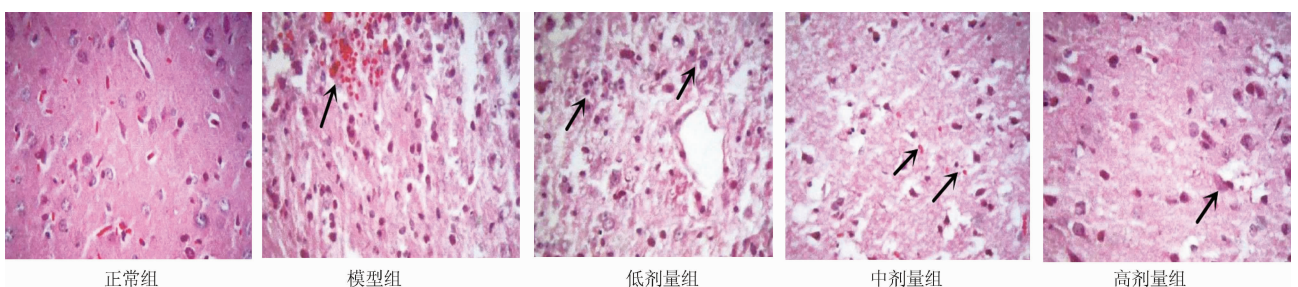


图 1 5 组大鼠脑出血组织形态观察(HE 染色, ×400)

表 3 5 组大鼠脑匀浆 TNF- α 、MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	TNF- α (ng/ml)	MDA (nmol/mg)
正常组	10	1.65 $\pm$ 0.82	124.13 $\pm$ 7.26
模型组	10	5.62 $\pm$ 1.65	346.62 $\pm$ 2.14
低剂量组	10	4.02 $\pm$ 1.54	282.65 $\pm$ 4.26
中剂量组	10	2.95 $\pm$ 1.12	194.62 $\pm$ 3.67
高剂量组	10	1.86 $\pm$ 0.65	134.16 $\pm$ 3.65
<i>F</i> 值		10.221	139.435
<i>P</i> 值		0.001	0.001

2.5 5 组大鼠海马区相关蛋白 Bcl-2、PI3K/Akt 表达比较 模型组大鼠海马区相关蛋白 Bcl-2、PI3K/Akt 表达均低于正常组 (P 均 < 0.05), 低剂量组、中剂量组、高剂量组均高于模型组 (P 均 < 0.05), 中剂量组高于低剂量组, 高剂量组高于中剂量组 (P 均 < 0.05), 见表 4。

表 4 5 组大鼠海马区相关蛋白 Bcl-2、PI3K/Akt 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	Bcl-2	Akt	PI3K
正常组	10	14.16 $\pm$ 1.23	17.14 $\pm$ 1.42	18.45 $\pm$ 1.24
模型组	10	2.12 $\pm$ 1.13	3.41 $\pm$ 1.24	2.16 $\pm$ 1.31
低剂量组	10	4.65 $\pm$ 2.24	5.62 $\pm$ 1.52	6.15 $\pm$ 1.52
中剂量组	10	8.12 $\pm$ 1.65	9.24 $\pm$ 1.85	10.18 $\pm$ 1.13
高剂量组	10	12.14 $\pm$ 2.25	14.25 $\pm$ 2.61	15.62 $\pm$ 1.32
<i>F</i> 值		34.193	34.546	42.837
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.001

3 讨 论

脑出血属于一种急性疾病, 发病率、病死率、致残率均较高, 是神经系统的常见疾病, 近年来我国脑出血的发病率逐渐升高, 发病年龄也逐渐年轻化^[8]。脑出血是重要的脑卒中类型, 全世界范围的发病人数每年约有 200 万, 脑出血占脑卒中的 30% 左右, 病死率极高, 即使幸存下来也会发生非常严重的神经功能障碍^[9]。脑出血是指非外伤性脑实质内血管破裂引起的出血, 脑组织神经细胞凋亡在病理生理过程中极其重要^[10]。

人参在中医领域的应用历史悠久^[11]。研究发现, 人参除了根以外, 茎、叶、花及果中都含有比例各异、组分不同的生物活性分子^[12]。人参中主要有人参皂甙、人参多肽、人参多糖和人参花挥发油等生物活性物质, 降解分离可以获得多种必需的氨基酸、脂肪酸及微量元素等^[13]。人参多糖是最早研究的多糖类生物活性成分, 主要作用是对免疫功能的影响及所产生的免疫性抗肿瘤活性^[14], 还能增加免疫力、降血糖、促进造血、抗衰老、抗菌、抗炎等^[15]。

TNF- α 可在组织损伤中增加脑血管内皮细胞一氧化氮的毒性作用, 增加血管内皮的通透性, 破坏血脑屏障, 使血管源性脑水肿加重。TNF- α 可以趋化中性粒细胞、单核细胞及淋巴细胞从而导致白细胞聚集阻塞微血管, 导致继发性缺血缺氧, 从而使脑水肿和继发性脑损伤加重^[16]。基于人参多糖具有抗炎、增强免疫力的药理作用, 在本研究中分析人参多糖对脑出血大鼠脑匀浆 TNF- α 含量的影响, 结果显示, 人参多糖干预后, 脑出血大鼠脑匀浆中 TNF- α 含量显著降低, 且剂量越高脑出血大鼠脑匀浆中 TNF- α 含量越趋近于正常。此结果说明, 人参多糖可通过降低脑出血大鼠脑匀浆中 TNF- α 含量, 来抵抗大鼠机体炎性反应, 增强免疫力, 修复大鼠脑损伤。MDA 属于自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物, 反映氧自由基含量的指标^[17]。脑出血患者发病后血肿周围存在组织损伤和水肿区域, 该区域内脑组织会发生复杂的病理变化, 对脑出血患者病情程度及预后造成了严重影响, 在病理因素中, 自由基的作用非常重要^[18]。脑出血发生后, 大鼠脑组织匀浆中 MDA 含量显著增加, 其增加实质为自由基所引起的神经细胞过氧化, 而人参多糖可增强机体清除自由基的能力, 降低 MDA 含量, 进而减轻脑损伤。本研究结果显示, 运用人参多糖干预的脑出血大鼠脑匀浆中 MDA 含量均显著降低, 且剂量越高脑出血大鼠脑匀浆中 TNF- α 、MDA 含量越趋近于正常, 此结果说明, 人参多糖可通过降低自由基所引起的神经细胞过氧化, 来抑制 MDA 表达, 降低脑损伤程度。

神经细胞凋亡的发生与氧自由基、细胞内钙超载及兴奋性氨基酸毒性等因素引起线粒体的损伤等有关, 通过抗氧自由基、抑制细胞内钙超载等措施来减少细胞凋亡能起较好的神经保护作用。而人参多糖可降低自由基所引起的神经细胞过氧化。本结果显示, 人参多糖干预脑出血模型大鼠海马区细胞凋亡率相对较低, 并随着时间的推移, 细胞凋亡率不断下降, 说明使用人参多糖干预脑出血模型大鼠对海马区细胞起到抑制凋亡的作用。PI3K 不仅具有脂类激活酶活性, 还具有蛋白激酶的活性。脑出血后, 机体释放一些具有酪氨酸激酶受体激活物质, 激活 PI3K 从而磷酸化细胞膜上的肌醇。Akt 属于 PI3K 下游的效应分子, 活化后可通过控制凋亡的方式, 促进细胞存活生物效应并实现调控生长因子来诱发细胞生长^[19]。Bcl-2 属于重要的抗凋亡基因。本结果显示, 人参多糖对脑出血模型大鼠进行干预后, 脑出血模型大鼠 Bcl-2、Akt、PI3K 表达量相对较高, 说明人参多糖能够促进海马区细胞的增

殖,进而修复脑损伤。

综上所述,人参多糖治疗脑出血,能够改善大鼠记忆能力,减少脑含水量,抑制海马区细胞凋亡,降低脑出血后继发性损伤,为临床治疗脑出血提供理论依据。

利益冲突:无

作者贡献声明

郑希院、翟洁敏:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;李会琪、赵龙斌:提出研究思路,分析试验数据,论文审核,进行统计学分析;高章代:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改

参考文献

- [1] Li G, Sun J, Ma K, et al. Construction of a cerebral hemorrhage test system operated in real-time[J]. *Sci Rep*, 2017, 16(7):42842. DOI: 10.1038/srep42842.
- [2] Schacht H, Kuchler J, Boppel T, et al. Transluminal balloon angioplasty for cerebral vasospasm after spontaneous subarachnoid hemorrhage: A single-center experience[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2019, 188:105590. DOI: 10.1016/j.clineuro.2019.105590.
- [3] Takemoto Y, Hasegawa Y, Hayashi K, et al. The stabilization of central sympathetic nerve activation by renal denervation prevents cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Transl Stroke Res*, 2019. DOI: 10.1007/s12975-019-00740-9.
- [4] 岳赛超,郭付有,孙逸杰,等.米诺环素对大鼠脑出血后细胞凋亡及 Dickkopf-1、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白和 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(1):90-93. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2019.01.028.
- [5] 王建林,张苏明,杨志秀,等.脑出血大鼠血清白蛋白水平与肠黏膜变化的关系[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(11):801-804. DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2010.11.017.
- [6] 周海哲,李军,赵欢,等.脑泰通颗粒对缺血性中风模型大鼠组织形态学及 Longa 评分的影响[J]. *国际中医中药杂志*, 2011, 33(9):791-794. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2011.09.008.
- [7] 彭璇,吴刚,吴昊,等. Morris 水迷宫训练对老年痴呆大鼠模型学习记忆能力及海马组织肿瘤坏死因子- α 、超氧化物歧化酶、丙二醛水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(8):1833-1835. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.08.005.
- [8] 李国兰,武伟,贺昌林,等.右美托咪定在脑出血术后患者的镇静效果及安全性评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(1):9-

11. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.01.003.
- [9] 马宝林,林吴用,高丽丽,等.依达拉奉对大鼠脑出血后脑水肿及脂质过氧化的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(8):40-42. DOI:10.3969/j.issn.1005-1678.2016.08.008.
- [10] 蓝先旗,麦惠强,宁晔,等.脑出血前后灯盏花素腹腔注射大鼠脑损伤程度观察[J]. *山东医药*, 2019, 59(6):39-42. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2019.06.010.
- [11] Sabouri-Rad S, Sabouri-Rad S, Sahebkar A, et al. Ginseng in dermatology: A review[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(11):1649-1666. DOI: 10.2174/1381612822666161021152322.
- [12] Mancuso C, Santangelo R. Panax ginseng and Panax quinquefolius: From pharmacology to toxicology[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 107(Pt A):362-372. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.019.
- [13] Lee W, Ku SK, Kim JE, et al. Inhibitory Effects of black ginseng on particulate matter-induced pulmonary injury[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 9:1-15. DOI: 10.1142/S0192415X19500630.
- [14] 乔洪旺,何军,郭林娜,等.小剂量人参多糖对人肝癌 BEL-7402 细胞生长抑制与诱导分化作用初探[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(14):1484-1487,1525. DOI:10.13286/j.cnki.chinhosp-pharmacy.2018.14.09.
- [15] 周奕阳,李树芳.人参多糖联合化疗对中晚期消化道肿瘤患者疗效和免疫功能指标的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(23):36-39. DOI:10.7619/jcmp.201623011.
- [16] 张极星,张艳国,赵亮,等.急性期脑出血患者血清 ICAM-1、MMP-9、TNF- α 、IL-6 水平和出血灶周围水肿脑组织体积的相关性[J]. *山东医药*, 2017, 57(27):58-60. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.27.017.
- [17] Kaya B, Erdi F, Kline I, et al. Alterations of the thioredoxin system during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2015, 157(5):793-800. DOI: 10.1007/s00701-015-2390-z.
- [18] 李晓峰,李吕力,肖继东,等.褪黑素对急性脑出血小胶质细胞激活的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(1):46-50. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.01.013.
- [19] Zhao Q, Qu R, Teng L, et al. HO-1 protects the nerves of rats with cerebral hemorrhage by regulating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15:1459-1468. DOI: 10.2147/NDT.S197030.

(收稿日期:2019-09-30)

(上接 393 页)

- [11] Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, et al. The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):265-269. DOI: 10.1371/journal.pone.0026514.
- [12] Jin H, Cui M, Kong J, et al. Sineoculis homeobox homolog 1 protein is associated with breast cancer progression and survival outcome[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(2):247-252. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.07.005.
- [13] Qamar L, Deitsch E, Patrick AN, et al. Specificity and prognostic validation of a polyclonal antibody to detect Six1 homeoprotein in o-

- varian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 125(2):451-457. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.02.007.
- [14] Kong J, Zhou X, Liu S, et al. Overexpression of sineoculis homeobox homolog1 predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6):3018-3027. DOI: 10.1186/bcr3632.
- [15] Sun SH, Liu D, Deng YT, et al. SIX1 coordinates with TGF- β signals to induce epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer[J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(2):1271-1278. DOI: 10.3892/ol.2016.4797.

(收稿日期:2019-10-09)

基于 16S rRNA 测序技术初步探讨多囊卵巢综合征大鼠肠道菌群多样性

肖慧, 刘艳霞, 征征, 邢雅雯, 邢玉

基金项目: 国家自然青年科学基金项目(81904241); 北京中医药大学青年教师项目(2018-JYBZZ-JS099)

作者单位: 100029 北京中医药大学(肖慧、征征、邢雅雯); 100078 北京中医药大学东方医院妇科(刘艳霞、邢玉)

通信作者: 邢玉, E-mail: xingyu465@126.com

【摘要】目的 应用 16S rRNA 测序技术分析来曲唑联合高脂饮食诱导的多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠肠道菌群多样性的特点。**方法** 2018 年 10 月—2019 年 3 月于北京中医药大学进行实验。选取 SPF 级雌性 SD 大鼠 12 只, 随机数字表法分为对照组和模型组, 每组 6 只; 对照组予普通饮食, 模型组予来曲唑联合高脂饮食诱导大鼠 PCOS 模型, 采用 16S rRNA 高通量基因测序技术检测肠道菌群多样性。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠肠道菌群中拟杆菌门丰度减少($t = -2.951, P = 0.033$), 厚壁杆菌门丰度增加($t = 2.800, P = 0.038$), 拟杆菌门/厚壁杆菌门比值显著降低($t = -3.378, P = 0.02$)。模型组大鼠肠道菌群中各分类水平的拟杆菌丰度均减少, 包括属水平的 Allprevotella、拟杆菌属、副拟杆菌属、普氏菌属等; 厚壁杆菌门中多个分类水平的菌群丰度增加, 包括属水平的丹毒丝菌属、红蝈菌属等, 而瘤胃菌科丰度减少; 变形菌门中属水平的 Parasutterella 增多, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** 来曲唑联合高脂饮食诱导的 PCOS 大鼠肠道菌群存在菌群失调的现象, 主要表现为拟杆菌门丰度减少, 厚壁杆菌门丰度增加; Allprevotella、拟杆菌属、副拟杆菌属、普氏菌属、瘤胃菌科等益生菌丰度减少, 而梭菌属、Parasutterella、红蝈菌科等有害菌群丰度增加。

【关键词】 多囊卵巢综合征; 肠道菌群; 16S rRNA; 拟杆菌门; 厚壁杆菌门; 大鼠

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.017

The preliminary study of gut microbiota in polycystic ovary syndrome rat model by 16S rRNA technique Xiao Hui, Liu Yanxia, Zheng Zheng, Xing Yawen, Xing Yu. * Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: Xing Yu, E-mail: xingyu465@126.com

Funding program: National Natural Youth Science Foundation of China (81904241); Young Teachers Program of Beijing University of Traditional Chinese Medicine (2018-JYBZZ-JS099)

【Abstract】Objective To investigate the diversity of gut microbiota in polycystic ovary syndrome (PCOS) rat model induced by letrozole. **Methods** The experiment was conducted in Beijing University of Chinese Medicine from Oct 2018 to Mar 2019. A rat model has been established by letrozole and high-fat diet, then the diversity of gut microbiota was detected by 16S rRNA technique. **Results** Compared with the control group, the abundances of Bacteroidetes was decreased ($t = -2.951, P = 0.033$), the abundances of Firmicutes was increased ($t = 2.800, P = 0.038$), the Bacteroidetes/Firmicutes were lower in model group ($t = -3.378, P = 0.02$), the difference was statistically significant. Besides, compared with the control group, the abundances of Allprevotella, Bacteroides, Parabacteroides and Prevotella and Ruminococcaceae were lower in model group ($P < 0.05$). While the abundances of Clostridium, Erysipelotrichia, Coriobacteriaceae, and Parasutterella were higher in the model group than those in the control group ($P < 0.05$). And the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Letrozole induced PCOS rat model has the phenomenon of dysfunction of gut microbiota, which means that the PCOS rat model has lower abundances of beneficial bacteria including Allprevotella, Bacteroides, Parabacteroides and Prevotella and Ruminococcaceae, and the higher abundances of deleterious bacteria including Clostridium, Erysipelotrichia, Coriobacteriaceae, and Parasutterella. This research can provide new ideas for further study of the mechanism of Chinese medicine treating PCOS.

【Key words】 Polycystic ovary syndrome; Gut microbiota; 16S rRNA; Bacteroidetes/Firmicutes; Rats

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是女性最常见的一种生殖内分泌疾病^[1], 可影响 18% 的育龄期女性^[2]。PCOS 以高雄激素血症 (hyperandrogenism)、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和持续无排卵为主要临床特征。引起近 80% 无排卵性不孕^[3], 且患子痫前期、妊娠糖尿病、流产等妊娠并发症及心理疾病、心血管疾病、子宫肿瘤等远期并发症的风险增加, 严重威胁女性的身心健康^[4]。PCOS 发病机制尚不完全明确, 近年来大量研究表明, 肠道菌群在多种疾病的发生、发展中起到了重要的作用。最新研究表明, 移植 PCOS 患者肠道菌群的小鼠表现出胰岛素抵抗、生育力下降、卵巢组织中小卵泡增多和黄体减少等现象, 而移植正常人群肠道菌群的小鼠, 并无上述表现, 提示肠道菌群与 PCOS 密切相关^[5]。而基于 16S rRNA 高通量基因测序技术, 观察来曲唑联合高脂饮食诱导的 PCOS 大鼠肠道菌群多样性的特点, 尚未见文献报道。

本研究复制来曲唑联合高脂饮食诱导的 PCOS 大鼠模型, 以 16S rRNA 高通量基因测序技术, 对 PCOS 大鼠肠道菌群多样性进行 OTU 分析、 α 多样性分析、Beta 多样性分析、物种差异分析等, 阐明 PCOS 肠道菌群的特点, 为深入探讨 PCOS 的发病机制及中药的作用靶点提供基础, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物及分组: SPF 级雌性 SD 大鼠 12 只 [北京维通利华, 生产许可证号: SCXK (京) 20166-0006], 21 日龄, 体质量 50 ~ 70 g, 按随机数字表法分为对照组及模型组, 每组 6 只。屏障环境喂养。高脂饲料配方: 基础饲料加 0.3% 胆固醇、10% 猪油 (北京科澳协力饲料有限公司), 动物伦理审查批号 (BUCM-4-2018101001-4030)。(2) 实验药物: 来曲唑 (江苏恒瑞医药股份有限公司)。(3) 仪器及试剂: 离心机 (恒诺仪器 AXTGL16M)、切片机 (Leica RM2235)、石蜡包埋机 (Leica G1150H)、I-Sanger 生信云平台 (<https://www.i-sanger.com/>), 促黄体生成素 (LH) 测定试剂盒、促卵泡激素 (FSH) 测定试剂盒、血清雄激素 (T) 测定试剂盒、血清泌乳素 (PRL) 测定试剂盒、血清孕酮 (P) 测定试剂盒、血清雌激素 (E_2) 测定试剂盒均购自北京北方生物技术研究所。

1.2 实验方法 2018 年 10 月—2019 年 3 月于北京中医药大学进行实验。PCOS 大鼠模型的建立: 来曲唑 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 溶于 1% 羧甲基纤维素 (CMC) 中, 模型组大鼠连续灌服 42 d, 予高脂饲料喂养; 对照组大鼠同期灌服等容积等浓度的基质 CMC, 予普通饲料喂

养。大鼠雄激素水平升高且卵巢 HE 染色提示卵巢呈多卵泡样改变, 表明 PCOS 大鼠造模成功。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清性激素指标水平检测: 大鼠最后一次给药后, 禁食 12 h, 腹腔注射 0.4% 戊巴比妥 $1 \text{ ml}/100 \text{ g}$, 大鼠昏迷后, 75% 酒精消毒腹部皮肤, 打开腹腔, 腹主动脉取血 4 ml, 离心取血清, 以放射免疫法检测血清性激素 6 项: T、 E_2 、FSH、LH、P、PRL 水平。

1.3.2 卵巢形态学观察: 选取大鼠右侧卵巢, 4% 多聚甲醛固定, 卵巢组织 HE 染色, 制作石蜡切片, 光镜下观察卵巢组织学特点。

1.3.3 肠道菌群多样性检测: 基于 16S rRNA 测序技术检测^[6]。(1) 采集各组大鼠结肠粪便。(2) 使用 DNA 提取试剂盒提取每个粪便样本中总 DNA。(3) 以细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 可变区序列为靶标, 以带有 barcode 序列的 338F-806R 为引物, 进行 PCR 扩增, 获取 PCR 产物。(4) PCR 产物经过定量后, 通过 PCR 将 Illumina 官方接头序列添加至目标区域外端, 回收 PCR 产物, Tris-HCl 缓冲液洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测, 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段, 构建 MiSeq 文库; 利用 Illumina MiSeq PE300 等平台进行高通量测序, 获取细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 可变区碱基序列信息。(5) OTU 分析, OTU 是在系统发生学或群体遗传学研究中, 为了便于进行分析, 人为给某一个分类单元 (品系, 属, 种, 分组等) 设置的统一标志。利用 QIIME 软件, 对测序序列进行质控及 OTU 聚类, 获取 OTU 对应的分类单元 (包括门、纲、目、科、属、种) 及其相应的丰度信息。(6) α 多样性分析, Shannon 指数是描述一个特定区域或生态系统内多样性的度量指数, 通过计算 Shannon 指数评估样品中细菌菌群的丰富度和均匀度。(7) 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 是一种对数据进行简化分析的技术, 可以有效地找出数据中最“主要”的元素和结构, 去除噪音和冗余, 将原有的复杂数据降维, 揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构。(8) 物种差异分析, 应用 LEfSe 多级物种差异判别及组间差异比较, 分析各组大鼠肠道微生物群落表现出的丰度差异。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析处理。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 组血清性激素指标水平比较 模型组雄激素

(T) 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 余指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 2 组大鼠卵巢形态学比较 模型组卵巢可见多个不成熟小卵泡, 小卵泡周围颗粒细胞层数较少, 未见成熟卵泡及黄体; 而对照组卵巢内可见少数成熟大卵泡, 成熟卵泡颗粒细胞层较厚, 内可见卵丘, 卵巢内可见多个黄体, 见图 1。

2.3 肠道菌群多样性比较 每组各有 1 只大鼠标本不合格, 故最终行 16S rRNA 高通量基因测序的样本为每组 5 只。

2.3.1 OTU 分析及物种组成分析: 2 组大鼠共有 OTU 数 431 个, 模型组特有 122 个, 对照组特有 132 个。根据 OTU 聚类的结果, 可获得 2 组大鼠在门、纲、目、科、属、种及 OTU 水平的丰度信息, 其中, PCOS 模型组与对照组大鼠门、科、属水平群落 Bar 图见图 2~4。

2.3.2 α 多样性分析: 模型组和对照组的 Shannon 指数分别为 2.767 5 和 3.083 5, 2 组肠道菌群比较差异无统计学意义 ($P = 0.268$)。

2.3.3 PCA 分析: 剔除远离总体的部分样本后, PCA 结果表明, 对照组和模型组肠道菌群组成有明显差异。PC1 和 PC2 轴对结果的解释度分别为 59.38% 和 21.15%, 见图 5。

2.3.4 物种差异分析

2.3.4.1 门水平菌群丰度比较 2 组大鼠肠道门水平菌群丰度比较(前 10 位), 菌群组成以厚壁杆菌门和拟杆菌门为主。对照组拟杆菌门占 ($41.26 \pm$

3.60)%, 厚壁杆菌门占 (50.88 ± 3.67)%; 模型组拟杆菌门占 (19.88 ± 5.65)%, 厚壁杆菌门占 (66.48 ± 3.93)%。与对照组比较, 模型组拟杆菌门丰度显著降低 ($t = -2.951, P = 0.033$), 厚壁杆菌门丰度升高 ($t = 2.800, P = 0.038$), 见图 6。

2.3.4.2 拟杆菌门/厚壁杆菌门的比值 对照组为 0.83 ± 0.13 , 大于模型组的 0.39 ± 0.11 。2 组比较差异有统计学意义 ($t = -3.378, P = 0.020$)。

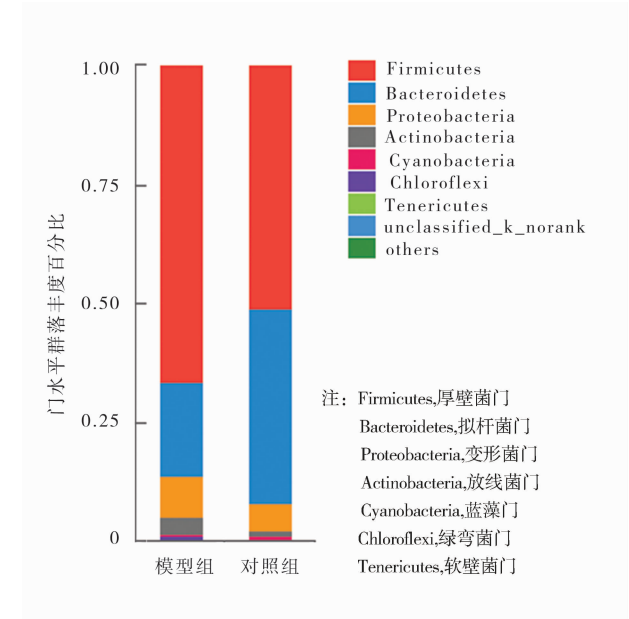
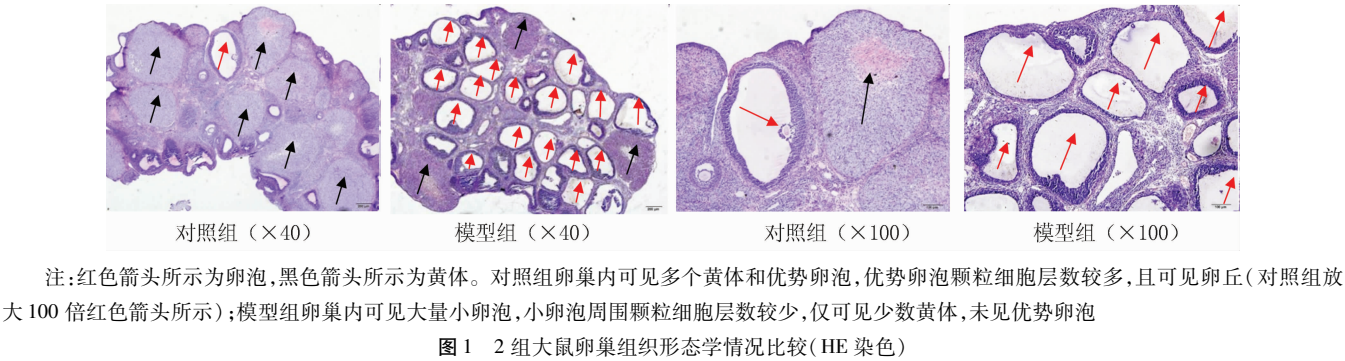


图2 2组大鼠门水平群落 Bar 图

表 1 2 组大鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)							
组 别	<i>n</i>	T (ng/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (μIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	P (ng/ml)	PRL (ng/ml)
对照组	6	0.31 ± 0.17	0.05 ± 0.02	0.25 ± 0.02	14.12 ± 4.20	27.43 ± 1.47	0.27 ± 0.03
模型组	6	1.55 ± 0.92	0.06 ± 0.02	0.25 ± 0.02	13.10 ± 2.20	19.09 ± 9.12	0.27 ± 0.02
<i>t</i> 值		3.231	1.061	-0.714	-0.541	-1.180	0.113
<i>P</i> 值		0.009	0.314	0.491	0.600	0.265	0.912



注: 红色箭头所示为卵泡, 黑色箭头所示为黄体。对照组卵巢内可见多个黄体 and 优势卵泡, 优势卵泡颗粒细胞层数较多, 且可见卵丘 (对照组放大 100 倍红色箭头所示); 模型组卵巢内可见大量小卵泡, 小卵泡周围颗粒细胞层数较少, 仅可见少数黄体, 未见优势卵泡

图1 2组大鼠卵巢组织形态学情况比较(HE 染色)

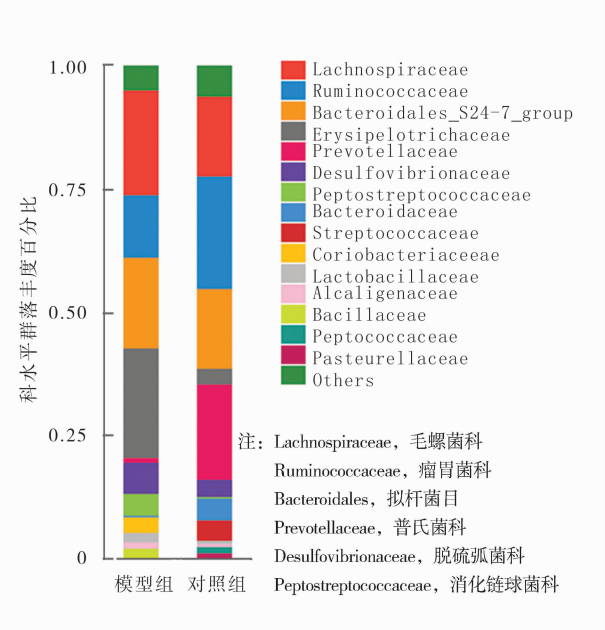


图3 2组大鼠科水平群落 Bar 图

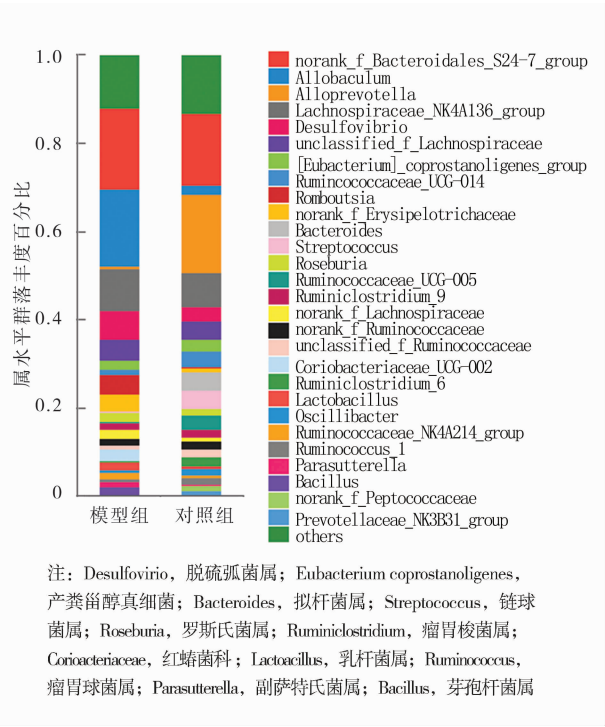


图4 2组大鼠属水平群落 Bar 图

2.3.4.3 属水平菌群丰度比较 与对照组比较,模型组 Alloprevotella (属普氏菌科)、拟杆菌属 (Bacteroides)、Ruminococcaceae_UCG-005 (属瘤胃菌科)、Ruminiclostridium-6 (属瘤胃菌科)、Prevotellaceae_NK3B31_group-6 (属普氏菌科)、副拟杆菌属 (Parabacteroides)、Bacteroides pectinophilus group (属梭菌目,毛螺菌科) 丰度均显著减少,Romboutsia (属梭菌

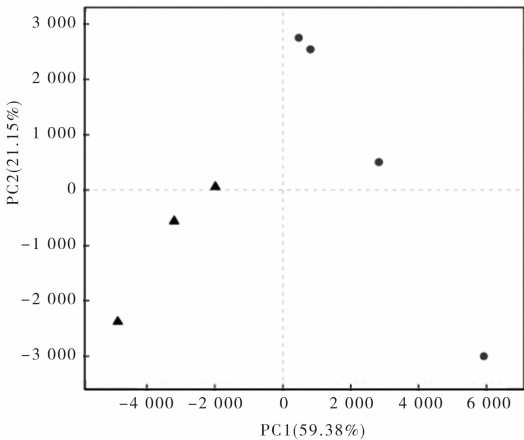


图5 2组大鼠 PCA 分析结果

目,消化链球菌科)、Parasutterella (属变形菌门) 和 Lachnoclostridium (属梭菌目,毛螺菌科) 丰度均显著增加,差异有统计学意义 (P 均 <0.05)。前 10 位有丰度差异的属水平菌群见图 7。

2.3.4.4 LEfSe 多级物种层级树图 LEfSe 是一种用于发现高维生物标识和揭示基因组特征的软件,包括基因、代谢和分类。该软件使用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验,检测具有显著丰度差异特征,并找到与丰度有显著性差异的类群。红色和蓝色节点分别表示在模型组和对照组中显著富集,且组间差异存在显著影响的微生物类群;淡黄色节点表示在不同分组中均无显著差异,或组间差异无显著影响的微生物类群。与对照组比较,PCOS 模型组大鼠肠道菌群中门、纲、目、科、属、种等各个水平的拟杆菌门的丰度均减少,包括属水平的 Alloprevotella、拟杆菌属、副拟杆菌属、普氏菌属等,厚壁菌门中瘤胃菌科的多个属水平及种水平的菌群丰度减少。与对照组比较,模型组大鼠厚壁菌门梭菌目中的科、属、种水平的梭菌均增多;厚壁杆菌门中各个分类水平的丹毒丝菌均增多,消化链球菌科、属、种水平的 Romboutsia 均增多,毛螺菌科中多个种属水平的菌群丰度增多;放线菌门中目、科、属、种水平的红蝟菌均增多;变形菌门中,种和属水平的 Parasutterella 均增多。

3 讨论

肠道菌群在人类健康中起着重要作用,被称为“成人的第二大脑”,肠道菌群基因又被看作“人类第二基因组”^[7]。近年来大量研究表明,肠道菌群在多种疾病的发生、发展中起到了重要的作用,提出了通过干预肠道菌群以防治疾病新的临床策略。

为避免外界环境对肠道菌群的影响,肠道菌群多样性检测的标本为结肠中的粪便。多个临床研究表

明^[8-9],与正常女性比较,PCOS 患者肠道菌群 α 多样性降低。最新研究发现^[10],PCOS 患者高雄激素血症与 α 多样性呈负相关。本研究对照组 α 多样性指数高于模型组,但差异无统计学意义,可能与样本量较少有关。

本实验结果表明,来曲唑联合高脂饮食诱导的 PCOS 大鼠模型存在肠道菌群失调的现象。Kelley 等^[11]用来曲唑诱导 PCOS 小鼠模型,结果发现来曲唑诱导的 PCOS 小鼠体内肠道菌群物种的多样性和丰度减少,主要表现为拟杆菌属 (*Bacteroides*) 丰度显著减少(所有 OTU 水平的拟杆菌丰度均减少),而梭菌属丰度增多,这与本研究结果一致。也有研究采用 Real-

time PCR 方法检测肠道菌群,结果表明,与对照组比较,来曲唑诱导的 PCOS 模型大鼠的乳酸菌、瘤胃球菌属、梭菌减少,而普氏菌增多^[12]。与本研究结果不完全一致,可能与 2 项研究应用的检测方法、造模方法不尽相同有关。

Allprevotella 可以降解糖类,产生短链脂肪酸,研究表明^[13-14],其丰度与肥胖、糖尿病、心血管疾病和代谢综合征呈负相关。PCOS 为代谢相关疾病,常合并肥胖、胰岛素抵抗等,结合本实验研究结果,PCOS 大鼠肠道菌群中 *Allprevotella* 丰度下降,因此 *Allprevotella* 的丰度可作为改善肠道菌群,防治 PCOS 的潜在靶标之一。拟杆菌属作为一种常见益生菌,对宿主健

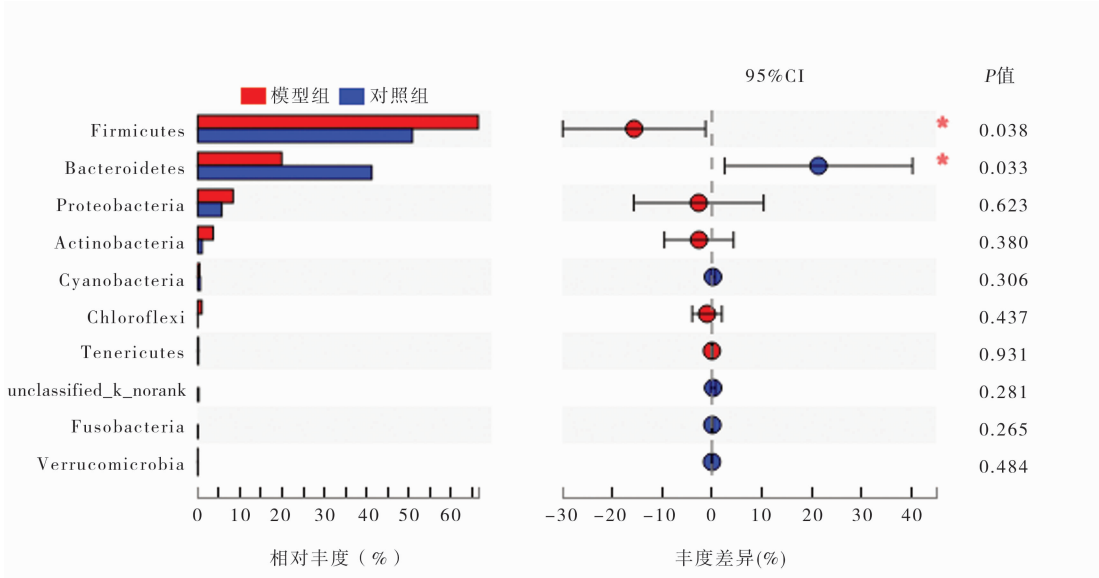


图 6 2 组门水平菌群丰度比较

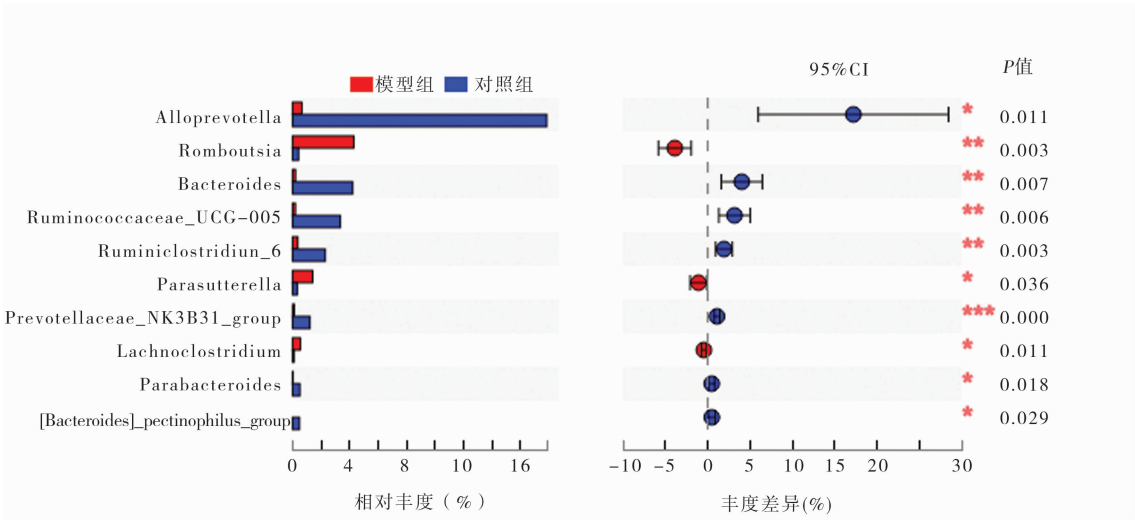


图 7 2 组属水平菌群丰度比较

康起着重要作用,如促进调节 T 细胞的分化,抑制炎症反应,影响宿主的免疫系统等^[15]。副拟杆菌属是可以参与代谢调节的益生菌,研究表明,狄氏副拟杆菌(*parabacteroides distasonis*)可通过产生琥珀酸盐和次级胆汁酸缓解肥胖,降低血糖,缓解脂肪肝。普氏菌属是和高植物饮食相关的益生菌,大麦仁饮食调控血糖的作用可能与增加普氏菌丰度有关^[16-17]。瘤胃菌作为一种短链脂肪酸的产生菌,可以降解多种多糖和纤维,其丰度与肠道通透性、酗酒、肝性脑病、非酒精性肝硬化均呈负相关^[18]。研究表明,多种疾病与梭菌属有关,如假膜性结肠炎、婴儿型肉毒中毒、破伤风、急性水样腹泻、坏死性小肠结肠炎等。Parasutterella 与慢性肠道炎症反应有关^[19-20]。红蜡菌科是神经性厌食症患者肠道菌群中惟一丰度增加的菌群。高脂饮食可以增加丹毒丝菌的丰度^[21-22]。结合本实验研究结果,PCOS 大鼠拟杆菌属、副拟杆菌属、普氏菌属、瘤胃菌科等益生菌丰度减少,而梭菌属、Parasutterella、红蜡菌科等有害菌群丰度增加,丹毒丝菌的丰度增加可能与模型组大鼠高脂饮食相关。

肠道菌群可以通过产生活跃的信号分子影响宿主免疫、代谢及生殖功能。其中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是最重要的分子之一,又称内毒素,是肠道革兰阴性细菌的细胞壁组成成分,引发了炎症反应相关过程^[23-25]。益生菌丰度减少,有害菌群丰度增加,导致肠道菌群紊乱,进而致肠黏膜受损,肠道通透性增加,LPS 进入循环,激活细胞表面的 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4),进而介导多个炎症信号通路,包括激活核转录因子(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路,诱导 TNF- α 、IL-18、IL-6 等促炎因子的分泌^[26-28]。而升高的 TNF- α 、IL-18、IL-6 均可以通过调控胰岛素相关信号通路,引起胰岛素累积,增多的胰岛素进一步导致卵巢产生更多的雄激素,干扰正常卵泡的发育,从而加剧 PCOS 的发生。这可能是肠道菌群紊乱加剧 PCOS 的潜在机制之一。明确 PCOS 发病的潜在机制,可为其防治提供新的临床策略。

此外,调节肠道菌群是中药口服治疗疾病的机制之一,研究表明,中药可以增加益生菌的丰度,三萜类化合物如人参皂苷、甘草苷、桔梗皂苷等,黄酮类化合物如槲皮苷、黄芩苷等,环烯醚萜类化合物如当归苷、芍药苷等均可增加拟杆菌和双歧杆菌的丰度。黄连素可以提高小鼠肠道菌群中拟杆菌/厚壁杆菌的比值,增加拟杆菌丰度。灵芝可降低肥胖小鼠肠道菌群中厚壁杆菌/拟杆菌比值和变形杆菌的丰度^[29-31]。PCOS 是中医药的优势病种,此研究可为进一步探究 PCOS 的中

药防治提供新思路和研究基础。

综上,本实验创新性地探究来曲唑联合高脂饮食诱导的 PCOS 大鼠肠道菌群多样性的特点。研究结果表明,PCOS 大鼠肠道菌群存在菌群失调的现象,拟杆菌门丰度减少,厚壁杆菌门丰度增加,拟杆菌门/厚壁杆菌门的比值降低,Allprevotella、拟杆菌属、副拟杆菌属、普氏菌属、瘤胃菌科等益生菌丰度减少,而梭菌属、Parasutterella、红蜡菌科等有害菌群丰度增加。此为进一步探究 PCOS 的防治提供新思路。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

肖慧:实施研究过程,数据收集、分析,论文撰写;刘艳霞:提出研究方向,指导研究设计,指导论文写作,论文审核;征征:协助实验实施、数据收集;邢雅雯:协助数据分析;邢玉:提出研究思路和研究选题,设计研究方案、研究流程,设计论文框架,论文修订及审核

参考文献

- [1] Teede HJ, Misso ML, Costello MF, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. Human Reproduction, 2018, 33(9): 1602-1618. DOI: 10.1093/humrep/dey256.
- [2] Moran LJ, Brown WJ, McNaughton SA, et al. Weight management practices associated with PCOS and their relationships with diet and physical activity[J]. Human Reproduction, 2017, 32(3): 669-678. DOI: 10.1093/humrep/dew348.
- [3] Balen AH, Morley LC, Misso M, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance[J]. Human Reproduction Update, 2016, 22(6): 687-708. DOI: 10.1093/humupd/dmw025.
- [4] Lovvik TS, Carlsen SM, Salvesen O, et al. Use of metformin to treat pregnant women with polycystic ovary syndrome (PregMet2): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2019, 7(4): 256-266. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30002-6.
- [5] Qi X, Yun C, Sun L, et al. Gut microbiota-bile acid-interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome[J]. Nature Medicine, 2019, 25(8): 1225-1233. DOI: 10.1038/s41591-019-0509-0.
- [6] Sun Z, Pei W, Guo Y, et al. Gut microbiota-mediated NLRP12 expression drives the attenuation of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis by Qingchang Wenzhong decoction[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019, 2019: 9839474. DOI: 10.1155/2019/9839474.
- [7] Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(8): 453-466. DOI: 10.1038/nrn3071.
- [8] Insenser M, Murri M, Del Campo K, et al. Gut microbiota and the polycystic ovary syndrome: Influence of sex, sex hormones, and obesity[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2018, 103(7): 2552-2562. DOI: 10.1210/jc.2017-02799.

- [9] Liu R, Zhang CH, Shi Y, et al. Dysbiosis of gut microbiota associated with clinical parameters in polycystic ovary syndrome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 324. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00324.
- [10] Torres PJ, Siakowska M, Banaszewska B, et al. Gut microbial diversity in women with polycystic ovary syndrome correlates with hyperandrogenism[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2018, 103(4): 1502-1511. DOI: 10.1210/je.2017-02153.
- [11] Kelley ST, Skarra DV, Rivera AJ, et al. The gut microbiome is altered in a letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146509. DOI: 10.1371/journal.pone.0146509.
- [12] Guo Y, Qi Y, Yang X, et al. Association between polycystic ovary syndrome and gut microbiota [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153196. DOI: 10.1371/journal.pone.0153196.
- [13] Jung MJ, Lee J, Shin NR, et al. Chronic repression of mTOR complex 2 induces changes in the gut microbiota of diet-induced obese mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30887. DOI: 10.1038/srep30887.
- [14] Shang Q, Song G, Zhang M, et al. Dietary fucoidan improves metabolic syndrome in association with increased Akkermansia population in the gut microbiota of high-fat diet-fed mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 28: 138-146. DOI: 10.1016/j.jff.2016.11.002.
- [15] Zeng Q, Li D, He Y, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13424. DOI: 10.1038/s41598-019-49462-w.
- [16] Wang K, Liao M, Zhou N, et al. Parabacteroides distasonis alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(1): 222-235. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.028.
- [17] Ley RE. Gut microbiota in 2015: Prevotella in the gut; choose carefully[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2016, 13(2): 69-70. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.4.
- [18] Shang Q, Shan X, Cai C, et al. Dietary fucoidan modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of Lactobacillus and Ruminococcaceae[J]. *Food & Function*, 2016, 7(7): 3224-3232. DOI: 10.1039/c6fo00309e.
- [19] Kiu R, Caim S, Alcon-Giner C, et al. Preterm infant-associated Clostridium tertium, Clostridium cadaveris, and Clostridium paraputrificum strains: genomic and evolutionary insights[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(10): 2707-2714. DOI: 10.1093/gbe/evx210.
- [20] Chen YJ, Wu H, Wu SD, et al. Parasutterella, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 33(11): 1844-1852. DOI: 10.1111/jgh.14281.
- [21] Mörl S, Lackner S, Müller W, et al. Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls [J]. *International Journal of Eating Disorders*, 2017, 50(12): 1421-1431. DOI: 10.1002/eat.22801.
- [22] Magnusson KR, Hauck L, Jeffrey BM, et al. Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility [J]. *Neuroscience*, 2015, 300: 128-140. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.016.
- [23] Putker F, Bos MP, Tommassen J. Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(6): 985-1002. DOI: 10.1093/femsre/fuv026.
- [24] 吴玉文, 邓浩华, 孙家忠, 等. 达格列净联合双歧杆菌三联活菌胶囊治疗 2 型糖尿病患者对糖脂代谢和肠道菌群的影响[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(9): 882-886. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.09.005.
- [25] 曾凡清, 王月兴, 苟晓盼, 等. 炎症肠病患者病原学分析及其菌群变化与 ICAM-1、CRP 的相关性分析 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(12): 1333-1337. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2018.12.009.
- [26] Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 42. DOI: 10.1186/s13073-016-0303-2.
- [27] Li XQ, Cai LM, Liu J, et al. Liquiritin suppresses UVB-induced skin injury through prevention of inflammation, oxidative stress and apoptosis through the TLR4/MyD88/NFκB and MAPK/caspase signaling pathways[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42(3): 1445-1459. DOI: 10.1186/s13073-016-0303-2.
- [28] 李倩, 刘菁, 韩丁, 等. 高活菌数益生菌发酵乳联合肠内营养在颅脑损伤术后患者中的效果观察[J]. *中国医药*, 2018, 13(2): 224-226. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4777.2018.02.016.
- [29] Xu J, Chen HB, Li SL. Understanding the molecular mechanisms of the interplay between herbal medicines and gut microbiota[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2017, 37(5): 1140-1185. DOI: 10.1002/med.21431.
- [30] Yin XC, Peng JH, Zhao LP, et al. Structural changes of gut microbiota in a rat non-alcoholic fatty liver disease model treated with a Chinese herbal formula[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2013, 36(3): 188-196. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.12.009.
- [31] Chang CJ, Lin CS, Lu CC, et al. Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 7489. DOI: 10.1038/ncomms8489.

(收稿日期: 2019-09-27)

以贫血为首发症状的显微镜下多血管炎 1 例

杨艳君, 张东风

作者单位: 050031 石家庄, 河北医科大学附属河北省儿童医院肾脏免疫科

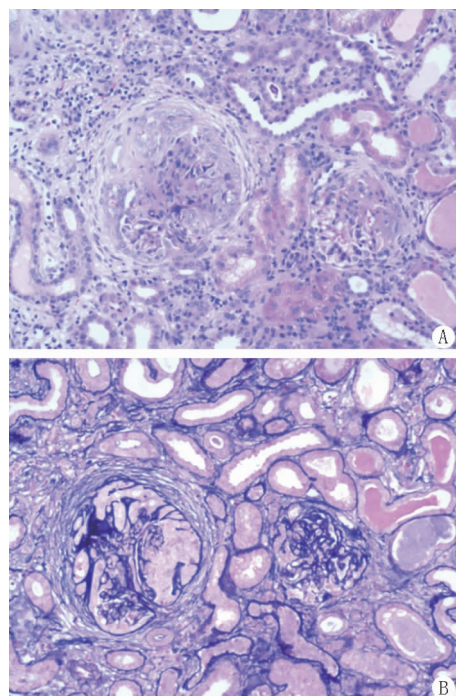
通信作者: 张东风, E-mail: yyj810811@163.com

【关键词】 显微镜下多血管炎; 贫血; 急性肾功能不全; 诊断; 治疗

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.018

患儿, 女, 10 岁, 主因面色苍白 2 个月余入院。患儿 2 个月余前无明显诱因出现面色苍白, 偶有乏力, 无发热、关节疼痛等不适, 未治疗。15 d 前就诊于当地医院, 查 Hb 90 g/L, 给予口服铁剂治疗。后患儿面色苍白加重, 1 d 前复查 Hb 53 g/L。为进一步治疗入院。查体: 血压正常, 面色苍白。血常规: WBC $6.4 \times 10^9/L$, RBC $2.16 \times 10^{12}/L$, Hb 54 g/L, MCV 78.2 fL; PLT $388 \times 10^9/L$; Ret 5.1%; 尿常规: 红细胞 269/HPF, 蛋白(++) , 尿蛋白定量 2.48 g/24 h; Coombs 试验阴性; 心肌酶: CK 198 U/L, LDH 285 U/L, α -羟基丁酸脱氢酶(HBDH) 234 U/L; 肾功能: 尿素 14.71 mmol/L, 肌酐 153 $\mu\text{mol/L}$, 肌酐清除率 $34.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$; 骨穿示增生性贫血骨髓象; 自身抗体阴性; 补体、免疫球蛋白正常; 抗核抗体阴性; 红细胞沉降率 54 mm/h; 血管炎四项: 抗髓过氧化物酶抗体(MPO-Ab) 阳性, 抗中性粒细胞浆抗体(pANCA) 阳性; 肺 CT 示双肺炎性反应。初步考虑: ANCA 相关系统性血管炎。给予大剂量甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗。行肾穿刺活检, 肾病理: 肾小球 18 个, 5 个小球球性硬化, 5 个细胞新月体, 4 个细胞纤维性新月体, 1 个纤维性新月体, 1 个盘状体形成; 肾小管上皮细胞颗粒、空泡变性, 较多管型, 片状萎缩, 部分小管上皮细胞刷状脱落; 肾间质多灶、片状淋巴单核细胞浸润伴纤维化, 见肉芽肿样结构; 小血管壁增厚, 管腔狭窄(图 1A)。免疫荧光: 肾小球 3 个, IgM(+), C3($\pm$), C4($\pm$), C1q($\pm$), FRA($\pm$), 局灶节段均质沉积, IgA、IgG 阴性(图 1B)。诊断为显微镜下多血管炎。序贯给予环磷酰胺冲击治疗。经治疗, 复查 Hb 99 g/L; 肾功能: 尿素 13.84 mmol/L, 肌酐 99 $\mu\text{mol/L}$, 肌酐清除率 $58.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$, 病情好转出院。出院后口服治疗量激素, 定期静脉滴注环磷酰胺, 患儿贫血纠正, 肌酐清除率升至 $60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$ 。但患儿尿蛋白定量无明显好转, 加吗替麦考酚联合激素、环磷酰胺治疗, 目前继续治疗中。

讨论 抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)相关系统性血管炎是由 ANCA 介导的寡免疫坏死性血管炎疾病, 主要包括韦格纳肉芽肿、显微镜下多血管炎(microscopic polyangiitis MPA)和变应性肉芽肿性血管炎^[1]。其中显微镜下多血管炎占大多数^[24]。临床可有多系统



注: A. HE 染色; B. PASM 染色

图 1 患儿肾穿刺活检病理检查($\times 100$)

损害, 肾脏最易受累, 其次为肺、血液系统^[5]。显微镜下多血管炎儿童发病较少, 多在青春前期(10~12 岁)后发病, 女性好发。本例患儿为 10 岁女孩, 以贫血为主要临床表现。入院后查肾功能异常, MPO-Ab 阳性, pANCA 阳性。肺 CT 示双肺炎性反应。肾穿刺示 ANCA 相关系统性血管炎性肾损伤。参照欧洲抗风湿病联盟和欧洲儿童风湿协会共识及美国风湿病学会 MPA 分类诊断标准^[6]: 坏死性血管炎, 无或有少许免疫复合物沉积, 主要累及小血管, 可有中小动脉受累的坏死性动脉炎, 常表现为纤维素样坏死性新月体肾炎和坏死性肺毛细血管炎, 无肉芽肿性炎症反应; MPO/pANCA 或 PR3/cANCA 阳性。本例患儿诊断为显微镜下多血管炎。该病临床进展快, 早期诊断较困难, 肾功能进行性加重。未治疗患儿 1 年病死率约 80%^[3]。显微镜下多血管炎, 肾脏病理突出特点是肾小球毛细血管袢坏死和新月体形成^[7]。无或仅有少量免疫复合物沉积, 常见为 IgM、

IgG、IgA 及补体 C3、补体 C1q 等。显微镜下多血管炎预后最主要因素是肾脏的损害及恢复,儿童常出现急性肾功能不全及终末期肾病。给予糖皮质激素联合环磷酰胺诱导治疗,疗程 3~6 个月^[1]。重症患者给予甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗,维持缓解疗程一般为 1~2 年。可选硫唑嘌呤、甲氨蝶呤等。该患儿肾穿刺病理可见大量新月体形成,肾功能异常,病情重,给予大剂量甲泼尼龙琥珀酸钠冲击治疗。经激素、环磷酰胺治疗后,肾功能较前好转,但尿蛋白无明显好转,加吗替麦考酚联合治疗。

肺是最常受累的肾外器官,55%~57% 有肺部受累。其他肾外器官受累表现还有发热、贫血、皮肤和眼耳损害、关节、肝脏和消化系统症状等。贫血常见,80%~95% MPA 患儿有正细胞正色素性贫血,贫血原因可能与肺出血或微血管溶血性贫血有关^[8]。本例患儿病初表现为轻度贫血,后进展为重度贫血入院。分析贫血进行性加重原因,不除外急性肾功能不全导致肾性贫血可能。pANCA 和 MPO-Ab 同时阳性,诊断 MPA 的特异性可达到 99%,且与肾脏受累严重有关^[1]。

显微镜下多血管炎肾脏最易受累,儿童出现急性肾功能不全及终末期肾病常见。严重贫血首发少见,如遇不明原因贫血,伴肾功能异常,应早期查 ANCA,积极肾穿刺活检,获得早期诊断,积极治疗,改善预后。

参考文献

- [1] 孙良忠,王海燕. 儿童显微镜下多血管炎诊治进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志,2017,32(5):333-337. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2017.05.004.
- [2] Lionaki S, Boletis JN. The prevalence and management of pauci-immune glomerulonephritis and vasculitis in western countries [J].

- Kidney Dis (Basel),2016,1(4):224-234. DOI:10.1159/000442.
- [3] Li ZY, Ma TT, Chen M, et al. The prevalence and management of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in China [J]. Kidney Dis (Basel),2016,1(4):216-223. DOI:10.1159/000441912.
- [4] Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U. K. [J]. Rheumatology,2011,50(10):1916-1920. DOI:10.1093/rheumatology/ker205.
- [5] 娜娜,姚勇,杨霁云,等. 儿童抗中性粒细胞胞浆抗体相关性系统性血管炎 15 例临床和病理回顾性分析 [J]. 中华儿科杂志,2013,51(4):283-287. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2013.04.009.
- [6] Ozen s,Ruperto N,Dillon MJ,et al. EuLAR/Pres endorsed consensus criteria for the classification of childhood vasculitides [J]. Ann Rheum Dis,2006,65(7):936-941. DOI:10.1136/ard.2005.046300.
- [7] 于峰,赵明辉,黄建萍,等. 少年儿童抗中性粒细胞胞浆抗体相关原发性系统性血管炎的临床和病理特点 [J]. 中华儿科杂志,2003,41(11):831-834. DOI:10.3760/j.issn:0578-1310.2003.11.008.
- [8] Jindal G, Cruz SD, Punia RP, et al. Refractory anemia as a presenting feature of microscopic polyangitis: A rare vasculitis in children [J]. Indian Journal of Pediatrics,2011,78(10):1287-1289. DOI:10.1007/s12098-011-0459-0.

(收稿日期:2019-09-09)

罕见病病例

血小板增多合并假性高钾血症 1 例

高雄一,顾恪波,王秋风,高琳

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院内科(高雄一),综合科(顾恪波、王秋风、高琳)

通信作者:高琳,E-mail:gaolin7654@sina.com

【关键词】 血小板增多;假性高钾血症

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.019

患者,男,72 岁。主因“双下肢水肿伴眼睑水肿 1 周”以“2 型糖尿病肾病 II 期”于 2018 年 10 月 31 日入住我院综合科。患者既往 2 型糖尿病病史 11 年,近期血糖控制不佳,11 月 1 日查 HbA_{1c} 10.3%。其他既往史:脑动脉硬化病史 5 年余;高脂血症、脂肪肝、左肾囊肿病史 7 年;高血压病病史 10 年,近期血压控制尚可;患者曾于 11 年前因右肺恶性肿瘤行右肺上叶切除术。自诉曾多次鼻出血,未系统诊疗。否认其他既往病史及食物药物过敏。入院当日实验室检查示:RBC 4.42×10¹²/L,Hb 126.0 g/L,WBC 38.23×10⁹/L,PLT 1 408.0×10⁹/L,白细胞分

类计数:中性分叶核 63.5%,中性晚幼粒 3.0%,中性杆状核 9.0%。血生化:K 6.85 mmol/L,Na 135.8 mmol/L,Cl 106.8 mmol/L,GLU 13.85 mmol/L,BUN 4.6 mmol/L,SCr 90 μmol/L,UA 509 μmol/L,ALB 36.1 g/L;凝血功能:D-D 0.62 mg/L,PT 14.9 s,Fib 3.29 g/L;快速血气分析:pH 7.377,PO₂ 72.0 mmHg,PCO₂ 36.6 mmHg,HCO₃⁻ 21.4 mmol/L,BE -3.6 mmol/L,SO₂ 94.4%;尿常规:尿蛋白 300 mg/dl,余未见异常;多导联心电图:窦性心律,正常范围心电图。

入院后检验科报血 K 6.85 mmol/L,初步分析:患者有糖尿

病史,但肾功能正常,尿酮体(-),暂不支持糖尿病酮症酸中毒或者慢性肾功能不全诊断,血钾升高原因暂不明确。白细胞及血小板明显升高,骨髓增殖性疾病可能性大,但因本院不能检测基因表型,不具备确诊条件,故先对症处理。入院当日予呋塞米片 20 mg 口服利尿排钾;5% 葡萄糖注射液 500 ml + 50% 葡萄糖注射液 40 ml + 胰岛素注射液 16 U 静脉滴注,同时监测血糖,2h 后测血糖 15.9 mmol/L,予胰岛素注射液再加 6 U;2 h 后再复查生化示:K 6.02 mmol/L,Na 135.0 mmol/L,GLU 14.01 mmol/L;RBC $4.24 \times 10^{12}/L$,Hb 118.0 g/L,WBC $34.82 \times 10^9/L$,PLT $1381.0 \times 10^9/L$,白细胞分类计数:中性分叶核 60.9%,中性晚幼粒 3.0%,中性杆状核 13.0%。1 h 后再测血糖 6.4 mmol/L,予停胰岛素观察。11 月 2 日中午复查生化再报危急值 K 7.39 mmol/L,即予呋塞米注射液 20 mg 入壶;5% 葡萄糖注射液 500 ml + 50% 葡萄糖注射液 40 ml + 胰岛素注射液 20 U 静脉滴注,聚苯乙烯磺酸钠(降钾树脂) 30 g 口服,每日 2 次。2 h 后复查 K 6.47 mmol/L。予行心电图检查未见高尖 T 波和/或 QT 间期缩短等高钾征象,且患者无乏力、恶心、心悸等相关症状,对症处理效果不佳,因此考虑假性高钾血症不排除。查阅相关文献并与检验科沟通后使用肝素抗凝试管再次复查生化,2 h 后生化回报(肝素抗凝试管):K 3.90 mmol/L,即停止降钾相关治疗。11 月 3 日复查生化(肝素抗凝试管):K 3.86 mmol/L。其后,非同日清晨以肝素抗凝试管复查血钾均为正常范围内(波动于 3.78 ~ 3.91 mmol/L 之间)。患者肾功能正常,近期末服用补钾药及保钾利尿药,回顾血钾水平及诊疗过程,可明确诊断为假性高钾血症。结合病史,原发病初步考虑为原发性血小板增多症可能性大,因本院条件限制,与家属谈话告知病情需要进一步转至血液病专科医院或综合医院血液科系统诊疗,患者于 2018 年 11 月 5 日转至专科医院行进一步治疗。

讨论 假性高钾血症(pseudohyperkalemia)最初在 1955 年由 Hartmann 和 Mellinkoff 报道,指体内实际血钾水平不高,因血液标本细胞遭遇机械性破坏等原因而释放出细胞内钾,导致血清钾较血浆钾增高 > 0.4 mmol/L,测得血清钾浓度 > 5.5 mmol/L^[1]。常见的假性高钾血症大多由于止血带使用、拍打静脉等采血方法不当,于补钾输液同侧采血和延迟送检等标本处置不当引起溶血以致细胞内钾离子释放,由于血红蛋白和乳酸脱氢酶可同时从破坏的细胞中释放出来,故此种现象可被常规的化学检验发现并报道^[2-4]。

假性高钾血症病因:(1)原发性血小板增多症。是由于数量众多的血小板聚集、破坏后释放钾离子导致高钾。当用肝素抗凝试管后,不易凝血,血小板聚集释放反应不明显,故可更准确反映体内真实血钾水平^[5]。(2)真性红细胞增多症。血黏滞度增高,血液凝集过程中释放钾离子;有研究者认为红细胞增多导致血中葡萄糖酵解加速,ATP 生成减少,红细胞膜上 Na^+ -

K^+ -ATP 酶活性降低,胞内钾离子释出胞外^[6]。(3)各种白血病、炎症反应导致的白细胞大量增多。白细胞大量增多可致血糖被快速消耗,ATP 生成减少,红细胞膜上的 Na^+ - K^+ -ATP 酶活性降低,致细胞内 K^+ 释出胞外,可出现假性低血糖伴假性高钾血症^[7];在使用气动物流传输系统(PTS)传输标本的医院,由于白细胞细胞膜脆性大、不稳定,在 PTS 运输过程中受到急剧加、减速及碰撞的影响而损伤破裂后 K^+ 外漏^[8-9]。(4)家族性高钾血症。比较罕见报道,是一种常染色体显性遗传性疾病,可能是由于红细胞膜对钾离子的渗透性增加导致假性高钾^[10]。

因此,在临床中应提高假性高钾血症的认识,以避免误诊或导致医源性低钾血症。遇到无典型症状的高钾血症病例时应加以鉴别是否为假性高钾血症,通过肝素抗凝试管对照监测血浆钾可能是一种快速、有效的鉴别手段(尤适于伴血小板增多的患者)。同时应根据患者的血常规、现病史、既往史和家族史等资料进一步鉴别诊断导致假性高钾血症的原发疾病。

参考文献

- [1] Meng QH, Wagar EA. Pseudohyperkalemia: A new twist on an old phenomenon[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015,52(2):45-55. DOI: 10.3109/10408363.2014.966898.
- [2] 包仁君. 血液内科临床常见假性检验结果概述[J]. 养生保健指南,2018,(32):34. DOI:10.3969/j.issn.1006-6845.2018.32.031.
- [3] 张光宏,李玲. 血小板增多导致假性高血钾 1 例并文献复习[J]. 黑龙江医药,2017,30(6):1333-1334. DOI: 10.14035/j.cnki.hljyy.2017.06.074.
- [4] 李琳琳,闫春林,焦琳琳,等. 1 例原发性血小板增多症致假性高钾血症合并心力衰竭高龄患者的护理[J]. 护理学杂志,2017,32(3):34-36. DOI:10.3870/j.issn.1001-4152.2017.03.034.
- [5] 徐佳岱,朱华渊,伏媛,等. 原发性血小板增多症合并假性高钾血症一例并文献复习[J/OL]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,(12):5671-5673.
- [6] 余长发,李湘成,胡燕琴,等. 红细胞增多引起假性血钾升高 1 例分析[J]. 实验与检验医学,2016,34(3):407-408. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2016.03.052
- [7] 李发爵,李湘成,胡燕琴. 白细胞增多引起假性低血糖和假性高血钾 1 例分析[J]. 实验与检验医学,2017,35(4):633-634.
- [8] Ku AS, Chen RH, Law RL. Pseudohyperkalaemia with acute leukaemia: association with pneumatic tube transport of blood specimens[J]. Hong Kong Med J, 2014,20(2):158-160. DOI: 10.12809/hkmj133881.
- [9] 高冉,夏良裕,程琼琦,等. 气动物流传输系统致白血病患者假性高钾血症[J]. 协和医学杂志,2017,8(1):9-13.
- [10] 陈耀华. 家族性假性高钾血症一种新的综合征[J]. 右江卫生,1980,8(1):83-85.

(收稿日期:2019-10-25)

小檗碱在抗动脉粥样硬化中的作用机制研究进展

杨蒙香, 张乐综述 刘聪审校

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2015020540); 辽宁省博士科研启动基金(201601132)

作者单位: 110022 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院第二内分泌科

通信作者: 张乐, E-mail: zhangle198626@163.com

【摘 要】 小檗碱(BBR)是在黄柏、黄连等植物中发现的一种异喹诺酮类生物碱,被广泛应用于中药中,作为治疗痢疾和感染性腹泻的一种抗菌药。具有抗炎、抗病毒、抗真菌和抗癌作用,对糖尿病和动脉粥样硬化也有作用。近来研究显示 BBR 可以从调节肠道菌群、调节血脂、抗氧化应激、抗炎、下调内脂素表达及抑制血管平滑肌增殖等方面改善动脉粥样硬化,但其作用机制尚未完全阐明,文章就 BBR 抗动脉粥样硬化的可能作用机制作一综述。

【关键词】 小檗碱;动脉粥样硬化;作用机制;综述

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.020

Mechanism research progress of berberine in anti-atherosclerosis. Yang Mengxiang, Zhang Le, Liu Cong. Department of Endocrinology, Shengjing Hospital, China Medical University, Liaoning Province, Shenyang 110022, China

Corresponding author: Zhang Le, E-mail: zhangle198626@163.com

Funding program: Liaoning Natural Science Foundation (2015020540); Liaoning Provincial Doctoral Research Initiation Funding (201601132)

【Abstract】 Berberine (BBR) is an isoquinoline alkaloid found in cortex Phellodendron and coptis. It is widely used in traditional Chinese medicine as an antibiotic for dysentery and infectious diarrhea. It has been reported to have anti-inflammatory, antiviral, antifungal and anticancer effects, as well as beneficial effects on diabetes and atherosclerosis. Recently, more and more studies suggest that BBR can from regulating intestinal flora, regulating blood fat, resisting oxidative stress, anti-inflammation, cut fat, expression and inhibiting proliferation of vascular smooth muscle, etc., to improve the atherosclerosis, but its improving the mechanism of atherosclerosis has not been fully elucidated, BBR was reviewed under the possible mechanisms of resistance to hardening of the arteries.

【Key words】 Berberine; Atherosclerosis; Mechanism; Review

动脉粥样硬化(AS)是目前心脑血管疾病的主要原因,其发病机制至今仍未阐明。动脉粥样硬化发生发展的病理生理机制包括脂质浸润、血小板活化、血栓形成、内膜损伤、炎症反应、氧化应激、血管平滑肌细胞激活等^[1]。

小檗碱(BBR)又称黄连素,是在黄柏、黄连等植物中发现的一种异喹诺酮类生物碱。BBR 在国内临床上长期认为是治疗细菌性腹泻的抗菌药物^[2]。随着进一步深入研究发现小檗碱具有降脂作用^[3],因此,国内外学者就其降脂及在动脉粥样硬化各环节的作用进行了研究。研究证实,小檗碱可以从调节肠道菌群、调节血脂、抗炎、抗氧化应激、下调内脂素表达及抑制血管平滑肌细胞增生等方面发挥作用,从而发挥抗 AS 作用。现对 BBR 抗动脉粥样硬化的可能机制及进展作一综述。

1 调节肠道菌群

近来已有研究表明,BBR 可以通过调节肠道微生物发挥抗肥胖作用^[4]。而且,有研究显示心血管疾病患者的肠道菌群分布与健康人不同^[5-6]。近年来,越来越多的证据表明,肠道微生物能调节代谢途径和代谢产物。氧化三甲胺(TMAO)是肠道微生物代谢产物三甲胺经肝含黄素单氧化酶(FMO3)代谢而产生的氧化产物,它在动脉粥样硬化的进展中发挥重要作用^[7-9]。TMAO 可通过引起血管炎性反应、单核细胞-内皮细胞相互作用和内皮功能障碍从而引发 AS 发展^[10]。此外,TMAO 能够促进泡沫细胞的形成和动脉粥样硬化斑块的进展^[11-12]。Shi 等^[13]研究发现,高脂饮食喂养小鼠可增加 FMO3 的表达,而 BBR 治疗可降低 FMO3 的表达,提示 BBR 可以通过介导 TMA-FMO3-TMAO 通路抑制动脉粥样硬化的发生发展。并且还发现高脂饲

料喂养的小鼠和正常饲料喂养的小鼠肠道菌群存在差异,而且 BBR 组与高脂饮食组的肠道菌群组成不同。同样,实验认为 BBR 可以通过调节肠道微生物群来降低高脂饮食诱导的动脉粥样硬化。这一发现支持肠道微生物群落与动脉粥样硬化进展相关的结论。而且,研究显示 TMAO 水平与脑血管疾病(CVD)风险相关^[10]。此外,Sun 等^[14]研究结果显示:口服 BBR 通过改变微生物胆汁酸代谢和肠道 FXR 信号通路调节肝脏脂质代谢。而且,学者推测口服 BBR 的药理作用是通过 BBR 介导肠道菌群调控发挥的。也有证据表明 BBR 通过减少梭状芽孢杆菌直接改变肠道微生物区系,随后改变了肠道 FXR 信号^[15]。同时有研究证实,BBR 治疗增加了肠道中的 *Akkermansia* 细菌,从而改善了载脂蛋白 E(ApoE)基因敲除小鼠高脂饮食引起的动脉粥样硬化^[16]。研究亦发现口服 *Akkermansia* 通过改善主动脉和全身代谢性炎症反应,显著降低了高脂饮食诱导的动脉粥样硬化^[17]。因此,调节肠道微生物群的组成可能是未来预防动脉粥样硬化的一种药理学方法,而 BBR 可能是调节肠道菌群的一种新型药物。

2 调节脂质代谢

脂质浸润是 AS 的发病机制之一。当含有胆固醇的低密度脂蛋白(LDL)在内膜中积聚并激活内皮细胞时,动脉粥样硬化过程启动。脂质可被认为是 AS 炎症反应过程的触发因素。临床和流行病学观察一致证明 LDL-C 浓度与动脉粥样硬化呈正相关^[18]。研究表明,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)是导致 AS 发生的重要因素,其在血管内膜下堆积,破坏血管内皮细胞,产生泡沫细胞,诱导血管壁发生慢性炎症反应,从而进一步促使 AS 的发生。Kong 等^[19]将 68 例高脂血症患者按治疗方法分为 BBR 组和安慰剂组,研究结果表明,BBR 组与安慰剂组相比血浆总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平分别下降 21.41%、26.40%、28.22%,BBR 治疗前后差异有统计学意义($P=0.000$)。BBR 口服耐受性好,对肾功能无不良反应。此外,它可以改善肝功能。其降血脂机制与提高 LDL 受体表达作用有关。相关研究显示,BBR 可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)来抑制肝细胞的脂质合成,从而降低血浆胆固醇。Wang 等^[20]通过小鼠动脉粥样硬化的解偶联实验发现,BBR 可激活 AMPK 通路,增加 LDL 受体的表达,从而改善动脉粥样硬化小鼠的脂质代谢。也有研究表明,BBR 可通过激活细胞外信号调节激酶(ERK)途径稳定 LDL 受体 mRNA,从而增加肝细胞中 LDL 受体的表达^[21]。还

有研究表明,BBR 通过原蛋白转化酶(PCSK9)—LDL—受体通路促进 LDL 受体表达^[22]。肝细胞内的 PCSK9 将细胞表面的 LDL 受体转向溶酶体降解,BBR 抑制 PCSK9 的表达。而且,BBR 加速肝细胞的退化核转录因子 1 α (HNF-1 α)蛋白介导 PCSK9 基因转录。此外,Shi 等^[13]研究结果表明,BBR 可以通过调节脂代谢从而显著改善 ApoE 基因敲除小鼠中西方饮食诱导的动脉粥样硬化。也有研究发现,BBR 治疗可明显降低 LDL-C、TC、TG 及载脂蛋白的水平,减少脂质过氧化及增强超氧化物歧化酶(SOD)的活性。迄今为止报道的 BBR 调节脂质代谢的各种机制主要集中在影响肠道胆固醇吸收、LDL 受体介导的 LDL 胆固醇清除和胆固醇分解代谢。这些机制是相互调节的,到目前为止,它们之间的关系和相互作用尚不清楚,这意味着观察到的效果可能是对多个过程起作用的结果。

3 抗炎作用

炎症反应在动脉粥样硬化的发病机制中起着至关重要的作用。促炎细胞因子主要由动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞分泌。如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)在动脉粥样硬化的发生和加速中发挥重要作用。相关研究显示,BBR 可以抑制巨噬细胞中 TNF- α 、MCP-1、IL-6 的表达和分泌。另外,转录因子激活子蛋白-1(AP-1)可以调控 IL-6 和环氧化酶-2(COX-2)等多种炎症因子的表达。还有研究显示,BBR 能通过抑制 AP-1 的转录活性,从而抑制炎症因子的表达和 AS 的发生^[23]。此外有研究发现,BBR 抗动脉粥样硬化的活性也依赖于 AMPK 的激活。有研究显示在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中,BBR 通过激活 AMPK 和增加巨噬细胞自噬来发挥抗炎作用^[24]。BBR 可以抑制炎症因子的表达,其机制包括 3 个部分:(1) BBR 可以抑制中性粒细胞的表达趋势,阻止黏附分子的表达;(2) 通过抑制 AP-1 调控炎症反应区前列腺素 I₂(PGI₂)和血栓素 A₂(TXA₂)的表达;(3) 通过抑制 PGI₂ 和 TXA₂ 的组成,可以保持 PGI₂ 和 TXA₂ 的平衡^[25-26]。此外,有研究证实,BBR 可通过抑制 NF- κ B 信号通路,从而降低 TNF- α 和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的水平,发挥抗炎作用^[27]。

4 抗氧化应激

LDL 过氧化是 AS 发生的中心环节,ox-LDL 促使黏附因子及多种炎症因子表达,诱导单核细胞进入动脉内膜并转化为巨噬细胞,诱导内皮细胞、平滑肌细胞增生、移行,促进血小板黏附、聚集及血栓形成,抑制一氧化氮(NO)的释放,从而启动及加速 AS 的发生。有

研究显示,BBR 治疗可以通过 SIRT1 信号通路来降低心脏超氧化物生成、gp91phox 表达及丙二醛(MDA)的浓度,同时增加 SOD 的活性,发挥其抗氧化作用^[28]。还有研究表明,BBR 的抗氧化能力主要取决于其对 Nrf2 信号通路的影响,减少 NADPH 氧化酶 2(NOX₂)依赖的活性氧(ROS)生成和线粒体 ROS 的产生从而增强抗氧化防御系统,保护机体免受氧化损伤^[29]。BBR 不仅可以抑制与谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、SOD 超活化相关的脂类氧化(TBARS),也可以抑制 NO 的生成和 DPPH 的氧化,而且这些特性以浓度依赖的方式发挥作用。此外,研究发现高同型半胱氨酸血症(Hcy)具有氧化应激作用,其氧化会产生大量的中间物质,如生成的自由基及过氧化氢抑制 NO 的合成与释放,继而导致血管功能障碍,使血管内皮受损,从而引起 AS。Li 等^[30]研究结果显示,Hcy 小鼠经 BBR 处理后动脉粥样硬化斑块稳定性增加,主要是因为 BBR 通过激活 PPAR γ 信号通路抑制氧化应激,从而改善内皮功能和增强动脉粥样硬化斑块的稳定性。而且,体外和体内同型半胱氨酸硫内酯(HTL)诱导的内皮功能障碍均被 BBR 逆转,而且呈剂量依赖性。

5 抑制血管平滑肌细胞增殖

血管平滑肌细胞(VSMC)是动脉粥样硬化斑块的主要成分,动脉中膜的 VSMC 迁入内膜,吞噬脂质形成肌源性泡沫细胞,增生迁移形成纤维帽,是形成动脉粥样硬化纤维斑块的重要环节。有研究发现 BBR 在 G0 和 G1/M 期阻断细胞周期,对 VSMC 具有抑制增殖作用。G1 抑制的机制与细胞周期蛋白 D1 的减少有关。进一步的结果表明,BBR 可以通过延迟或使部分 Akt 通路的激活来抑制血管紧张素 II(AngII)和肝素结合表皮生长因子(HB-EGF),并抑制 VSMC 增殖和迁移。然而,有研究表明,BBR 通过失活 ERK/Egr-1 信号通路和降低下游靶点(Egr-1、c-Fos、cyclin D1 和 PDGF-A)的表达,阻断损伤诱导的 VSMC 再生^[31]。而且,Liang 等^[32]发现 BBR 通过激活 AMPK/p53/p21(Cip1)信号来抑制血小板衍生生长因子(PDGF)诱导的 VSMC 生长,同时通过抑制 Ras/Rac1/Cyclin D/Cdks 来抑制 PDGF 刺激的迁移。这些观察结果为 BBR 的抗增殖和抗迁移特性提供了分子解释。此外,国内有研究发现,BBR 抑制溶酶体诱导的 VSMCs DNA 合成和细胞增殖,抑制溶酶体刺激的 VSMCs 迁移。它还能抑制细胞外信号调节激酶(ERKs)的激活,降低转录因子 AP-1 的活性,以及溶解氧诱导的细胞内活性氧种类(ROS)的增加^[33]。此外,有研究发现,BBR 可通过激活 AMPK 信号通路降低 ox-LDL 诱导的炎症反应,间接

抑制 VSMC 的增殖和迁移,而且 BBR 呈剂量和时间依赖性^[34]。

6 下调内脂素的表达

内脂素(visfatin)是一种长度为 52 kDa 的促炎因子,具有潜在胰岛素样脂肪因子的作用,由浸润脂肪组织的巨噬细胞表达,并在炎症反应信号的作用下产生^[35]。其可作为 AS 形成、内皮功能紊乱、血管损伤的临床标志物^[36]。近年来,visfatin 已成为 CVD 患者诊断和风险分层最可靠、最具吸引力的生物标志物之一,被认为是颈动脉内膜增厚(IMT)的独立危险因素^[37]。visfatin 与代谢综合征呈正相关,此外还与炎症细胞因子有关,如 IL-6 和 TNF- α ,这些细胞因子促进炎症反应和动脉粥样硬化的进展^[38]。另外有研究显示,visfatin 可显著降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的稳定性^[39]。还有研究显示,在一定浓度范围内,小檗碱以浓度和时间依赖性的方式促进离体脂肪细胞 visfatin mRNA 及蛋白表达。

7 小结与展望

目前 AS 仍是心脑血管疾病发生发展的主要原因,预防 AS 的发生已成为当下热点。然而 AS 的形成是多因素相互作用的进行性疾病。因此,在动脉粥样硬化的研究中,应从多途径、多环节、多靶点深入研究。综上所述,BBR 可能是通过调节肠道菌群、减少炎症反应、下调内脂素表达、调节血脂及抗氧化应激等发挥抗动脉粥样硬化作用。但目前对小檗碱药理作用的了解还不够全面与透彻,BBR 的抗动脉粥样硬化研究仍处于实验阶段,尚未确定最佳剂量。因此,仍需要更深入的研究及实验来探讨小檗碱抗动脉粥样硬化的作用机制,以及应用 BBR 的临床安全性及有效性。

参考文献

- [1] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes [J]. Int J Prev Med, 2014, 5(8): 927-946.
- [2] Ju JQ, Li J, Lin Q, et al. Efficacy and safety of berberine for dyslipidaemias: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. Phytomedicine, 2018, 50: 25-34. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.212.
- [3] Dong Y, Chen YT, Yang YX, et al. Metabolomics study of type 2 diabetes mellitus and the antiDiabetic effect of berberine in Zucker diabetic fatty rats using Uplc-ESI-Hdms [J]. Phytotherapy Res, 2016, 30(5): 823-828. DOI:10.1002/ptr.5587.
- [4] Zhang X, Zhao YF, Xu J, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14405. DOI: 10.1038/srep14405.
- [5] Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut micro-

- biota and coronary artery disease[J]. *Atheroscler Thromb*, 2016, 23 (8): 908-921. DOI: 10.5551/jat.32672.
- [6] Emoto T, Yamashita T, Kobayashi T, et al. Characterization of gut microbiota profiles in coronary artery disease patients using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism: gut microbiota could be a diagnostic marker of coronary artery disease [J]. *Heart Vessels*, 2017, 32 (1): 39-46. DOI: 10.1007/s00380-016-0841-y.
 - [7] Santos-Marcos JA, Perez-Jimenez F, Camargo A. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome[J]. *Nutr Biochem*, 2019, 70: 1-27. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.017.
 - [8] Tang WHW, Bäckhed F, Landmesser U, et al. Intestinal microbiota in cardiovascular health and disease: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73 (16): 2089-2105. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.03.024.
 - [9] Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: A systematic review and dose-response meta-analysis[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38 (39): 2948-2956. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx342.
 - [10] Sun X, Jiao X, Ma Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 in amasome Biochem[J]. *Biophys Res Commun*, 2016, 481 (1-2): 63-70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.017.
 - [11] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472 (7341): 57-63. DOI: 10.1038/nature09922.
 - [12] Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2013, 19 (5): 576-585. DOI: 10.1038/nm.3145.
 - [13] Shi YF, Hu JX, Geng J, et al. Berberine treatment reduces atherosclerosis by mediating gut microbiota in apoE^{-/-} mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1556-1563. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.148.
 - [14] Sun R, Yang N, Kong B, et al. Orally Administered Berberine Modulates Hepatic Lipid Metabolism by Altering Microbial Bile Acid Metabolism and the Intestinal FXR Signaling Pathway[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91 (2): 110-122. DOI: 10.1124/mol.116.106617.
 - [15] Tian Y, Cai JW, Gui W, et al. Berberine directly affects the gut microbiota to promote intestinal farnesoid X receptor activation[J]. *Drug Metab Dispos*, 2019, 47 (2): 86-93. DOI: 10.1124/dmd.118.083691.
 - [16] Zhu L, Zhang D, Zhu H, et al. Berberine treatment increases Akkermansia in the gut and improves high-fat diet-induced atherosclerosis in ApoE mice[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 268: 117-126. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.023.
 - [17] Li J, Lin SQ, Vanhoutte PM, et al. Akkermansia muciniphila protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in ApoE^{-/-} mice [J]. *Circulation*, 2016, 133 (24): 2434-2446. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019645.
 - [18] Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review) [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 71: 40-56. DOI: 10.1016/j.vph.2015.03.005.
 - [19] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (12): 1344-1351. DOI: 10.1038/nm1135.
 - [20] Wang QL, Zhang M, Liang B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice: the role of uncoupling protein 2 [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e25436. DOI: 10.1371/journal.pone.0025436.
 - [21] Li XY, Zhao ZX, Huang M, et al. Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13 (1): 278. DOI: 10.1186/s12967-015-0629-3.
 - [22] Xiao HB, Sun ZL, Zhang HB, et al. Berberine inhibits dyslipidemia in C57BL/6 mice with lipopolysaccharide induced inflammation [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64 (4): 889-895. DOI: 10.1016/s1734-1140(12)70883-6.
 - [23] Paterniti I, Impellizzeri D, Cordaro M, et al. The anti-inflammatory and antioxidant potential of pistachios (pistacia vera L.) in vitro and in vivo [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (8): E915. DOI: 10.3390/nu9080915.
 - [24] Mitra S, Goyal T, Mehta JL. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25 (5): 419-429. DOI: 10.1007/s10557-011-6341-5.
 - [25] Yang ZY, Li J, Xiong FX, et al. Berberine attenuates high glucose-induced fibrosis by activating the G protein-coupled bile acid receptor TGR5 and repressing the S1P2/MAPK signaling pathway in glomerular mesangial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 346 (2): 241-247. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.06.005.
 - [26] Jeong Y, You D, Kang HG, et al. Berberine suppresses fibronectin expression through inhibition of c-Jun phosphorylation in breast cancer cells [J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21 (1): 21-27. DOI: 10.4048/jbc.2018.21.1.21.
 - [27] Li Z, Geng YN, Jiang JD, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 289264. DOI: 10.1155/2014/289264.
 - [28] Zhao Y, Tian XF, Liu GF, et al. Berberine protects myocardial cells against anoxia-reoxygenation injury via p38 MAPK-mediated NF- κ B signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17 (1): 230-236. DOI: 10.3892/etm.2018.6949.
 - [29] Ashrafzadeh M, Fekri HS, Ahmadi Z, et al. Therapeutic and biological activities of berberine: The involvement of Nrf2 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 121 (2): 1575-1585. DOI: 10.1002/jcb.29392.
 - [30] Li HJ, He CY, Wang JY, et al. Berberine activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma to increase atherosclerotic plaque stability in ApoE mice with hyperhomocysteinemia [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7 (6): 824-832. DOI: 10.1111/jdi.12516.

全膝关节置换术金属植入物并发症的研究进展

韩广弢, 高冯综述 李皓桓审核

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171760); 湖北省自然科学基金资助项目(2017CFB700)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院骨科

通信作者: 李皓桓, E-mail: Lihaoquan@ sina. com

【摘 要】 临床上常错误地将术语“超敏”和“过敏”同义使用, 尽管存在某种关系, 但未发现因过敏而导致全膝关节置换术植入物失败的任何证据。但是, 越来越多的证据表明, 松动与金属离子产生存在联系。这不是过敏反应, 而是潜在的问题。在缺乏证据的情况下, 对于全膝关节置换术中使用金属后存在皮肤敏感性的患者, 没有理由使用“低变应原性”植入物。现就有关过敏和超敏反应是否与全膝关节置换术植入物选择有关的相关文献进行综述。

【关键词】 全膝关节置换术; 植入物; 过敏反应; 金属离子

【DOI】 10. 3969 / j. issn. 1671-6450. 2020. 04. 021

Research progress of complications of metal implants in total knee arthroplasty Han Guangtao, Gao Feng, Li Hao-huan. Department of Orthopedics, People's Hospital of Wuhan university, Hubei Province, Wuhan 430060, China
Corresponding author: Li Hao-huan, E-mail: lihaohuan@ sina. com

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81171760); Natural Science Foundation of Hubei Province (2017CFB700)

【Abstract】 The term "hypersensitivity" and "hypersensitivity" are often used synonymously in clinical practice. Although there is a certain relationship, no evidence of the failure of total knee arthroplasty implants due to hypersensitivity has been found. However, more and more evidences show that loosening is related to the production of metal ions. It's not an allergic reaction, it's a potential problem. In the absence of evidence, there is no reason to use "hypoallergenic" implants in patients with skin sensitivity following the use of metal in total knee arthroplasty. This article reviews the literature on whether hypersensitivity and hypersensitivity are related to implant selection in total knee arthroplasty.

【Key words】 Total knee replacement; Implant; Allergy; Metal ions

金属植入物广泛用于外科手术, 包括骨科、心胸外科、血管和颌面外科及牙科^[1-2]。虽然许多个例报道相关的金属植入物对局部和全身的影响, 但是缺乏有力的证据来支持或反驳是由过敏反应引起的。尚有少数病例报道在对植入物有过敏反应的标准 TKA 中, 认为“低变应原性”植入物与症状的缓解有关。鉴于对髌关节置换术中金属植入物存在的问题仍不清楚。在某些国家或地区, 人们已经接受了可能存在金属相关植入物过敏的证据, 如澳大利亚人工关节置换登记册表明, 金属超敏反应是 2012 年登记册中髌关节置换术的第五大常见反应, 占有置换问题的 5.9%。在 2014 年的报告中, 措词从“金属敏感性”改为“金属相关病理学”, 与该术语相关的全髌关节置换术 (THA) 达 0.5%。2012 年 TKA 的术语更改与金属敏感性相同, 导致全膝关节置换术产生的原因为 1.3%; 2014 年, 将

TKA 的 1.8% 归因于“金属相关病理学”^[3]。该术语仍然令人困惑, 两极化的观点表明, 对于金属过敏作为一种与植入物有关的深层现象存在分歧。文章旨在研究文献并探讨潜在的过敏机制。

1 过敏反应

过敏反应属免疫系统超敏性疾病的复杂范围, 它是对通常无害物质的过度反应。关于超敏反应的过敏经典定义是免疫学介导的 I 型反应。由于抗原与 IgE 交联导致肥大细胞脱粒和释放血管活性生物分子, 而这种反应在数秒至数分钟即可发生, 因此发生了该反应。这种由 IgE 介导的反应不会因金属植入物而发生, 以往未出现金属假体植入后的过敏反应。聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 被认为是使用胶黏剂固定后死亡的过敏反应原因^[4]。很难证明这一联系, 因为术后心血管衰竭被公认是骨水泥植入综合征。金属粒子本身

不会刺激免疫系统,但必须与蛋白质发生交叉反应,然后复合物可以作为能够引起免疫应答中 T 细胞介导的超敏性反应。动态磨损植入物中的金属磨损碎片可能会因预期和非预期的轴承表面的相互作用而发生,以及金属与组织中所含液体不可避免地腐蚀而产生金属离子。静电植入物由于与潮湿的组织接触而腐蚀,同样可以产生金属离子,而不会产生磨损颗粒。已证明金属碎片不仅位于植入物周围组织中,而且还迁移至与金属碎片全身性扩散相一致的关节外组织,包括骨髓、淋巴结和肝脏,引发过敏反应的产生^[5]。

1.1 金属离子的局部效应 比皮肤症状发展更严重的问题可能是金属超敏性对植入物骨界面不可观察的局部作用^[6]。聚乙烯碎片已被深入研究,导致松动的途径早已建立^[7]。在髋关节置换中,植入物松动最大预测因素是聚乙烯的线性磨损率每年 $>0.1\text{ mm}$ 。聚合物碎片会激活先天或非特异性免疫系统。这种类型的免疫反应是防御性免疫系统的第一道防线,最初不包括过敏反应途径,因该途径涉及淋巴细胞。免疫系统对关节成形术失败的反应的公认理解是,颗粒物质会引起先天性或非特异性反应。先天免疫系统的功能既是宿主的第一道防线,又是向特定或适应性免疫系统的抗原呈递。研究证明,淋巴细胞种群的适应性反应是金属诱导的直接结果。适应性免疫系统是细胞介导的,并通过特定抗原刺激或激活后利用其他细胞系的吸引力^[8]。

金属碎片和其他颗粒物质的局部影响并非总是可预测的,但是已对颗粒的生物反应性进行了一些概括:炎性反应与颗粒负荷呈正比;金属颗粒比聚合物碎片更具促炎性;产生磨损颗粒会通过巨噬细胞摄取引起破骨细胞活化。

核因子 κB 受体激活剂是激活骨破骨细胞吸收的最终通用途径,继而由促炎性激活因子如白介素 1β 、 $\text{TNF}\alpha$ 、 IL-6 和前列腺素 E_2 (PGE_2) 引起种植体周围骨溶解^[9]。这种情况发生在与聚乙烯碎片相关的骨溶解中,并且金属碎片可以通过不同的途径诱导类似的促炎因子。聚乙烯是所有塑料中含量最多的一种,似乎与引起接触性皮炎无关,到目前为止,还未发现存在聚合物过敏^[10]。这些促炎因子不仅上调破骨细胞活化,而且还可下调成骨细胞作用。有研究对巨噬细胞诱发的炎性反应程度进行了分析,证明金属材料大小和颗粒不规则性增加了巨噬细胞摄入金属合金颗粒引发的炎性反应^[11]。

1.2 金属植入物的局部和全身反应 内部金属装置是否会引起类似于经典接触性皮炎的局部和全身性皮

肤表现。真皮的朗格汉斯细胞已被认为与皮肤超敏反应相关的主要抗原呈递细胞(APC)。目前尚不清楚该细胞系是否负责植入相关的超敏反应。潜在的抗原递呈细胞(APC)包括巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞、朗格汉斯细胞、树突状细胞和实质组织细胞,其中一些可能与释放的金属离子和颗粒的传播有关。TKA 后皮肤反应的发展已被标记为过敏反应,而且有研究指出,翻修关节后已显示出症状缓解。然而,这些证据之间没有任何因果关系^[12]。同样,在术前对金属敏感的患者中,TKA 后皮肤表现与发展之间没有联系。在一项前瞻性研究 TKA 和术前金属敏感性测试中,显示 26% 患者术前表现为改良的淋巴细胞刺激试验(MLST)阳性^[13]。在这 5 种发生的湿疹反应中(3 处局限在膝盖上,2 处普遍发生在植入物上方),在术前均为 MLST 阳性。2 例患者重新翻修关节以缓解症状,并且其 MLST 从阳性变为阴性。但是,未行其他手术的另外 3 例患者的症状逐渐消失,并且 MLST 阳性也有所逆转。其研究中大多数术前对金属 MLST 阳性的患者未出现任何皮肤反应。共有 8 例患者具有金属敏感性和阳性检测史,而 11 例患者没有敏感性检测史,只有 2 项阳性的术前检测是男性(22 例女性术前 MLST 阳性)^[14]。虽然可能存在细胞和免疫学机制,但该途径尚未建立且尚未证明其临床意义。皮肤反应的治疗首先应为皮质类固醇激素的局部治疗,治疗效果良好^[9]。

2 金属植入物选择

有学者通过德尔菲研究的共识支持了针对已证明具有金属超敏性的患者选择使用标准植入物^[15],认为无论患者是否报告或已确认斑贴试验,均应使用标准植入物,而不论金属是否过敏。其他人将使用低变应原性股骨组件和全聚乙烯胫骨组件,用于报告金属过敏并在实验室测试中呈阳性的患者^[16]。对变态反应的最全面的系统评价得出结论,应对有金属过敏史的患者进行过敏反应测试,并建议一种治疗方式,其中包括测试不使用植入物患者可能表现出过敏反应的成分,这并非来自系统评价或荟萃分析,而是作者表达的观点^[17]。

毫无疑问,金属植入物,无论是静态的还是动态的,都会产生会引起局部反应的磨损碎片^[18]。该局部反应与剂量无关或不可预测,因此并非单纯碎片的毒性作用,而是可能是由于免疫宿主过程。因此,存在对金属的超敏反应,但目前尚不能说是过敏反应。对金属碎片的反应可能引起松弛的可能性远大于皮肤表现问题。在某种程度上已经建立了这种机制,但尚未在

临床中得到证实。鉴于金属在关节置换术中的问题,研究集中在髌关节置换上,金属碎屑的负载量显然有所不同,这很可能代表与过敏完全不同的情况。

3 金属植入物松动

TKA 术后组织的分析表明,经过置换的膝盖种植体周围组织中存在高水平的 T 淋巴细胞导致翻修,翻修的原因不是感染或错位^[19-22]。颗粒物和可溶性物质均会引起炎症反应,这是公认的过程,会引起骨溶解,从而导致植入物的无菌松动。可能是由于对颗粒和非颗粒碎片的反应增强,一些人更容易出现松动的风险,但是这种反应是否是过敏尚待确定。

在组织学上,延迟型超敏反应的局部组织反应被描述为血管周围淋巴细胞浸润(PVLI)和弥散性淋巴细胞浸润(DLI)^[23-24],已被证实均与延迟型超敏反应有关。在 242 例翻修的 TKA 回顾性研究中,组织样品用于 PVLI 和 DLI 组织学分析,40% 患者发现有一定程度的 PVLI 产生。在 THA 翻修的组织中证实了类似的血管周围组织类型,原因是金属植入物失效^[25]。在金属髌关节置换上对金属的局部组织反应与延迟型超敏反应有关,这种迟发型超敏反应与金属髌关节上的金属失效有关。德国共识小组已对骨膜周围组织进行了深入研究。修改后的分类包括其推测与碎片过敏反应有关的组织类型,并包含大量淋巴细胞^[26]。

可能被标记某些形式的松动与过敏不同,但要诊断金属敏感性并知道如何应对翻修手术,尤其是选择植入物,要困难得多。术前筛查金属敏感性是否具有任何价值,仍意见不一,有学者认为患有过敏症的患者应接受检测,其结果应影响植入物的选择。但是,尚无证据支持此方法或证明对这种方法有好处。在分析失败的植入物时,对失败原因的诊断对修复成功至关重要。在没有失败原因的情况下以疼痛为基础修改假体不会解决问题,患者也不会受益。

4 金属植入物过敏诊断

现在很难诊断由于过敏引起的植入物失败^[27],需要证明:(1)典型的富含 T 淋巴细胞的免疫组织病理学;(2)对特定植入物衍生的过敏原的阳性表皮斑试验;(3)在将植入物更换为免疫惰性的植入物后愈合反应。尽管以上内容可被视为证明超敏反应的最低要求,但由于只能通过去除植入物和缓解症状才能实现诊断,因此该诊断的价值令人怀疑。实际上,存在以上表现,甚至修订后症状的缓解也不足以作为科学假设的证据。

最近对膝关节或髌关节置换术的患者进行金属超敏反应的系统评价和荟萃分析表明,植入物失败患者

发生金属过敏的风险是植入物稳定患者的 2 倍^[28]。而阳性超敏结果无法对植入物的状态进行任何预测,这表明上述发现可能是关联而不是因果关系。其他研究发现,在失效的 TKA 中发现金属离子水平升高,并建议在尝试诊断 TKA 失效原因时可以使用铬离子。

虽然有证据支持各个步骤,对金属的超敏性可能在 TKA 无菌性松动中起重要作用,但没有一项单独的研究支持该假设。相比之下,丹麦的注册管理机构数据强烈支持金属过敏反应与 THA 不相关的观点^[29]。作者得出的结论是,在由丹麦髌关节注册表和丹麦斑贴试验注册表链接的患者中,金属过敏与 THA 之间没有关联。虽然将 2 个注册表关联起来可能是一个非常有效的工具,可以回答有关 TKA 中过敏的问题,但其使用仅限于 2 个帐户。首先,研究对象是 THA,而不是 TKA;其次,超过 70 000 例患者中只有 0.5% 的斑贴试验呈阳性,这大大低于一般人群的预期数目。其超敏反应检出率的有效性欠佳,因此相关的注册表可能无助于此讨论。

总而言之,目前金属过敏作为一种过敏过程尚不能为 TKA 翻修进行解释,但其重要性和机制尚需明确。鉴于在诊断过敏之前需要满足广泛且临床上无法实现的标准,并且需要证据来支持使用低变应原性植入物,笔者认为围手术期决策算法无法指导临床医生使用未经证实的低变应原性成分。然而,诊断为金属过敏的患者将继续询问植入物所用的材料,在关节置换后可能出现的任何问题都与其先前存在的过敏有关。因此需要更多的科学和临床研究来证实。

参考文献

- [1] 宋红艳. 全膝关节置换术后并发症的循证护理干预[J]. 安徽医药, 2019, 23(8): 1614-1616. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-6469. 2019. 08. 035.
- [2] Softness KA, Murray RS, Evans BG. Total knee arthroplasty and fractures of the tibial plateau[J]. World Journal of Orthopedics, 2017, 8(2): 107-114. DOI: 10. 5312/wjo. v8. i2. 107.
- [3] List JPVD, Chawla H, Villa JC, et al. The role of patient characteristics on the choice of unicompartmental versus total knee arthroplasty in patients with medial osteoarthritis[J]. J Arthroplasty, 2017, 32(3): 761-766. DOI: 10. 1016/j. arth. 2016. 08. 015.
- [4] Wang JW, Chen B, Lin PC, et al. The efficacy of combined use of rivaroxaban and tranexamic acid on blood conservation in minimally invasive total knee arthroplasty a double-blind randomized, controlled trial[J]. J Arthroplasty, 2017, 32(3): 801-806. DOI: 10. 1016/j. arth. 2016. 08. 020.
- [5] Pahlplatz TM, Schafroth MU, Kuijer PP. Patient-related and work-related factors play an important role in return to work after total knee arthroplasty: a systematic review[J]. Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine, 2017, 2(3): 127-132. DOI:

- 10.1136/jisakos-2016-000088.
- [6] Sun L, Zhu X, Zou J, et al. Comparison of intravenous and oral acetaminophen for pain control after total knee and hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)* 2018, 97(6):e9751. DOI: 10.1097/MD.0000000000009751.
- [7] Morales- Munoz C, Sánchez-Ramos TL, Díaz-Lara MD, et al. Analgesic effect of a single-dose of perineural dexamethasone on ultrasound-guided femoral nerve block after total knee replacement[J]. *Rev Esp Anestesiol Reanim*, 2016, 64(1):19-26. DOI: 10.1016/j.redar.2016.05.006.
- [8] Scott CEH, Turnbull GS, MacDonald D, et al. Activity levels and return to work following total knee arthroplasty in patients under 65 years of age[J]. *Bone Joint J*, 2017, 99-B(8):1037-1046. DOI: 10.1302/0301-620X.99B8. BJJ-2016-1364. R1.
- [9] Yhim HY, Lee J, Lee JY, et al. Pharmacological thromboprophylaxis and its impact on venous thromboembolism following total knee and hip arthroplasty in Korea: A nationwide population-based study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0178214. DOI: 10.1371/journal.pone.0178214.
- [10] Goh SH, Ming HLL, Razak HRBA, et al. Patient-reported outcomes, quality of life, and satisfaction rates in young patients aged 50 years or younger after total knee arthroplasty[J]. *J Arthroplasty*, 2017, 32(2):419. DOI: 10.1016/j.arth.2016.07.043.
- [11] Hussain MS, Li J, Brindal E, et al. Supporting the Delivery of Total Knee Replacements Care for Both Patients and Their Clinicians With a Mobile App and Web-Based Tool: Randomized Controlled Trial Protocol[J]. *Jmir Research Protocols*, 2017, 6(3):e32. DOI: 10.2196/resprot.6498.
- [12] Vaegter HB, Handberg G, Emmeluth C, et al. Preoperative hypoalgesia after cold pressor test and aerobic exercise is associated with pain relief 6 months after total knee replacement[J]. *Clinical Journal of Pain*, 2016, 33(6):475-484. DOI: 10.1097/AJP.0000000000000428.
- [13] Slevin O, Schmid FA, Schiapparelli F, et al. Increased in vivo patellofemoral loading after total knee arthroplasty in resurfaced patellae[J]. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 2017, 26(6):1805-1810. DOI: 10.1007/s00167-017-4803-4.
- [14] Yuan X, Wang J, Wang Q, et al. Synergistic effects of intravenous and intra-articular tranexamic acid on reducing hemoglobin loss in revision total knee arthroplasty: a prospective, randomized, controlled study[J]. *Transfusion*, 2018, 58(4):982-988. DOI: 10.1111/trf.14477.
- [15] Abdel MP, Ollivier M, Parratte S, et al. Effect of Postoperative Mechanical Axis Alignment on Survival and Functional Outcomes of Modern Total Knee Arthroplasties with Cement: A Concise Follow-up at 20 Years[J]. *Journal of Bone & Joint Surgery American Volume*, 2018, 100(6):472-478. DOI: 10.2106/JBJS.16.01587.
- [16] Hou HB, Cao B, Shi SM, et al. Total knee arthroplasty for treatment of rheumatoid arthritis: A protocol for a systematic review of randomized controlled trial[J]. *Medicine*, 2019, 98(30):e16558. DOI: 10.1097/MD.00000000000016558.
- [17] Chawla H, Nwachukwu BU, van der List JP, et al. Cost effectiveness of patellofemoral versus total knee arthroplasty in younger patients[J]. *Bone & Joint Journal*, 2017, 99-B(8):1028-1036. DOI: 10.1302/0301-620X.99B8. BJJ-2016-1032. R1.
- [18] Khan RM, Albutt K, Qureshi MA, et al. Time-driven activity-based costing of total knee replacements in Karachi, Pakistan[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(5):e025258. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-025258.
- [19] Tahmasebi MN, Amjad GG, Kaseb MH, et al. Total knee arthroplasty in severe unstable knee: Case-report and literature review[J]. *Archives of Bone & Joint Surgery*, 2017, 5(1):58-62.
- [20] 辛锋, 赵凤朝. 3D 打印技术在行全膝关节置换术患者中的应用分析[J]. *中国医药*, 2019, 14(7):1062-1065. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2019.07.026.
- [21] 李新天, 王炜, 林进. 以无痛锻炼为核心的快速康复方案对全膝关节置换术后康复效果的影响[J]. *中国医药*, 2018, 13(4):573-577. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4777.2018.04.024.
- [22] 房丽, 张伟滨, 何会超, 等. 关节镜下缝合修复 3 度半月板损伤的效果及对膝关节本体感觉的影响[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(6):66-69.
- [23] Agarwal S, Rana A, Gupta G, et al. Total knee arthroplasty in a diagnosed case of deep vein thrombosis - our experience and review of literature[J]. *Journal of Orthopaedic Case Reports*, 2017, 7(1):16-19. DOI: 10.13107/jocr.2250-0685.668.
- [24] 陈飏, 贺友生, 张子宏. 髌关节置换术后股骨假体周围骨折的手术治疗[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(17):73-75, 79.
- [25] Nam D, Lawrie CM, Salih R, et al. Cemented versus cementless total knee arthroplasty of the same modern design: A prospective, randomized trial[J]. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2019, 101(13):1185-1192. DOI: 10.2106/JBJS.18.01162.
- [26] Anoop P, Richard D, Manoj R, et al. Outcome of total knee arthroplasty in patients with poliomyelitis[J]. *Efort Open Reviews*, 2018, 3(6):358-362. DOI: 10.1302/2058-5241.3.170028.
- [27] Gold CA, Scuderi GR. The evolution of total knee component design follows anatomic morphology[J]. *Techniques in Orthopaedics*, 2018, 33(1):11-16. DOI: 10.1097/BTO.0000000000000272.
- [28] Wang C, Zhao F, Ding WY, et al. Finite element study on total knee prosthesis wear during stair ascent[J]. *Journal of Medical Biomechanics*, 2017, 32(2):109-114. DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.02.002.
- [29] Salam A, Islam MA, Khan MZH, et al. Total knee arthroplasty in patients with fixed flexion deformity[J]. *Current Orthopaedic Practice*, 2018, 24(6):659-664. DOI: 10.3329/kyamcj.v8i2.35695.

(收稿日期:2019-11-22)

氧化应激作用在子痫前期发病机制中的研究进展

李嘉健综述 孙晓燕审校

基金项目:首都医科大学本科生科研创新项目(XSKY2019135)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院妇产科

通信作者:孙晓燕,E-mail:ddli0726@hotmail.com

【摘 要】 子痫前期是一种以妊娠 20 周以后出现高血压和蛋白尿为特征的妊娠期疾病。子痫前期的病理生理机制仍不完全清楚。根据子痫前期的两阶段模型,胎盘缺血、灌注不足(第一阶段)导致炎性因子和细胞碎片释放入血,进而使母体出现以全身炎性反应和内皮功能障碍为特征的临床症状(第二阶段)。氧化应激在子痫前期的病理生理过程中起着重要作用,可能是子痫前期胎盘和内皮功能障碍的关键原因。文章综述了目前对该病潜在病因和发病机制的认识,重点讨论氧化应激在子痫前期发病机制中的作用与影响。

【关键词】 子痫前期;发病机制;氧化应激;内皮功能障碍

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.022

Research progress of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia Li Jiajian, Sun Xiaoyan. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: SUN Xiaoyan, Email:ddli0726@hotmail.com

Funding program: Undergraduate Scientific Research Innovation Project of Capital Medical University (XSKY2019135)

【Abstract】 Preeclampsia is a pregnancy disease characterized by hypertension and proteinuria after 20 weeks of pregnancy. The pathophysiological mechanism of preeclampsia is still unclear. According to the two-stage model of preeclampsia, placental ischemia and inadequate perfusion (the first stage) lead to the release of inflammatory factors and cell fragments into the blood, and then make the mother appear clinical symptoms characterized by systemic inflammatory response and endothelial dysfunction (the second stage). Oxidative stress plays an important role in the pathophysiological process of preeclampsia, which may be the key cause of placental and endothelial dysfunction. This article reviews the current understanding of the underlying etiology and pathogenesis of the disease, focusing on the role and influence of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia.

【Key words】 Preeclampsia; Pathogenesis; Oxidative stress; Endothelial dysfunction

子痫前期(preeclampsia, PE)是人类特有的妊娠期疾病,以高血压和蛋白尿为特征,出现于妊娠中晚期。发病率因地理区域、季节、营养和种族而异,全世界有3%~8%的妇女受其影响^[1]。迄今为止,子痫前期的发病机制仍未完全阐明。但“两阶段模型”被大多数人认可^[2]。第一阶段为症状前期,即胎盘血流灌注不足,从而为氧化应激的发生创造了良好的环境;第二阶段为症状期,即母体发生全身炎性反应,包括血管内皮损伤、血栓形成和肾素—血管紧张素—醛固酮系统激活,最终导致器官灌注不足和血液黏滞。氧化应激发生在该进程的每一阶段,表明氧化应激在子痫前期的病理生理过程中起着重要作用,可能是子痫前期胎盘和内皮功能障碍的关键原因。现对子痫前期发病过程

中各阶段氧化应激的参与情况,特别是其在妊娠初期滋养细胞侵袭、内皮功能障碍和母体全身炎性反应中的作用进行综述。

1 子痫前期概述

子痫前期的定义为妊娠 20 周后新出现的产妇高血压(收缩压/舒张压 > 140/90 mmHg)和蛋白尿(> 300 mg/24 h)。严重的情况下,产妇可能并发肝脏病变(HELLP 综合征)、肾功能障碍、水肿、弥散性血管内凝血(DIC)等严重合并症。对胎儿而言,子痫前期的主要并发症包括胎儿生长受限导致的低出生体重、早产和胎儿死亡。该综合征是当今工业化国家孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一^[3]。终止妊娠,胎儿胎盘娩出是目前惟一有效的治疗途径。慢性宫内缺氧和

医源性早产也给新生儿带来了巨大的风险。

2 氧化应激与正常妊娠

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是由氧代谢产生的单分子,在很多代谢反应中都会产生。反应最活跃的种类包括羟基自由基($\text{OH}\cdot$)、过氧自由基($\text{ROO}\cdot$),以及超氧阴离子(O_2^-)。一氧化氮(NO)是一种氮自由基,能与 O_2^- 反应形成过氧亚硝酸盐(ONOO^-),它是很强的生物氧化剂,能与各种细胞成分发生反应。ROS 是调节人体许多生理功能的信号分子,如增殖、迁移、血管生成等^[4]。

在正常妊娠期间,孕妇血清中 ROS 的生成增加,这是一种由正常的全身炎症反应引起的现象,与细胞成熟、细胞复制、胚胎发育和妊娠维持有关^[5]。妊娠的特征是多个系统的动态变化,导致包括胎盘在内的不同器官基础氧和能量消耗增加。胎盘最初处于低氧环境,但随着发育成熟,其血管化发展为富氧环境^[6]。胎盘富含线粒体,血管丰富,消耗孕妇基础代谢率的 1% 左右,母体氧分压高,导致活性氧产生增多,造成了“生理应激”^[3]。

随着妊娠的进展,对自由基损伤的防御机制也会增强,活性氧可被维生素 C 和 E 等抗氧化剂快速捕获,或被多种防御系统抗氧化剂代谢,如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶、硫氧还蛋白、过氧化物还原蛋白。但当 ROS 的产生超过抗氧化防御系统的代偿能力时,就会发生氧化应激,进而引起炎症反应和毒性反应。

3 子痫前期的“二阶段学说”

正常妊娠期间,子宫螺旋动脉重塑以确保子宫内膜和绒毛间隙的血管化及血流灌注。这种改变是以末端血管管腔的扩张及内部弹性成分和平滑肌成分的丧失为特征。第一阶段的重塑是在低氧环境下完成的(1% ~ 2% 的氧分压),随着胎盘血管化的发展逐渐恢复到常氧状态。而子痫前期患者表现为子宫螺旋动脉重构障碍,进而绒毛外滋养细胞浸润异常,胎盘植入母体子宫壁过浅,即“胎盘浅着床”,最终使胎盘灌注减少^[7]。间歇性的动脉血流会产生反复的缺血再灌注,诱导产生氧化应激。胎盘的氧化损伤导致炎症反应、细胞凋亡及细胞碎片释放到母体血液循环中,包括一些抗血管生成因子,如可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)、可溶性内皮素(sEng)、细胞因子和氧化剂^[8]。这些胎盘因子和碎片是母体内皮功能改变和妊娠炎症反应加剧的根源,进而进入第二阶段,母体以全身血管炎症反应和收缩为特征的大规模系统性内皮功能障碍。

4 氧化应激和子痫前期

4.1 胎盘血管重构异常与氧化应激 子痫前期发病与滋养层细胞浸润不足和螺旋动脉血管重塑受损有关。绒毛外滋养细胞通过母体蜕膜浸润子宫螺旋动脉的整个过程,需要胎盘滋养层细胞与母体蜕膜细胞之间严格的相互作用和沟通,即不同细胞外蛋白酶的表达和作用,如基质金属蛋白酶(MMPs)、和解整合素金属蛋白酶(ADAMs)、具有血小板反应蛋白基序的和解整合素金属蛋白酶(ADAMTSs)和组织蛋白酶^[9]。子痫前期与胎盘组织中这些蛋白酶的表达下调、活性降低有关。据报道,具有 Kazal 基序的富含半胱氨酸的逆转诱导蛋白(RECK)是一种镶嵌于质膜的糖蛋白,可抑制 MMPs 和 ADAMs 的活性,进而控制滋养层细胞的侵袭性,促进氧化应激^[10]。此外,滋养细胞和蜕膜细胞也表达蛋白酶抑制剂,如金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)和半胱氨酸(组织蛋白酶抑制剂)^[11],而 TIMPs 和 RECK 的差异分布在子痫前期发病机制中也起着重要作用。

子痫前期血管重构障碍导致胎盘灌注和氧合减少,因此随着 ROS 和毒性脂质过氧化物的产生,氧化应激加剧^[12]。自由基激活单核细胞和中性粒细胞,产生促炎细胞因子,如 TNF- α 、IL-6、血管黏附因子(VCAM-1),提示白细胞—内皮细胞的附着和活化。活性中性粒细胞通过多种酶的作用进一步产生 ROS,包括 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶(XO)及 eNOS 解耦联^[13]。其中,NADPH 氧化酶是一种膜结合酶复合物,通过 NADPH 可将氧的单电子还原成 O_2^- 。研究表明,与正常妊娠分离的人脐血管内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)相比,在子痫前期分离的 HUVEC 原代培养中发现过表达的 NADPH 氧化酶亚型 NOX2,它可产生超氧阴离子,通过解耦 eNOS 产生 NO,进而形成过氧亚硝酸盐,从而加剧氧化应激^[14]。XO 的表达和活性在子痫前期患者细胞滋养层、母体和胎儿的血液中都会增加,引起 ROS 的产生和高尿酸血症的发生。XO 的过表达是子痫前期患者氧化应激和炎症反应状态的反映^[7]。

4.2 免疫调节异常与氧化应激 研究显示,子痫前期妇女体内的免疫调节和免疫耐受异常,母体针对胎儿发生免疫应答,进而干扰滋养细胞侵袭和血管形成,导致氧化应激,引起母体全身炎症反应。研究发现 Th1/Th2 细胞免疫失衡、Th17/Treg 细胞比例失调、蜕膜 NK 细胞调节异常等,均会导致滋养细胞侵袭失败,螺旋动脉重构缺陷进而胎盘灌注减少,活性氧生成,加剧氧化应激^[15]。此外,胎盘巨噬细胞系也与子痫前期发病机

制有关,分别为母体胎盘部分的蜕膜巨噬细胞和胎儿胎盘的 Hofbauer 细胞。正常妊娠时蜕膜巨噬细胞多为 M2 表型,发挥免疫抑制作用,有助于螺旋动脉重塑和免疫耐受。而子痫前期表现为 M1 表型占主导地位,产生促炎细胞因子,加剧氧化应激。胎儿 Hofbauer 细胞数量下降,CD74 表达下调和 IL-10 分泌减少,促进氧化应激和炎症反应^[16]。Campbell 等^[17]发现,针对血管紧张素受体 AT1 的自身反应性抗体在子痫前期母体中水平升高,可抑制滋养细胞侵袭,进而促进氧化应激。补体激活在维持健康妊娠中起着至关重要的作用,而很多学者发现补体系统的异常激活或调节不当则可能激活某些补体成分 C3a, Bb 等,进而导致经典途径或替代途径激活,氧化应激加剧,引起母体的全身炎症反应,导致子痫前期的发生^[18-21]。

4.3 内皮细胞功能障碍与氧化应激 子痫前期胎盘灌注的改变引起胎盘微环境的改变,如 ROS 的产生、胎盘因子的释放及内皮细胞的活化,最终加剧氧化应激,导致普遍内皮细胞功能障碍^[22]。内皮功能障碍涉及以下多种机制。

首先,胎盘因子和合胞体滋养层微粒(STBMs)在母体循环中的释放会引起内皮细胞炎症反应,从而加剧氧化应激。研究发现细胞因子 IL-6、IL-1、TNF- α 等诸多炎症标志物在子痫前期患者体内均升高^[23]。STBMs 还通过激活 Toll 样受体(TLRs)和 NF- κ B,诱导单核细胞、NK 细胞、树突状细胞和中性粒细胞增殖,从而使血管对血管调节物质的反应性改变、凝血系统激活、毛细血管通透性增加、NO 生成减少及 ONOO⁻ 生成,进而加剧氧化应激和全身炎症反应^[24-25]。

其次,内皮功能障碍的机制之一还涉及可溶性 fms 样酪氨酸激酶(sFlt-1)的释放^[3]。这是一种抗血管生成蛋白质,可拮抗血管内皮生长因子(VEGF)和胎盘生长因子(PLGF)等促血管生成因子。VEGF 与受体 Flt-1 的相互作用在新生血管生长过程中起着关键作用,但该作用可被 sFlt-1 抑制,导致子痫前期母体循环中游离的 VEGF 水平较低,进而加剧氧化应激和 ROS 造成的内皮损害。此外,可溶性内皮素(sEng)也与内皮功能障碍有关,可通过改变血管内膜而加剧 sFlt1 的作用^[26],进而加剧氧化应激和内皮损害。

此外,NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)的激活也参与内皮功能障碍。NOX 激活除可导致 ROS 的产生增加,还可下调钙激活钾通道,即 KCa2.3 和 KCa3.1(KCaS),这些通道是血管收缩活动中重要的电触发器,对内皮依赖性舒张起重要作用。上调 KCaS 可以促进内皮依赖性舒张,而下调可以增强血管收缩

力。最近的一项研究表明,使用子痫前期患者血清、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、孕激素或 sFlt-1 处理内皮细胞均可导致 KCaS 水平降低。这种抑制作用是高表达 NOX₂ 和 NOX₄ 来增加 O₂⁻ 的产生,降低 SOD 水平,加剧氧化应激的结果^[27-28]。

4.4 线粒体的氧化应激 线粒体产生的氧化应激也被认为是一个潜在的治疗靶点。子痫前期患者存在线粒体功能障碍,线粒体脂质过氧化增加,对氧化物的易感性增强。Teran 等^[29]研究发现,有线粒体功能障碍家族史者,子痫前期的发病率更高。而且在子痫前期妇女及其一级亲属的线粒体中,负责能量生产和氧化电子交换的基因表达异常,如细胞色素 C 氧化酶。实验发现,与正常妊娠相比,用子痫前期妇女血浆处理过的内皮细胞,其线粒体内 ROS 明显升高。而用一种线粒体靶向超氧化物歧化酶抗氧化模拟物 MitoTempo,预处理内皮细胞后降低了细胞线粒体 ROS 的生成,并抑制了 ROS 诱导的细胞死亡。线粒体靶向抗氧化预处理在相同浓度下比一般抗氧化剂更有效,直接靶向治疗方法具有重要作用^[3]。

4.5 遗传易感性与氧化应激 子痫前期具有明显的家族聚集倾向,子痫前期妇女的一级亲属比无子痫前期家族史的妇女患病风险高 5 倍,二级亲属比无家族史妇女的风险高 2 倍,说明遗传易感因素可能在子痫前期的发病过程中发挥了重要作用,且其遗传基础是多基因的^[30]。与氧化应激通路有关的遗传易感基因包括编码 eNOS、COMT、NQO1、VEGF 等的基因^[31-32]。此外研究发现^[33],亚硝基氧化还原状态不平衡也可能是子痫前期的诱因之一,在子痫前期小鼠模型中转录因子 STOX1 对 ROS 和活性氮(RNS)的生成有相反的效应。STOX1 过表达改变了 ROS/RNS 平衡和线粒体功能。RNS 在 STOX1 转基因胎盘中占主导地位,而 ROS 与 NO 反应产生 ONOO⁻,导致氧化应激和血管功能障碍。氧化应激引起的血脂异常也会损伤内皮细胞,因此参与调节脂质代谢的基因也为子痫前期的遗传易感基因,如编码载脂蛋白 E(ApoE)和脂蛋白脂肪酶(LPL)的基因^[34]。母体和胎儿 LPL 基因型之间的相互作用可以改变子痫前期母体的脂质分布和疾病严重程度。LPL Asn291 基因缺失及变异与子痫前期血浆 LPL 活性降低和血脂代谢异常有关^[35]。

5 子痫前期的抗氧化体系

5.1 传统抗氧化剂 作为生理保护剂,抗氧化剂可以中和活性氧造成的氧化损伤。与正常妊娠相比,子痫前期抗氧化防御能力降低,可能是由于自由基清除剂的效率降低和抗氧化酶的活性降低^[36]。提高子痫前

期妇女的抗氧化能力是目前子痫前期治疗的热点之一。流行病学研究将饮食中抗氧化维生素的缺乏与子痫前期风险的增加联系起来,并提出抗氧化的维生素可能是预防子痫前期的方法^[37]。硫酸镁(MgSO_4)是子痫前期治疗的一线用药,可降低子痫前期红细胞膜的脂质过氧化,并保护内皮细胞。在胎盘外植体中, MgSO_4 可以防止缺氧引起的脂质过氧化水平升高^[38]。此外, MgSO_4 可以降低人体合体滋养层质膜中的脂质过氧化,在子痫前期妇女中具有抗氧化作用^[39]。有人提出, MgSO_4 可通过在细胞膜疏水微环境中与羟自由基(OH)和脂质过氧化物形成复合物,来降低自由基的生物利用度^[40]。

为了减轻子痫前期的氧化应激,许多研究也评估了其他各类化合物,如维生素、N-乙酰半胱氨酸、 β -胡萝卜素等。维生素C和E是常见的抗氧化剂,前者能清除水相中的自由基,而后者能防止脂质过氧化。补充维生素C和维生素E是预防子痫前期氧化应激和内皮功能障碍的替代疗法。然而,大量随机对照试验发现,补充这些维生素并不能预防子痫前期^[41]。这与Tenório等^[42]研究结果一致,其研究表明,维生素C和E、硒、L-精氨酸、大蒜素、番茄红素和辅酶Q10的抗氧化治疗对预防子痫前期无效果。N-乙酰半胱氨酸是谷胱甘肽的副产物,对谷胱甘肽的维持和代谢具有重要作用。研究发现,补充N-乙酰半胱氨酸可改善子痫前期患者的肝、肾功能,降低血压,降低蛋白尿,改善氧化应激的程度^[43]。其他研究表明,由于类胡萝卜素具有抗氧化和抗炎特性,摄入类胡萝卜素对成年人的健康有积极的影响^[44]。同时,将 β -胡萝卜素灌注于暴露在过氧化物环境中的人离体胎盘小叶,可以抑制过氧化物诱导的血管收缩并减少脂质过氧化物和血栓烷的分泌。褪黑素是一种有效的抗氧化剂,可直接清除自由基^[45]。据报道,子痫前期胎盘褪黑素受体减少,而在用氧化应激诱导物处理过的人胎盘外植体中,褪黑素降低了胎盘的氧化应激^[46]。在体外缺氧/复氧条件下,褪黑素调节炎症反应和自噬,减少人滋养细胞的凋亡。因此,外源性褪黑素治疗可作为子痫前期的辅助治疗手段,减轻氧化应激,从而提高胎盘细胞存活率,改善妊娠和胎儿结局^[47]。

5.2 新型抗氧化剂——氢气 氢气是一种新型抗氧化剂^[48],近年来已被证明具有治疗各种氧化应激相关疾病的潜力。一项应用低子宫胎盘灌注压的大鼠模型的研究发现^[49],在子痫前期发作前预防性地给予氢分子可通过降低氧化应激而缓解高血压,改善蛋白尿和肾脏组织学变化。同时大鼠母体循环内血管内皮生长

因子水平升高,纠正了血管生长失调。而且氢气还可减少子痫前期妇女滋养层BeWo细胞和绒毛组织中的sFlt-1,但对正常妊娠妇女的胎盘组织中sFlt-1无影响。这些结果提示,对子痫前期高危患者使用氢气可能对母亲和新生儿有潜在的临床益处。管中等^[50]发现,用不同浓度含氢培养基处理重度子痫前期胎盘滋养细胞后,滋养细胞的增殖活性显著增强,且呈浓度依赖性。氢气可抑制细胞凋亡,使细胞周期中G1期比例减少,S期比例升高。另一项研究表明^[51],高水平的维生素C和E会抑制滋养层细胞的增殖能力,并刺激促炎因子TNF- α 的分泌,治疗效果差,而高浓度的氢气不会产生有害影响。因此,作为新型抗氧化剂,氢气对子痫前期患者的防治有潜在的意义。

6 总结与展望

氧化应激是正常妊娠的一部分,但其加剧会导致子痫前期,并在各个病理阶段起到关键作用。氧化应激在子痫前期的发病过程中处于中心地位,它参与了子痫前期病理生理第一阶段,与滋养层细胞侵袭和血管重塑有关。同时氧化应激通过释放促炎因子、细胞碎片等到血液循环中,参与第二阶段的内皮功能障碍和全身炎症反应。认识氧化应激在子痫前期发病机制与病理过程中的作用是子痫前期抗氧化剂治疗的基础。多种抗氧化剂的使用旨在减少氧化应激对子痫前期的有害影响。预计会有更多的研究进一步探讨抗氧化治疗子痫前期的潜在作用和机制,可作为一个未来的研究方向。

参考文献

- [1] Zabul P, Wozniak M, Slominski AT, et al. A proposed molecular mechanism of high-dose Vitamin D₃ supplementation in prevention and treatment of preeclampsia [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 13043-13064. DOI:10.3390/ijms160613043.
- [2] San Juan-Reyes S, Gomez-Oliván LM, Islas-Flores H, et al. Oxidative stress in pregnancy complicated by preeclampsia [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 681:108255. DOI:10.1016/j.abb.2020.108255.
- [3] Chiarello DI, Abad C, Rojas D, et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1866(2):165354. DOI:10.1016/j.bbdis.2018.12.005.
- [4] Gabriele P, Natasha I, Mariapaola C, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:8416763. DOI:10.1155/2017/8416763.
- [5] Yang X, Guo L, Li H, et al. Analysis of the original causes of placental oxidative stress in normal pregnancy and pre-eclampsia: a hypothesis [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012, 25(7): 884-888. DOI:10.3109/14767058.2011.601367.
- [6] Elliot GM. Oxidative stress and the evolutionary origins of pre-

- eclampsia [J]. J Reprod Immunol, 2016, 114: 75-80. DOI: 10.1016/j.jri.2016.02.003.
- [7] Aouache R, Biquard L, Vaiman D, et al. Oxidative stress in pre-eclampsia and placental diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): E1496. DOI:10.3390/ijms19051496.
- [8] Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia [J]. J Thromb Haemost, 2010, 7(3): 375-384. DOI:10.1111/j.1538-7836.2008.03259.x.
- [9] Gutierrez JA, Gomez I, Chiarello DI, et al. Role of proteases in dysfunctional placental vascular remodelling in preeclampsia [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(2): 165448. DOI:10.1016/j.bbadis.2019.04.004.
- [10] Gutiérrez J, Aedo A, Mora J, et al. Preeclampsia associates with RECK-dependent decrease in human trophoblasts migration and invasion [J]. Placenta, 2017, 59: 19-29. DOI:10.1016/j.placenta.2017.09.004.
- [11] Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis [J]. Matrix Biol, 2015, 115: 247-254. DOI:10.1016/j.matbio.2015.03.005.
- [12] Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta [J]. Placenta, 2010, 31 (Suppl): S66-S69. DOI:10.1016/j.placenta.2009.12.021.
- [13] Sanchez-Aranguren LC, Prada Ct, Riao-Medina C, et al. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress [J]. Front Physiol, 2014, 5: 372. DOI:10.3389/fphys.2014.00372.
- [14] Choi S, Ji AK, Na HY, et al. NADPH oxidase 2-derived superoxide downregulates endothelial KCa3.1 in preeclampsia [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 57(4): 10-21. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.009.
- [15] 刘莹, 黄楚冰, 王晨虹. 重视子痫前期发生的免疫学机制 [J]. 中国医师杂志, 2019, 21(7): 961-965. DOI:10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2019.07.001.
- [16] Vishnyakova P, Elchaninov A, Fatkhudinov T, et al. Role of the Monocyte-Macrophage System in Normal Pregnancy and Preeclampsia [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3695. DOI: 10.3390/ijms20153695.
- [17] Campbell N, Lamarca B, Cunningham MW Jr. The role of agonistic autoantibodies to the angiotensin II type 1 receptor (AT1-AA) in pathophysiology of preeclampsia [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19(10): 781-785. DOI:10.2174/1389201019666180925121254.
- [18] Lokki AI, Heikkinen-Eloranta J, Jarva H, et al. Complement activation and regulation in preeclamptic placenta [J]. Front Immunol, 2014, 5(9): 312. DOI:10.3389/fimmu.2014.00312.
- [19] He Y, Xu B, Song D, et al. Expression of the complement system's activation factors in plasma of patients with early/late-onset severe pre-eclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 76(3): 205-211. DOI:10.1111/aji.12541.
- [20] Jia K, Ma L, Wu S, et al. Serum levels of complement factors C1q, Bb, and H in normal pregnancy and severe pre-Eclampsia [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7087-7093. DOI:10.12659/msm.915777.
- [21] Lynch AM, Wagner BD, Giclas PC, et al. The relationship of longitudinal levels of complement Bb during pregnancy with Preeclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 75(2): 104-111. DOI:10.1111/aji.12439.
- [22] Brosens I, Brosens JJ, Muter J, et al. Preeclampsia: the role of persistent endothelial cells in uteroplacental arteries [J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 221(3): 219-226. DOI:10.1016/j.ajog.2019.01.239.
- [23] Taylor BD, Gong T, Ness RB, et al. [175-POS]: Elevated serum inflammatory markers and preeclampsia: Results from a large national cohort study [J]. Pregnancy Hypertens, 2015, 5(1): 90. DOI: 10.1016/j.preghy.2014.10.181.
- [24] Joerger-Messlerli MS, Hoesli IM, Rusterholz C, et al. Stimulation of monocytes by placental microparticles involves toll-Like receptors and nuclear factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells [J]. Front Immunol, 2014, 5(5): 173. DOI:10.3389/fimmu.2014.00173.
- [25] Mannaerts D, Faes E, Gielis J, et al. Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2018, 18(1): 60. DOI:10.1186/s12884-018-1685-5.
- [26] Murphy S, Lamarca B, Parrish M, et al. Control of Soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production in response to placental ischemia/hypoxia: Role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 304(2): R130-R135. DOI:10.1152/ajpregu.00069.2012.
- [27] Chen J, Gao Q, Jiang L, et al. The NOX2-derived reactive oxygen species damaged endothelial nitric oxide system via suppressed BK-Ca/SKCa in preeclampsia [J]. Hypertens Res, 2017, 40(5): 457-464. DOI:10.1038/hr.2016.180.
- [28] Choi S, Kim JA, Li HY, et al. Altered redox state modulates endothelial KCa2.3 and KCa3.1 levels in normal pregnancy and pre-eclampsia [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2018, 30(4): 505-519. DOI:10.1089/ars.2017.7038.
- [29] Teran E, Hernandez I, Tana L, et al. Mitochondria and coenzyme Q10 in the pathogenesis of preeclampsia [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1561. DOI:10.3389/fphys.2018.01561.
- [30] Haram K, Mortensen JH, Nagy B. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome [J]. J Pregnancy, 2014, 2014: 910751. DOI:10.1155/2014/910751.
- [31] 周璐, 黄燕, 洪小苹, 等. 血管内皮细胞功能相关基因多态性与子痫前期的遗传易感性研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(2): 139-141. DOI:10.13404/j.cnki.cjbhh.2019.02.004.
- [32] 刘静静, 高凯旋, 井忠翠, 等. 基因 COMT 472G > A 和 NQO1 609C > T 多态性与山东汉族子痫前期遗传易感性的关系 [J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(4): 420-423. DOI:10.13361/j.qdxy.201704014.
- [33] Doridot L, Chatre L, Ducat A, et al. Nitroso-redox balance and mitochondrial homeostasis are regulated by STOX1, a pre-eclampsia-associated gene [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 21(6): 819-834. DOI:10.1089/ars.2013.5661.
- [34] Yong HEJ, Murthi P, Brennecke SP, et al. Genetic approaches in preeclampsia [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1710: 53-72. DOI: 10.1007/978-1-4939-7498-6_5.

- [35] 陈英, 叶伟萍. 子痫前期的基因遗传学研究进展 [J]. 海南医学, 2016, 27(22): 3719-3722. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2016.22.036.
- [36] Styliani G, Davidge ST. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(2): 88-97. DOI:10.1016/j.molmed.2014.11.009.
- [37] Oyston CJ, Stanley JL, Baker PN. Potential targets for the treatment of preeclampsia [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(11): 1517-1530. DOI:10.1517/14728222.2015.1088004
- [38] Chiarello DI, Marín R, Proverbio F, et al. Effect of hypoxia on the calcium and magnesium content, lipid peroxidation level, and Ca^{2+} -ATPase activity of syncytiotrophoblast plasma membranes from placental explants [J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 597357. DOI:10.1155/2014/597357.
- [39] Abad C, Vargas FR, Zoltan T, et al. Magnesium sulfate affords protection against oxidative damage during severe preeclampsia [J]. Placenta, 2015, 36(2): 179-185. DOI: 10.1016/j.placenta.2014.11.008.
- [40] Fernandez MA, Marin R, Proverbio F, et al. Magnesium sulfate against oxidative damage of membrane lipids: A theoretical model [J]. Int J Quantum Chem, 2017, 117(21): e25423. DOI:10.1002/qua.25423.
- [41] American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy [J]. Obstet Gynecol, 2013, 122(5): 1122-1131. DOI:10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88.
- [42] Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, et al. Oral antioxidant therapy for prevention and treatment of preeclampsia: Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2018, 28(9): 865-876. DOI:10.1016/j.numecd.2018.06.002.
- [43] Motawei SM, Attalla SM, Gouda HE, et al. The effects of N-acetyl cysteine on oxidative stress among patients with pre-eclampsia [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2016, 135(2): 226-227. DOI:10.1016/j.ijgo.2016.07.002.
- [44] Zielinska M, Wesołowska A, Pawlus B, et al. Health effects of carotenoids during pregnancy and lactation [J]. Nutrients, 2017, 9(8): 838. DOI:10.3390/nu9080838.
- [45] Man GCW, Zhang T, Chen X, et al. The regulations and role of circadian clock and melatonin in uterine receptivity and pregnancy-An immunological perspective [J]. Am J Reprod Immunol, 2017, 78(2): e12715. DOI:10.1111/aji.12715.
- [46] Hobson SR, Gurusinge S, Lim R, et al. Melatonin improves endothelial function in vitro and prolongs pregnancy in women with early-onset preeclampsia [J]. J Pineal Res, 2018, 65(3): e12508. DOI:10.1111/jpi.12508.
- [47] Sagrillo-Fagundes L, Assuncao Salustiano EM, Ruano R, et al. Melatonin modulates autophagy and inflammation protecting human placental trophoblast from hypoxia/reoxygenation [J]. J Pineal Res, 2018, 65(4): e12520. DOI:10.1111/jpi.12520.
- [48] 罗鑫, 王丽霞. 子痫前期的早期干预方法研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(21): 5041-5044. DOI:10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2018.21.79.
- [49] Ushida T, Kotani T, Tsuda H, et al. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 101: 524-533. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.491.
- [50] 管中, 杨翔, 郭丽丽, 等. 氢气对重度子痫前期胎盘滋养细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(8): 598-601. DOI:10.13283/j.cnki.xdfkzjz.2015.08.010.
- [51] Guan Z, Li HF, Guo LL, et al. Effects of vitamin C, vitamin E, and molecular hydrogen on the placental function in trophoblast cells [J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 292(2): 337-342. DOI:10.1007/s00404-015-3647-8.

(收稿日期:2019-11-05)

(上接 412 页)

- [31] He Q, Mei D, Sha S, et al. ERK-dependent mTOR pathway is involved in berberine-induced autophagy in hepatic steatosis [J]. J Mol Endocrinol, 2016, 57(4): 251-260. DOI:10.1530/JME-16-0139.
- [32] Liang KW, Yin SC, Ting CT, et al. Berberine inhibits platelet-derived growth factor-induced growth and migration partly through an AMPK-dependent pathway in vascular smooth muscle cells [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 590(1-3): 343-354. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.06.034.
- [33] Liu SJ, Yin CX, Ding MC, et al. Berberine suppresses in vitro migration of human aortic smooth muscle cells through the inhibitions of MMP-2/9, u-PA, AP-1, and NF- κ B [J]. BMB Rep, 2014, 47(7): 388-392. DOI:10.5483/bmbrep.2014.47.7.186.
- [34] Fan XD, Wang J, Hou JC, et al. Berberine alleviates ox-LDL induced inflammatory factors by up-regulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. J Transl Med, 2015, 13: 92. DOI:10.1186/s12967-015-0450-z.
- [35] Heo YJ, Choi SE, Jeon JY, et al. Visfatin induces inflammation and insulin resistance via the NF- κ B and STAT3 signaling pathways in hepatocytes [J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 4021623. DOI: 10.1155/2019/4021623.
- [36] Chang X, Jiao Y, Lu JF, et al. Adiponectin and visfatin may serve as diagnosis markers for metabolic syndrome in Uyghur population [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(11): 4322-4326.
- [37] Cantarini L, Brucato A, Simonini G, et al. Leptin, adiponectin, resistin, visfatin serum levels and idiopathic recurrent pericarditis: biomarkers of disease activity A preliminary report [J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(2): 207-212.
- [38] Martin ME, Millan-Linares MC, Naranjo MC, et al. Minor compounds from virgin olive oil attenuate LPS-induced inflammation via visfatin-related gene modulation on primary human monocytes [J]. J Food Biochem, 2019, 43(8): e12941. DOI:10.1111/jfbc.12941.
- [39] Li B, Zhao YH, Liu H, et al. Visfatin destabilizes atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-Deficient mice [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148273. DOI:10.1371/journal.pone.0148273.

(收稿日期:2019-09-16)

肺表面活性蛋白 A 在肺外疾病免疫炎症反应中的作用研究进展

赵正, 杨雪综述 赵敏审校

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金计划项目(2019-BS-278)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院急诊科

通信作者: 赵敏, E-mail: zhaom@sj-hospital.org

【摘 要】 表面活性蛋白 A(SP-A)属胶凝素家族的重要成员,也是构成肺表面活性物质的重要蛋白成分,在维持肺部组织的内环境稳态和调节机体的免疫防御方面发挥着重要的作用。近年来,越来越多的研究发现 SP-A 在多个肺外组织和器官中均有表达并参与免疫炎症反应。文章就 SP-A 的特异性结合受体、肺泡外组织分布及其在不同疾病中发挥的免疫调节作用作一综述。

【关键词】 肺表面活性蛋白 A; 肺外疾病; 免疫调节; 炎症反应

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.023

Research progress of surfactant protein A-involved immune inflammatory responses in extrapulmonary diseases

Zhao Zheng*, Yang Xue, Zhao Min, Emergency Department, Shengjing Hospital of China Medical University, Liaoning Province, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Zhao Min, E-mail: zhaom@sj-hospital.org

Funding program: Liaoning Province Doctoral Scientific Research Starting Foundation Program(2019-BS-278)

【Abstract】 Objective Surfactant protein A (SP-A), a collagen-containing C-type collectin, is an important host defense protein that functions to maintain pulmonary homeostasis and regulate inflammatory responses. Although the lung appears to be the major site of synthesis, emerging evidences have suggested that SP-A protein and mRNA are widely expressed in several extrapulmonary tissues and play a potential role in extrapulmonary immunity, which is likely to be an insightful area of research. This review enumerates expression, receptors and immunological properties of SP-A outside lungs and its immunoregulatory functions in various diseases.

【Key words】 Surfactant A; Extrapulmonary disease; Immunoregulation; Inflammatory reaction

表面活性蛋白(SP)是由肺泡Ⅱ型细胞和气道 Clara 细胞合成并分泌的一种脂蛋白复合物,是构成肺表面活性物质(PS)的重要组成成分,具有降低肺泡表面张力、提高肺的顺应性及促进气体交换的作用。目前明确的 SP 共分为 4 种,分别为亲水性的 SP-A、SP-D 和疏水性的 SP-B、SP-C,其中 SP-A 含量最丰富,约占 SP 总量的 50%^[1]。最初人们对 SP-A 的研究仅局限于肺组织,近年来越来越多的研究发现其在多个组织器官如肠、肾、黏膜组织及中枢神经系统中都有表达,且 SP-A 含量的变化与肺内和肺外疾病密切相关^[2]。因此,SP-A 在局部防御及免疫调节方面的重要作用也越来越引起人们的广泛关注。现就 SP-A 的特征性结构、功能,以及在多种疾病中的表达和免疫调节作用进行综述。

1 SP-A 的结构特征

SP-A 是属于凝集素家族的一种模式识别分子,具有凝集素家族蛋白特征性的多聚体结构,每个单体由 4 个不同的结构域组成: N-末端区域参与链内二硫键的低聚反应,胶原样区域(4CLR)构成多聚化三联螺旋体结构,α-螺旋结构域维持肽链多聚状态, C 端糖识别域(CRD)用于识别并结合碳水化合物^[1]。其中 CRD 是凝集素家族共有的结构,位于肽链的羧基端,为球状结构区,其上有钙依赖型糖识别位点,在钙离子参与下,可促使凝集素蛋白与多种病原体的糖结合^[3]。3 个肽链由二硫键和非共价键连接组成一个稳定的三聚体亚基,构成 SP-A 的三级结构。SP-A 的四级结构是由 6 个三聚体并联而成(6 × 3 = 18 CRDs),呈“花束”样排列。其颈部由 N-末端区域和 CLR 的一部分构成,

而 α -螺旋结构域和 CLR 的剩余部分构成了“花冠”样结构,而肽链的另一末端 CRD 则卷曲呈球状结构域,使得花冠部成为凝集素糖识别部位,见图 1。这种多聚体结构增强了 SP-A 结合免疫细胞及病原体的能力,是其发挥免疫调节功能的生化基础^[4]。

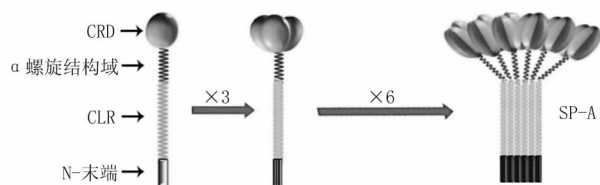


图 1 SP-A 的生化结构

2 SP-A 受体

由于拥有特殊的结构,SP-A 能够与多种免疫细胞和病原体表面受体结合,并参与调控免疫细胞功能及免疫炎症反应。SP-A 对免疫反应的不同作用主要依赖于参与调节的细胞受体不同,因此了解 SP-A 的结合受体对研究其免疫调节功能至关重要^[5]。Toll 样受体 (TLR) 是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质受体,是一组高度保守的模式识别受体,能通过识别病原相关分子模式 (PAMPs) 和危险相关分子模式 (DAMPs) 引发机体的天然免疫反应^[6-7]。活化后的 TLR 能促发细胞内级联反应并激活一系列转录因子,包括 NF- κ B、AP-1、IRF-3 和 IRF-7 等,并进一步促进多种促炎性细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 的产生^[8-9]。研究发现 SP-A 通过 Ca^{2+} 依赖途径以 CRD 结构域与 TLR2、TLR4 可溶性胞膜外区以及 MD-2 受体相结合^[10-11]。SP-A 能抑制 LPS 与 TLR4/MD-2 的结合并减弱 LPS 诱导的炎症级联反应^[12]。另有研究还证实,SP-A 能在转录后水平调控巨噬细胞 TLR2 和 TLR4 的表达^[13]。SP-A 虽能上调巨噬细胞 TLR2 表达,却又同时抑制了 TLR2 介导的 NF- κ B 信号通路,SP-A 通过影响信号通路中的关键调节因子,如 I κ B α 的磷酸化、p65 的核移位、MAPK 家族的成员磷酸化及 Akt 的磷酸化减少进而影响 NF- κ B 信号传导,最终导致 TNF- α 显著减少^[14-15]。信号抑制调节蛋白 α (SIRP α) 是一类广泛表达的糖蛋白分子,属于免疫球蛋白超家族结构域受体。SIRP α 在多种免疫细胞如巨噬细胞和树突细胞的表面均有特异性表达^[16]。有研究发现 SIRP α 在维持并调节小鼠 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的稳态过程中发挥重要作用。此外,SIRP α 还被证实参与抑制巨噬细胞中 TLR 介导的信号通路,因此也被认为在沟通机体固有免疫和获得性免疫过程中具有重要意

义^[17]。研究报道 SP-A 能通过与 SIRP α 和 CD-91 钙网蛋白复合物相结合调节免疫细胞功能。当接触病原时,SP-A 通过 CRD 结构域结合 SIRP α 并抑制炎症介质的产生;当接触外源性微生物或细胞碎片时,SP-A 通过其 CRD 结构域结合病原,而游离的 CLR 区域通过 CD-91 钙网蛋白活化免疫细胞^[18]。此外,研究还发现 SP-A 还能结合天然和重组的可溶性 CD14。CD14 是 LPS 的结合受体,SP-A 的 α -螺旋结构域与 CD14 亮氨酸富含区结合,并在 LPS/CD14 相互作用中起到重要的调节作用^[19]。SPR-210 (surfactant protein receptor 210 kDa) 最初是从巨噬细胞 U937 细胞株中纯化提取的 SP-A 结合蛋白,在 II 型肺泡细胞及肺泡巨噬细胞中也有表达,SP-A 通过 CLR 区域结合 SPR-210,并参与介导结核分枝杆菌的摄取^[20]。此外,SP-A 还能直接通过 CRD 结构域和钙离子依赖途径结合各种细菌、真菌和病毒表面的甘露聚糖、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺及脂质来识别它们。还有研究证实 SP-A 能结合糖蛋白-340 (Gp-340)、髓过氧化物酶 (MPO)、补体蛋白 C1q、免疫球蛋白以及补体受体 CR3 等,并通过多种途径参与机体的免疫反应^[21]。

3 SP-A 的免疫调节作用

机体在自然状态下接触到很多致病性的病原体及抗原,从而触发免疫细胞介导的免疫应答,以保护机体抵抗外来刺激的入侵。SP-A 作为 C 型胶原凝集素的一员,能通过多种机制参与免疫调节作用。首先,SP-A 的糖识别域能黏合多种细菌、真菌以及病毒等病原体,并通过和免疫细胞受体结合募集巨噬细胞及中性粒细胞参与炎症反应调节,直接杀伤病原微生物^[22]。其次,SP-A 还能增强巨噬细胞等免疫细胞对病原体的吞噬清除功能,而敲除 SP-A 基因后小鼠肺泡巨噬细胞吞噬病原菌的能力明显下降^[23]。SP-A 还能通过上调免疫细胞表面的病原结合受体从而增强免疫细胞对病原的摄取,研究发现 SP-A 能增强巨噬细胞表面清道夫受体 A 进而促进其对肺炎链球菌的摄入,还能通过上调人巨噬细胞表面甘露糖受体的表达促进结核分枝杆菌清除^[24-25]。另有研究发现,SP-A 能抑制树突细胞的成熟,并抑制了由植物凝集素、CD3 特异性抗体和佛波酯诱导的 T 细胞增殖^[26]。SP-A 的 CLR 和 CRD 结构域通过 Ca^{2+} 通路抑制 T 细胞活化,进而抑制由 T 细胞活化引发的炎症级联反应^[27]。另有体外研究证实 SP-A 能增强肺泡巨噬细胞对凋亡细胞的摄取。SP-A 能通过钙网蛋白和 CD91 依赖途径结合凋亡细胞并对其产生清除作用^[28]。此外,SP-A 还能参与调节细胞炎症反应,但不同研究表明 SP-A 对 TNF- α 等炎性

介质的产生既有上调作用又有下调作用^[29]。随着研究的深入,发现 SP-A 是增强还是减弱炎性反应则主要取决于参与调节的细胞受体不同,而结合的受体又取决于 SP-A 与免疫细胞及病原体之间的相互作用。SP-A 如何在体内外调节多重细胞炎性反应仍需要进一步研究。因此,SP-A 可以调控免疫调节相关受体和细胞因子的表达,并能通过诱导活化的淋巴细胞凋亡等生理过程来维持免疫稳态,进而发挥其在机体免疫监视中的重要作用。

在呼吸系统中,SP-A 在多种呼吸道病原体的先天免疫应答中起重要作用,包括 A 型流感病毒、呼吸道合胞病毒、结核分枝杆菌、烟曲霉、铜绿假单胞菌和流感嗜血杆菌等。SP-A 通过识别和结合各种病原体并触发各种免疫反应,包括调理作用,增强吞噬作用以及募集巨噬细胞和嗜中性粒细胞杀死病原体,并通过增加细胞膜通透性来抑制微生物的活性等。SP-A 还有助于清除凋亡细胞并调节炎性反应。SP-A 与免疫细胞的相互作用及其启动清除的机制主要是由 SP-A 的胶原蛋白区域与这些细胞上的相关受体分子介导的。因此,SP-A 的免疫调节功能在维持肺稳态和保护肺部不受感染等方面非常重要。现在已知 SP-A 的表达不仅仅限于肺部,还在人体其他黏膜表面及肺外组织也表现出广泛的免疫活性,如消化系统、生殖系统及中枢神经系统等。但其在肺外部位的免疫调节作用还在不断的研究和探索中^[1]。

4 SP-A 在肺外组织中的分布及作用

4.1 消化道中的 SP-A 研究发现有一种类似于肺表面活性物质的疏水性蛋白位于消化道上皮细胞顶部边缘和腔内容物之间,并最终认定为消化道表面活性物质^[30]。随后,研究人员又在大鼠肠道上皮细胞中检测到 SP-A 的蛋白和 mRNA 表达,认为该蛋白是由肠上皮细胞自身产生并分泌的。研究发现消化道表面的肺表面活性蛋白不但具有润滑并维持胃肠道表面张力的作用,促进肠道蠕动,还能有效地抑制肠道溃疡因素^[31]。研究发现,在炎性肠病及坏死性肠炎病例中 SP-A 表达上调并参与免疫炎性调控。坏死性肠炎的动物模型中,口服 SP-A 蛋白能有效降低肠内的炎性反应,减少 TLR4 的表达及促炎性细胞因子^[32]。胃肠道中的 SP-A 能通过结合病原体表面受体减少其黏附于消化道上皮细胞,并通过结合细胞表面的特异性结合受体来抑制其下游炎性信号通路,进而参与宿主的免疫调控^[33]。

4.2 女性生殖系统及羊水中的 SP-A 研究表明,免疫活性 SP-A 在女性生殖系统中广泛表达并参与免疫

防御。在人体的子宫肌层、阴道上皮细胞及阴道灌洗液中检测到 SP-A 的存在,且在女性月经周期不同阶段阴道灌洗液中 SP-A 的水平存在差异,卵泡期 SP-A 水平达到峰值,这一变化可能与月经期阴道黏膜变薄,阴道菌群失调导致阴道更易感染有关^[34]。此外,女性生殖系统中表达的 SP-A 能参与抵抗性传播病原体的侵袭。研究发现 SP-A 通过结合人类免疫缺陷病毒(HIV)的包膜糖蛋白 gp120 抑制 HIV 感染 CD4 T 淋巴细胞,表明其可能具有抗 HIV 的作用^[35]。自怀孕 26 周开始,人的羊水中就能检测到 SP-A 蛋白的表达,而到邻近分娩时(40 周) SP-A 水平显著升高并能达到 2~8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[36-38]。免疫组化染色发现在孕晚期的羊膜上皮细胞和绒毛膜细胞中都有 SP-A 表达,SP-A 通过羊膜细胞和蜕膜巨噬细胞识别并清除羊水外的病原体,抑制孕期的宫内感染,减少绒毛膜羊膜炎的发生^[39]。人的分娩过程与宫内组织分泌的催产素 PGF2 α 和促炎性细胞因子 TNF- α 密切相关。作为炎性调节蛋白,SP-A 能够有效地抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 并推迟 PGF2 α 合成信号通路^[40]。此外,研究还发现 SP-A 在小鼠分娩早期表达升高,并伴随着 IL-1 β 和 NF- κB 水平上升。IL-1 β 和 NF- κB 都能刺激 PGF2 α 合成信号通路,并诱发早产^[41]。不仅如此,SP-A 还能清除子宫平滑肌周围的凋亡和坏死细胞,从而降低了宫缩引发炎症反应的风险^[42]。

4.3 咽鼓管、鼻窦中的 SP-A Yamanaka 等^[43]早期在人类的中耳灌注液中发现免疫活性 SP-A 的存在,开启了 SP-A 在另一组织的研究。此后,另有研究人员发现把天竺鼠的肺表面活性物质、盐水和混合磷脂灌入大鼠的中耳,发现肺表面活性物质能显著降低张开咽鼓管所需要的张力。经进一步组织病理和分子生物学检测证实,成年大鼠的中耳上皮细胞和鼻旁窦黏膜下腺中都表达 SP-A 蛋白和 mRNA,且感染大鼠与未感染大鼠相比,中耳上皮细胞中 SP-A mRNA 水平明显升高^[44]。此外,在由感染、过敏或其他自身免疫性原因引起的慢性鼻窦炎患者中也发现 SP-A 表达显著升高。SP-A 蛋白还被检测到在咽鼓管上皮细胞中表达分泌,并具有抗炎的作用。作为病原体进入中耳的必经之路,咽鼓管黏膜所产生的保护因子对于复发性中耳炎的防护至关重要。研究发现,对复发性中耳炎敏感性不同的儿童表达的 SP-A 表型存在差异,并认为咽鼓管上皮细胞中表达的 SP-A 蛋白参与病原体的清除并调节免疫相关反应^[45]。

4.4 中枢神经系统中的 SP-A 最近,SP-A 在中枢神经系统(CNS)中的表达也得到了证实。Luo 等^[46]最

先在 SD 大鼠的脑组织中检测到具免疫活性的 SP-A 表达,且发现 SP-A 在髓鞘周围的少突胶质细胞中深染。随后, Schob 等^[47]在人脑活检组织和多种中枢神经系统疾病患者脑脊液中检测肺表面活性物质的表达变化发现, SP-A 在中枢神经系统中广泛表达, 神经元、胶质细胞和室管膜细胞中都有 SP-A 蛋白和 mRNA 表达, 并认为检测到的 SP-A 是由 CNS 组织自身产生的。此外, SP-A 在自身免疫性脑病和脑炎患者的脑脊液中含有较阴性对照组显著降低, 提示其可能与 CNS 的免疫炎症性调节有关。Yang 等^[48]在研究中发现, 大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型(EAE)中 SP-A 的分布和表达水平在 EAE 发病初期、高峰期和缓解期随着炎症反应和胶质细胞的变化而变化, 呈正相关。研究还发现 SP-A 在大鼠脑组织的星形胶质细胞以及体外培养人星形胶质细胞和小胶质细胞中的表达, 且在 LPS 的刺激下 SP-A 表达水平增加, 且外源性加入 SP-A 能抑制星形胶质细胞和小胶质细胞中 TLR4 和 NF- κ B P65 的表达, 同时减少了 TNF- α 和 IL-1 β 的产生, 由此认为 SP-A 能通过结合星形胶质细胞和小胶质细胞的 TLR4 信号通路从而参与 CNS 免疫炎症性反应的调节。

除以上组织器官外, 研究人员还在胸腺、前列腺、肾脏和脾脏等组织中都检测到免疫活性 SP-A。此外, 在胸膜、心包、关节滑膜等细胞中也存在 SP-A, 且这些部位的 SP-A 也具有结合并清除致病原的作用, 在先天性免疫和获得性免疫机制中发挥重要的作用^[49]。

5 小 结

综上所述, SP-A 除了具有降低肺泡表面张力、提高肺的顺应性及促进气体交换的作用以外, 还参与机体的免疫防御及调节。SP-A 在免疫炎症反应及调节中的作用机制十分复杂且多元, 而 SP-A 在其他组织器官中的表达及免疫调节作用也突破了人们对这种肺表面活性蛋白的狭隘认识。SP-A 在不同系统疾病中的表达变化及免疫调控作用得到了广泛的研究, 但其调控机制仍有待进一步探究。SP-A 调控免疫炎症反应的信号通路及其相关分子遗传调控机制具有重要的研究价值, 不同组织器官之间的 SP-A 是否存在相互作用并调控机体的免疫炎症反应是未来研究的重点。因此, 对 SP-A 的免疫炎症性调控机制的深入探究能为多种疾病的治疗带来突破。

参考文献

- [1] Ujma S, Horsnell WG, Katz AA, et al. Non-pulmonary immune functions of surfactant proteins A and D. [J]. J Innate Immun, 2017, 9 (1): 3-11. DOI: 10.1159/000451026.
- [2] Vieira F, Kung JW, Bhatti F. Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins [J]. Ann Anat, 2017, 211: 184-201. DOI: 10.1016/j.aanat.2017.03.002.
- [3] Autilio C, Perez-Gil J. Understanding the principle biophysics concepts of pulmonary surfactant in health and disease [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2019, 104: F443-F451. DOI: 10.1136/archdischild-2018-315413.
- [4] Goyal S, Castrillon-Betancur JC, Klaile E, et al. The interaction of human pathogenic fungi with c-type lectin receptors [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1261. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01261.
- [6] Luo L, Lucas RM, Liu L, et al. Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors [J]. J Cell Sci, 2019, 133 (5): jcs239194. DOI: 10.1242/jcs.239194.
- [7] 吴限. Toll 样受体通过炎症反应和免疫反应介导心肌纤维化的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2017, 16 (5): 525-529. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2017.05.024.
- [8] Kim JS, Kim YR, Yang CS. Latest comprehensive knowledge of the crosstalk between TLR signaling and mycobacteria and the antigens driving the process [J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29 (10): 1506-1521. DOI: 10.4014/jmb.1908.08057.
- [9] Wong SK, Chin KY, Ima-Nirwana S. Toll-like receptor as a molecular link between metabolic syndrome and inflammation: A review [J]. Current Drug Targets, 2019, 20 (12): 1264-1280. DOI: 10.2174/1389450120666190405172524.
- [10] Awasthi S, Singh B, Ramani V, et al. TLR4-interacting SPA4 peptide improves host defense and alleviates tissue injury in a mouse model of Pseudomonas aeruginosa lung infection [J]. Plos One, 2019, 14 (1): e0210979. DOI: 10.1371/journal.pone.0210979.
- [11] Ghaffarpour S, Foroutan A, Askari N, et al. SP-A and TLR4 localization in lung tissue of SM-exposed patients [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 80: 105936. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105936.
- [12] Agrawal V, Smart K, Jilling T, et al. Surfactant Protein (SP)-A Suppresses Preterm Delivery and Inflammation via TLR2 [J]. Plos One, 2013, 8 (6): e63990. DOI: 10.1371/journal.pone.0063990.
- [13] Que Y, Shen X. Changes in blood monocyte Toll-like receptor and serum surfactant protein A reveal a pathophysiological mechanism for community-acquired pneumonia in patients with type 2 diabetes [J]. Intern Med J, 2016, 46 (2): 213-219. DOI: 10.1111/imj.12978.
- [14] Nayak A, Dodagatta ME, Tsolaki AG, et al. An insight into the diverse roles of surfactant proteins, SP-A and SP-D in innate and adaptive immunity [J]. Front Immunol, 2012, 3: 131. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00131.
- [15] Nguyen HA, Rajaram MV, Meyer DA, et al. Pulmonary surfactant protein A and surfactant lipids upregulate IRAK-M, a negative regulator of TLR-mediated inflammation in human macrophages [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303: L608-616. DOI: 10.1152/ajplung.00067.2012.
- [16] Beek EM, Zarate JA, Bruggen RV, et al. SIRP alpha Controls the Activity of the Phagocyte NADPH Oxidase by Restricting the Expression of gp91 (phox) [J]. Cell Rep, 2012, 2 (4): 748-755. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.08.027.
- [17] Yang HC, Shao RY, Huang HX, et al. Engineering macrophages to phagocytose cancer cells by blocking the CD47/SIRP α axis [J].

- Cancer Medicine, 2019, 8 (9) : 4245-4253. DOI: 10. 1002/cam4. 2332.
- [18] Zhang LL, Meng QH, Yepuri N, et al. Surfactant proteins-A and -D attenuate lps-induced apoptosis in primary intestinal epithelial cells (IECS) [J]. Shock, 2018, 49 (1) : 90-98. DOI: 10. 1097/SHK. 0000000000000919.
- [19] Yang L, Carrillo M, Wu YM, et al. SP-R210 (Myo18A) Isoforms as Intrinsic Modulators of Macrophage Priming and Activation [J]. Plos One, 2015, 10 (5) : e0126576. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0126576.
- [20] Yang CH, Szeliga J, Jordan J, et al. Identification of the surfactant protein A receptor 210 as the unconventional myosin 18A [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (41) : 34447-34457. DOI: 10. 1074/jbc. M505229200.
- [21] Jkel A, Qaseem AS, Kishore U, et al. Ligands and receptors of lung surfactant proteins SP-A and SP-D [J]. Front Biosci, 2013, 18: 1129-1140. DOI: 10. 2741/4168.
- [22] Tan RM, Kuang Z, Hao Y, et al. Type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-A [J]. J Innate Immun, 2014, 6 (2) : 227-239. DOI: 10. 1159/000354304.
- [23] Watson A, Phipps MJS, Clark HW, et al. Surfactant Proteins A and D: Trimerized Innate Immunity Proteins with an Affinity for Viral Fusion Proteins [J]. J Innate Immun, 2019, 11 (1) : 13-28. DOI: 10. 1159/000492974.
- [24] Casals C, Campanero-Rhodes MA, Garcia-Fojeda B, et al. The role of collectins and galectins in lung innate immune defense [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1998. DOI: 10. 3389/fimmu. 2018. 01998.
- [25] Carreto-Binaghi LE, Aliouat E, Taylor ML. Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins [J]. Resp Res, 2016, 17 (1) : 66. DOI: 10. 1186/s12931-016-0385-9.
- [26] Tschernig T, Veith NT, Diler E, et al. The importance of surfactant proteins-New aspects on macrophage phagocytosis [J]. Ann Ana, 2016, 208: 142-145. DOI: 10. 1016/j. aanat. 2016. 07. 005.
- [27] Bernhard W. Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology [J]. Ann Ana, 2016, 208: 146-150. DOI: 10. 1016/j. aanat. 2016. 08. 003.
- [28] Kopincova J, Kopincova J. Meconium-induced inflammation and surfactant inactivation: specifics of molecular mechanisms [J]. Pediatric Research, 2016, 79 (4) : 514-521. DOI: 10. 1038/pr. 2015. 265.
- [29] Nguyen HA, Rajaram MVS, Meyer DA, et al. Pulmonary surfactant protein A and surfactant lipids upregulate IRAK-M, a negative regulator of TLR-mediated inflammation in human macrophages [J]. AM J Physiol-Lung C, 2012, 303 (7) : L608-L616. DOI: 10. 1152/ajplung. 00067. 2012.
- [30] Canpolat FE, Yurdakok M, Ersin SC. Effects of enterally administered surfactant in a rat model of necrotizing enterocolitis. [J] Neonatology. 2012; 102: 53-8. DOI: 10. 1159/000336571.
- [31] Aron CZ, Bi W, Alcorn JL. A physiologic, extrapulmonary role of surfactant protein-a to reduce thr4 in the neonatal gastrointestinal tract through a protein degradation pathway [J]. Investig Med, 2017, 65 (2) : 612-612. DOI: 10. 1136/jim-2016-000393. 533.
- [32] Quintanilla HD, Liu Y, Fatheree NY, et al. Oral Administration of Surfactant Protein-A Reduces Pathology in an Experimental Model of Necrotizing Enterocolitis [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2015, 60: 613-620. DOI: 10. 1097/MPG. 0000000000000678.
- [33] Schicht M, Stengl C, Sel S, et al. The distribution of human surfactant proteins within the oral cavity and their role during infectious diseases of the gingiva [J]. Ann Anat, 2015, 199: 92-97. DOI: 10. 1159/000451026.
- [34] MacNeill C, de Guzman G, Sousa GE, et al. Cyclic changes in the level of the innate immune molecule, surfactant protein-A, and cytokines in vaginal fluid [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68: 244 - 250. DOI: 10. 1111/j. 1600-0897. 2012. 01155. x.
- [35] Gaiha GD, Dong T, Palaniyar N, et al. Surfactant protein A binds to HIV and inhibits direct infection of CD4⁺ cells, but enhances dendritic cell-mediated viral transfer [J]. J Immunol, 2008, 181: 601 - 609. DOI: 10. 4049/jimmunol. 181. 1. 601.
- [36] MacNeill C, de Guzman G, Sousa GE, et al. Cyclic changes in the level of the innate immune molecule, surfactant protein-A, and cytokines in vaginal fluid [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68: 244-250. DOI: 10. 1111/j. 1600-0897. 2012. 01155. x.
- [37] Agrawal V, Smart K, Jilling T, et al. Surfactant Protein (SP)-A Suppresses Preterm Delivery and Inflammation via TLR2 [J]. Plos One, 2013, 8 (5) : 613-620. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0063990.
- [38] Madhukaran SP, Koippallil Gopalakrishnan AR, Pandit H, et al. Expression of surfactant proteins SP-A and SP-D in murine decidua and immunomodulatory effects on decidual macrophages [J]. Immunobiology, 2016, 221: 377 - 386. DOI: 10. 1016/j. imbio. 2015. 09. 019.
- [39] Salminen A, Vuolteenaho R, Paananen R, et al. Surfactant protein A modulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response related to preterm birth [J]. Cytokine, 2011, 56: 442-449. DOI: 10. 1016/j. cyto. 2011. 07. 025.
- [40] Agrawal V, Smart K, Jilling T, et al. Surfactant Protein (SP)-A Suppresses Preterm Delivery and Inflammation via TLR2 [J]. Plos One, 2013, 8: 613-620.
- [41] Salminen A, Vuolteenaho R, Paananen R, et al. Surfactant protein A modulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response related to preterm birth [J]. Cytokine, 2011, 56: 442-449. DOI: 10. 1016/j. cyto. 2011. 07. 025.
- [42] Madhukaran SP, Kishore U, Jamil K, et al. Decidual expression and localization of human surfactant protein SP-A and SP-D, and complement protein C1q [J]. Mol Immunol, 2015, 66: 197-207. DOI: 10. 1016/j. molimm. 2015. 03. 001.
- [43] Yamanaka N, Kobayashi K, Kataura A, et al. Implication of surfactant apoprotein in otitis media with effusion [J]. Ann Otol, Rhinol, Laryngol, 1991, 100: 835-840. DOI: 10. 1177/ 000348949110001009.
- [44] Li L, Guo X, Olszewski E, et al. Expression of surfactant protein-A during LPS-induced otitis media with effusion in mice [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2015, 153: 433-439. DOI: 10. 1177/ 0194599815587699.

MYH9 相关疾病基因型与表型相关性 及治疗策略的研究进展

连晓强综述 刘小军,郝冀洪审校

基金项目: 河北省卫计委医学科学研究课题(20180268)

作者单位: 050000 石家庄,河北医科大学第二医院检验科(连晓强、郝冀洪),血液科(刘小军)

通信作者: 郝冀洪, E-mail: haojihong2003@163.com

【摘 要】 MYH9 相关疾病(MYH9-RD)是由编码非肌性肌球蛋白重链 II A 的 MYH9 基因突变引起的一种罕见的遗传性巨大血小板减少性疾病,典型表型为血小板减少、巨大血小板及中性粒细胞包涵体三联征,部分患者还可伴发肾炎、感音性耳聋、白内障及慢性肝酶异常等非血液系统症状。MYH9 相关疾病的突变型多达 137 种,并与表型具有一定相关性:当突变位于非肌性肌球蛋白重链 II A 的头部动力区,患者的出血倾向较严重,伴发非血液系统症状风险更高且进展更快;而携带非肌性肌球蛋白重链 II A 杆、尾部结构域突变的患者,出血表现相对较轻,伴发非血液系统症状的风险相对较低。这种基因型与表型的相关性为临床早期诊断、风险预测及早期干预奠定了理论基础。文章对近年来 MYH9-RD 基因型与表型的相关性及治疗策略的研究进展做一综述。

【关键词】 MYH9 相关疾病;非肌性肌球蛋白重链 II A;基因型;表型;治疗策略

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.024

Researches progress on the correlation between genotype and phenotype of MYH9 related disorders and treatment strategies Lian Xiaoqiang*, Liu Xiaojun, Hao Jihong. * Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Hao Jihong, E-mail: haojihong2003@163.com

Funding program: Hebei Health Commission Scientific Research Program(20180268)

【Abstract】 MYH9 related disorder (MYH9-RD) is a rare inherited syndrome characterized by giant platelets and thrombocytopenia with or without other non-hematological symptoms such as nephropathy, deafness and cataract. MYH9-RD is caused by the mutations of MYH9 which encodes the non-muscle myosin heavy chain II A (NMMHC-II A). To date, 137 mutations for MYH9-RD have been reported. It has been demonstrated that most cases with mutations in global motor of NMMHC-II A tend to display severe bleeding tendency and high risk of non-hematological symptoms, whereas the patients with mutations in coil-coil or non helix tail of NMMHC-II A have relatively mild bleeding and lower risk of associated phenotype. The correlation provides a theoretical foundation for early diagnosis, risk prediction and intervention. The association between MYH9-RD genotype and phenotype and the relevant treatment of MYH9-RD are reviewed.

【Key words】 MYH9 related disorder; Non muscle myosin heavy chain II A; Genotype; Phenotype; Treatment Strategy

MYH9 相关疾病(MYH9-related disorder, MYH9-RD)是一种由编码非肌性肌球蛋白重链 II A(non muscle myosin heavy chain II A, NMMHC-II A)的 MYH9 基因杂合突变引起的一种罕见的遗传性血小板减少性疾病,典型表现为血小板减少、巨大血小板及中性粒细胞中 Döhle 小体样包涵体三联征,部分患者还可伴发肾病、高频听力障碍、白内障及慢性肝酶异常等非血液学症状^[1-2]。MYH9-RD 临床表型具有异质性,以往学者

们常依据不同的实验室检查特征及非血液学症状,将该病分为 4 种不同亚型:May-Hegglin 异常、Sebastian 综合征、Fechtner 综合征和 Epstein 综合征^[3],见表 1。随着测序技术的应用和发展,2000 年 MYH9 基因被认为以上 4 种疾病的共同致病基因,MYH9-RD 的命名才被广泛应用。MYH9-RD 是人群中发病率相对较高的遗传性血小板减少性疾病,但由于患者血小板减少程度不同、出血倾向差异大,因此常被误诊为特发性血

小板减少性紫癜,导致激素及脾切除等不当治疗。为提高 MYH9-RD 认知水平,做到早诊、早防、早治,分析基因型与表型的相关性并建立精准的风险预测模型已成为相关学者们当下的研究热点。MYH9 相关疾病的突变型多达 137 种,并与表型具有一定相关性:当突变位于 NMMHC-Ⅱ A 的头部动力区,患者的出血倾向较重,伴发非血液系统症状风险更高且进展更快;而携带位于 NMMHC-Ⅱ A 杆、尾部区域突变的患者,出血表现相对较轻,伴发非血液系统症状的风险也相对较低。然而,近年来研究发现,部分 MYH9 突变位点在人群中的相关表型存在较大的异质性:位于 NMMHC-Ⅱ A 相同区域的不同位点突变以及相同位点的不同氨基酸替代均可出现较大的表型差异^[4]。给临床医师评估 MYH9-RD 患者的疾病风险及干预带来困难。因此,本文现对近年来 MYH9-RD 基因型与表型的相关性及相应治疗策略做一综述,以便帮助提高临床及实验人员对该病的认知水平。

表 1 MYH9-RD 4 种亚型特征

临床表现	May-Hegglin 异常	Epstein 综合征	Fechtner 综合征	Sebastian 综合征
血小板减少	+	+	+	+
巨大血小板	+	+	+	+
中性粒细胞包涵体	+	-	+	+
听力障碍	-	+	+	-
白内障	-	-	+	-
肾炎	-	+	+	-

注:May-Hegglin 异常中性粒细胞包涵体是核糖体群沿着平行微丝组成;Sebastian 综合征的中性粒包涵体由高度分散的微丝、粗面内质网及核糖体组成

1 MYH9-RD 基因型与表型的相关性

1.1 MYH9-RD 的基因型 MYH9 (NC_000022.11) 位于 22q12.3,全长 106 791bp,包含 41 个外显子,其中 1 号外显子不参与蛋白编码。MYH9 基因的编码产物为 1 960 个氨基酸组成的 NMMHC-Ⅱ A,由头端球部动力区(2~19 号外显子)、颈部(20 号外显子)及杆状尾部(21~41 号外显子)构成,分子量为 220kd。一对 NMMHC-Ⅱ A 与一对调节轻链、一对基础轻链共同构成异六聚体的非肌性肌球蛋白Ⅱ A(non muscle myosinⅡ A,NMM-Ⅱ A),在胞质分裂、细胞运动以及细胞形态维持等方面起重要作用^[5]。目前全世界已正式报道了至少 300 多个家系的 137 种 MYH9 的致病突变,其中大多数为替代错义突变,少数为缺失/重复类型的整码突变。无义突变和缺失突变则多见于 41 号外显子,常导致 NMMHC-Ⅱ A 蛋白翻译提前终止^[6-8]。MYH9

突变通常涉及 21 个位点,其中又以位于 NMMHC-Ⅱ A 头部结构域的 S96、R702 和位于 NMMHC-Ⅱ A 杆尾区域的 R1165、D1424 及 E1841 为最常见的突变位点,约占所有病例的 80%^[6,9]。

1.2 MYH9-RD 基因型与非血液学表型的相关性 不同的突变位点与临床表型具有一定的相关性。这种相关性最早体现在研究人员对 MYH9-RD 4 种亚型的认知。血小板减少程度不一及非血液学症状风险的异质性给 MYH9-RD 的诊断带来了挑战。2008 年,Pecci 等^[10]首次进行了 MYH9-RD 基因型与表型的相关性研究,通过对来自 59 个家系的 108 例 MYH9-RD 患者调查发现:当突变位于 NMMHC-Ⅱ A 头部区域时,患者出血程度严重,伴有严重肾病、神经性耳聋的风险更高,其中以 MYH9 R702 突变患者临床表现最为严重;当突变位点位于 NMMHC-Ⅱ A 杆、尾区域时,患者出血及伴非血液系统症状的风险较低,其中携带 MYH9 R1933 突变的患者一般不发生肾病或白内障,仅在年老时可能伴发听力障碍。这种表型规律既帮助了临床早期诊断,同时也为患者伴发病的风险预测和遗传咨询奠定了理论基础。然而,Hao 等^[11]报道了一个中国 MYH9 p. E1841K 家系,该突变位于 NMMHC-Ⅱ A 杆尾区,包括先证者在内的共 7 名家系成员均伴有严重肾病或蛋白尿,其中有 3 例患者死于尿毒症;而 De Rocco 等^[12]对一个 MYH9 p. V34G 的家系中 3 例患者进行了表型调查:尽管突变位于 NMMHC-Ⅱ A 头部区域,但 3 例患者均无出血和肾病表现;国内学者 Sun 等^[13]也发现,来自不同家系的 2 例未成年的 MYH9 p. R702H 患者均未伴发耳聋、肾病及白内障等症状。以上研究表明部分 MYH9 突变的位置与表型的相关性差,提示可能存在其他调控机制,如表观遗传学或年龄等因素影响疾病表型发生、发展。为进一步建立精准的基因型与表型关系,Pecci 等^[14]再次对来自 121 个家系的 255 位受试者的基因型与表型进行了相关性分析,通过对突变区域分组的细化,发现突变位于 NMMHC-Ⅱ A 球部结构域的高保守区 SH1 (SH1 helix,SH1) 的患者伴有肾病、耳聋的风险最高,而且非血液学伴发症状的起病年龄更早,进展程度更快;突变位于 SH3/MD (SH3-like motif/motor domain interface,SH3/MD) 及双螺旋杆部区域的患者伴有肾病、耳聋的风险次之,而突变位于蛋白非螺旋尾端的患者发病风险最低。这种相关性也在随后的 MYH9-RD 队列研究中得到了验证^[15]。在最常见的 MYH9 突变类型中,MYH9 R702 突变患者肾病、耳聋外显率几乎 100%,多在 40 岁之前起病,并且病情最为严重,而同样携带位于 NMMHC-Ⅱ A 头部结

构域的 S96 突变的患者伴发肾病及耳聋的风险大约有 50%^[14-15];当患者携带 MYH9 R1165 突变时,肾病及白内障发病风险低,但在 60 岁之前,患者几乎都可伴发听力障碍;而对于 D1424N 及 E1841K 患者,非血液系统表型风险极低,甚至终生不出现;尽管大部分 MYH9 D1424H 患者在 60 岁之前伴发肾病,但进展程度一般较轻,多数仅表现为蛋白尿等症状^[14]。表明相对于 MYH9 突变的位置,患者表型似乎与蛋白保守性的破坏程度及年龄的相关性更高。提示临床对携带 NMMHC-Ⅱ A 蛋白保守区域突变的患者更应该进行早期关注与干预。

此外,即使是相同位点突变,不同氨基酸的替代也可出现表型差异,如 MYH9 p. R702C 和 p. R1165L 突变的患者伴发耳聋的风险分别高于 p. R702H 和 p. R1165C 突变的患者,而 p. D1424H 突变的患者伴耳聋、肾病及白内障的风险则明显高于 p. D1424N 突变的患者^[14-16]。Guo 等^[17]近期报道了一个 MYH9 p. D1424N 家系,除先证者父亲及姑妈具有肾病表型外,包括先证者在内的其他患者均无任何伴发症状,这与上述 p. D1424N 患者伴发非血液表型低风险的现象较为一致。因此认为不同类型的氨基酸替代突变对 NMMHC-Ⅱ A 双螺旋结构的电荷平衡和疏水性的影响不同^[18],从而造成不同程度的结构破坏,进而导致疾病的严重程度或进展速度出现差异。除外保守区域,某些特殊位点突变引发非血液学并发症的风险也需引起临床的关注。Okano 等^[19]统计发现,低风险的 MYH9 p. R1165C 突变患者中仍有 36% 的病例伴发耳聋,23% 的病例伴发肾病,8% 的病例伴发白内障。同时,Guo 等^[17]及 Okano 等^[19]的研究显示,患者携带相同的氨基酸突变时也可以伴发不同表型,表明 MYH9-RD 的 4 种亚型可能是受年龄或环境影响的不同的病理进展阶段。Aoki 等^[20]对 MYH9 第 24 号外显子(依照 NC_000022.11,应为 25 号外显子)插入突变的患者资料进行了回顾性分析,发现白内障与该外显子的插入突变密切相关,提示在 NMMHC-Ⅱ A 铰链区的插入突变可能与白内障表型密切相关,体现了突变点位置对表型有影响作用。由于耳聋与白内障也是老年人常患疾病,对于高龄 MYH9-RD 患者,一般难以区分此类表型是否与 MYH9 突变有关。因此在进行单一突变位点的多家系数据统计分析时,采取年龄分层统计有助于真实了解基因型与伴发疾病表型的相关性。

1.3 MYH9-RD 基因型与血液学表型的相关性 血小板减少、巨大血小板是 MYH9-RD 的共性表型。然而,对于不同的突变位点,患者血小板减少程度也有较大

差异。Saposnik 等^[15]研究发现,当突变位于头部结构域时,患者的血小板计数明显减低,巨大血小板占比更高,出血倾向更严重,这与 Pecci 等^[10]的研究一致。值得注意的是,MYH9-RD 患者的出血倾向并不完全依赖于血小板计数,只有当血小板计数低于 $50 \times 10^9/L$ (预防自发性出血标准),两者才呈正相关^[19]。这种相关性为临床出血管理提供了参考,同时血小板计数与巨大血小板占比的反比关系也提示,在进行 MYH9-RD 患者血小板计数评估时,采取手工法复查血小板计数实有必要。此外,廖文君等^[7]提出同一家系中 MYH9-RD 患者的血小板计数还可能与年龄有关。尽管目前缺乏相应的数据整合,但这提示在分析 MYH9 突变位点与血小板计数的关系时,采取年龄分层统计可能有助于更精准的相关性模型建立。

目前,免疫荧光分析粒细胞 NMMHC-Ⅱ A 包涵体已成为 MYH9-RD 的重要诊断依据。MYH9-RD 患者的粒细胞包涵体的依据其分布特征可分为 3 型:1~2 个体积较大的圆形或椭圆形包涵体为 I 型;3~20 个直径小于 $1\mu m$ 的圆点状包涵体为 II 型;斑点样包涵体散在分布于胞浆为 III 型。随后,Saposnik 等^[15]研究发现包涵体分布特征也与 MYH9 突变位置相关:其中 I 型粒细胞包涵体多与 MYH9 基因第 39、40 及 41 号外显子突变相关;II/III 型包涵体常与第 2~31 号外显子突变紧密联系;而对于第 32、33 号外显子突变,则可能出现任何一型包涵体。为进一步细化 MYH9 突变位点与粒细胞包涵体分布特征的联系,Hao 等^[21]采用了分类树的方法,依据粒细胞包涵体大小与数量,对 5 种常见突变:p. R702C、p. R1165C、p. D1424N、p. E1841K、p. R1933X 的粒细胞包涵体分布特征进行归类,建立了基因型与包涵体分布特征的相关性,总体符合率达 88%。这种基因型与包涵体分布特征的相关模型的建立对 MYH9 突变位置具有一定的筛查作用。

2 MYH9-RD 的治疗策略

基因治疗被认为是治疗遗传病的最佳方法,但由于目前基因治疗技术的局限,遗传病的治疗仍然是人类面临的重要问题。MYH9-RD 患者出血表现多为轻至中度,在无严重的伴发症状时,一般不采取任何治疗措施。对 MYH9-RD 的围术期管理及进展程度较重的非血液学症状的治疗是临床干预的重点。

2.1 血小板减少的治疗 MYH9-RD 患者血小板减少的根治依赖于异种造血干细胞移植,但由于手术风险高于出血危害,一般应用较少。目前提高 MYH9-RD 患者血小板数量的主要治疗方式为血小板输注及人工刺激血小板生成。然而,长期血小板输注会增加潜在

的急性反应、病毒传播及后续血小板输注无效的风险,因此常用于无法控制的出血及术前预防^[9,22]。TPO 受体激动剂以艾曲泊帕和罗米司亭的应用较为广泛。2010 年,Pecci 等^[23]首次将艾曲泊帕用于治疗 MYH9-RD,患者的血小板数明显升高,出血情况也得到改善,且不良反应较轻。此后,该药开始逐渐被应用于 MYH9-RD 患者的围术期出血管理。多项研究发现^[24-26],包括孕妇在内的成人及儿童 MYH9-RD 患者,短疗程使用艾曲泊帕后血小板数升高明显,并且未出现任何并发症和外周血象异常。此外,罗米司亭也成功应用于 1 例 MYH9-RD 患者的神经外科手术中^[27]。值得注意的是,罗米司亭在刺激血小板生成的过程中,以提升正常体积的血小板为主,巨大血小板比例反而下降,提示刺激血小板生成的机制可能与改善血小板的生成异常有关^[27]。以上研究表明,短疗程使用 TPO 激动剂可能有助于 MYH9-RD 患者术前血小板的提升。然而,关于 MYH9-RD 患者长疗程应用 TPO 激动剂的疗效及安全性目前尚无定论。

2.2 非血液学伴发症的治疗 对于 MYH9-RD 的非血液学伴发症状,目前多采取对症治疗。肾病是 MYH9-RD 最严重的伴发症,由于其进展速度快、致死率高,目前临床有效治疗报道较少。少数临床研究发现,当 MYH9-RD 患者伴发肾病时,早期或进展程度低时使用肾素—血管紧张素系统阻滞剂可以有效降低蛋白尿水平^[28];当其进展为终末期肾病时,在保障围术期出血管理的前提下,进行肾脏移植能够取得较好预后,并且多无其他并发症^[29-30]。神经性耳聋是 MYH9-RD 患者最常见的非血液系统伴发症,主要表现为高频听力障碍且程度不一。对于轻至中度听力障碍的患者,使用助听器可以有效改善其生活质量;而当其进展为重度听力障碍时,人工耳蜗移植有助于听力恢复,一般无任何并发症^[31-32]。

3 结语与展望

MYH9-RD 是一种罕见的常染色体显性遗传病,以巨大血小板、血小板减少及粒细胞包涵体为实验室三联征。除血象改变外,MYH9-RD 还可出现非血液学异常,约有 50% 的患者伴发听力障碍,25% 的患者伴发肾病或蛋白尿,20% 的患者伴发白内障,且多为双侧^[14,18]。MYH9-RD 患者出血程度一般为轻至中度,但其非血液系统伴发症状及快速进展严重影响了患者的生活质量。研究发现,MYH9-RD 的基因型与表型具有一定的相关性。这种相关性对建立伴发症状的风险预测模型、实现 MYH9-RD 伴发征的早期预测、干预及遗传咨询具有重要意义。然而建立 MYH9-RD 基因

型与表型的相关性模型还有些问题亟待解决。一方面 MYH9-RD 属于少见遗传病,病例数少且患者临床资料的共享存在一定困难;另一方面 MYH9-RD 的发病机制尚不明确,临床表型是否存在个体化差异或与性别、年龄等因素相关,目前尚不完全清楚。因此在深入 MYH9-RD 的研究时,加强病例数据及临床资料共享、对病例的细化分组及单一突变位点的多数据分析,都有助于精准的基因型与表型的相关性模型建立。

参考文献

- [1] Pecci A, Biino G, Fierro T, et al. Alteration of liver enzymes is a feature of the MYH9-related disease syndrome [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4): e35986. DOI: 10.1371/journal.pone.0035986.
- [2] Favier R, DiFeo A, Heza RDN, et al. A new feature of the MYH9-related syndrome: chronic transaminase elevation [J]. *Hepatology*, 2013, 57(3): 1288-1289. DOI: 10.1002/hep.25913.
- [3] Tabibzadeh N, Fleury D, Labatut D, et al. MYH9-related disorders display heterogeneous kidney involvement and outcome [J]. *Clin Kidney J*, 2018, 12 (4): 494-502. DOI: 10.1093/ckj/sfy117.
- [4] 李运玲, 徐学聚, 张园, 等. MYH9 基因突变相关的遗传性血小板减少症 1 例并文献复习 [J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2018, 23 (6): 297-300.
- [5] 杨玉轩, 王医术, 李法平, 等. 非肌细胞肌球蛋白 II A 在肿瘤中的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2020, 24(1): 175-178.
- [6] Savoia A, De Rocco D, Pecci A. MYH9 gene mutations associated with bleeding [J]. *Platelets*, 2017, 28 (3): 312-315. DOI: 10.1080/09537104.2017.1294250.
- [7] 廖文君, 罗晓成, 张学, 等. 一个 MYH9 基因新突变导致的遗传性巨血小板减少症家系的遗传学分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2017, 34 (3): 352-356. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2017.03.008.
- [8] Zaninetti C, De Rocco D, Giangregorio T, et al. MYH9-related thrombocytopenia: four novel variants affecting the tail domain of the non-muscle myosin heavy chain IIA associated with a mild clinical evolution of the disorder [J]. *Hamostaseologie*, 2019, 39 (1): 87-94. DOI: 10.1055/s-0038-1645840.
- [9] Balduini A, Raslova H, Di Buduo CA, et al. Clinic, pathogenic mechanisms and drug testing of two inherited thrombocytopenias, ANKRD26- and MYH9-related diseases [J]. *Eur J Med Genet*, 2018, 61(11): 715-722. DOI: 10.1016/j.ejmg.2018.01.014.
- [10] Pecci A, Panza E, Pujolmoix N, et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain II A (NMMHC-II A) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29 (3): 409-417. DOI: 10.1002/humu.20661.
- [11] Hao J, Kunishima S, Guo X, et al. A large family with MYH9 disorder caused by E1841K mutation suffering from serious kidney and hearing impairment and cataracts [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91 (7): 1147-1148. DOI: 10.1007/s00277-011-1370-5.
- [12] De Rocco D, Zieger B, Platokouki H, et al. MYH9-related disease: five novel mutations expanding the spectrum of causative mutations and confirming genotype/phenotype correlations [J]. *Eur J Med Genet*, 2013, 56(1): 7-12. DOI: 10.1016/j.ejmg.2012.10.009.

- [13] Sun XH, Wang ZY, Yang HY, et al. Clinical, pathological, and genetic analysis of ten patients with MYH9-related disease[J]. *Acta Haematol*, 2013, 129(2): 106-113. DOI: 10.1159/000342123.
- [14] Pecci A, Klersy C, Gresele P, et al. MYH9-related disease: a novel prognostic model to predict the clinical evolution of the disease based on genotype-phenotype correlations[J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(2): 236-247. DOI: 10.1002/humu.22476.
- [15] Saposnik B, Bina RDS, Fenneteau O, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in a large French cohort of MYH9-related disorders[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2014, 2(4): 297-312. DOI: 10.1002/mgg3.68.
- [16] Verver EJ, Topsakal V, Kunst HP, et al. Nonmuscle myosin heavy chain II A mutation predicts severity and progression of sensorineural hearing loss in patients with MYH9-related disease[J]. *Ear Hear*, 2016, 37(1): 112-120. DOI: 10.1097/AUD.000000000000198.
- [17] Guo X, Lian X, Zhang W, et al. A D1424N mutation in the MYH9 gene results in macrothrombocytopenia and granulocytic inclusion bodies in a Chinese inherited macrothrombocytopenia pedigree[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(7): e171-173. DOI: 10.1515/ccbm-2017-0813.
- [18] Pecci A, Ma X, Savoia A, et al. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease[J]. *Gene*, 2018, 664: 152-167. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.048.
- [19] Okano S, Takase M, Iseki K, et al. Genotype-phenotype correlation of the p. R1165C mutation in the MYH9 disorder: report of a Japanese pedigree[J]. *J Pediatr Hematol oncol*, 2015, 37(6): e352-355. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000379.
- [20] Aoki T, Kunishima S, Yamashita Y, et al. Macrothrombocytopenia with congenital bilateral cataracts: a phenotype of MYH9 disorder with exon 24 indel mutations[J]. *J Pediatr Hematol oncol*, 2018, 40(1): 76-78. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000998.
- [21] Hao J, Kada A, Kunishima S. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain-II A localization for efficient genetic diagnosis of MYH9 disorders[J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(4): 709-711. DOI: 10.1007/s00277-017-3195-3.
- [22] Balduini CL, Pecci A, Noris P. Inherited thrombocytopenias the evolving spectrum[J]. *Hmostasologie*, 2012, 32(4): 259-270. DOI: 10.5482/ha12050001.
- [23] Pecci A, Gresele P, Klersy C, et al. Eltrombopag for the treatment of the inherited thrombocytopenia deriving from MYH9 mutations[J]. *Blood*, 2010, 116(26): 5832-5837. DOI: 10.1182/blood-2010-08-304725.
- [24] Pecci A, Barozzi S, d'Amico S, et al. Short-term eltrombopag for surgical preparation of a patient with inherited thrombocytopenia deriving from MYH9 mutation[J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(6): 1188-1189. DOI: 10.1160/TH12-01-0005.
- [25] Favier R, Feriel J, Favier M, et al. First successful use of eltrombopag before surgery in a child with MYH9-related thrombocytopenia[J]. *Pediatrics*, 2013, 132(3): e793-795. DOI: 10.1542/peds.2012-3807.
- [26] Favier R, De Carne C, Elefant E, et al. Eltrombopag to treat thrombocytopenia during last month of pregnancy in a woman with MYH9-related disease[J]. *A A Pract*, 2018, 10(1): 10-12. DOI: 10.1213/XAA.0000000000000621.
- [27] Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, et al. A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia[J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(9): 1599-1600. DOI: 10.1007/s00277-015-2416-x.
- [28] Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias[J]. *British journal of haematology*, 2011, 154(2): 161-174. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08716.x.
- [29] Min SY, Ahn HJ, Park WS, et al. Successful renal transplantation in MYH9-related disorder with severe macrothrombocytopenia: first report in Korea[J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(2): 654-656. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.11.144.
- [30] Hashimoto J, Hamasaki Y, Takahashi Y, et al. Management of patients with severe Epstein syndrome: Review of four patients who received living-donor renal transplantation[J]. *Nephrology*, 2019, 24: 450-455. DOI: 10.1111/nep.13253.
- [31] Pecci A, Verver EJ, Schlegel N, et al. Cochlear implantation is safe and effective in patients with MYH9-related disease[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2014, 9(1): 100. DOI: 10.1186/1750-1172-9-100.
- [32] Canzi P, Pecci A, Manfrin M, et al. Severe to profound deafness may be associated with MYH9-related disease: report of 4 patients[J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2016, 36(5): 415-420. DOI: 10.14639/0392-100X-702.

(收稿日期: 2019-12-16)

(上接 427 页)

- [45] Uhliarova B, Kopincova J, Adamkov M, et al. Surfactant proteins A and D are related to severity of the disease, pathogenic bacteria and comorbidity in patients with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps[J]. *Clin Otolaryngol*, 2016, 41: 249-258. DOI: 10.1111/coa.12508.
- [46] Luo M, Wan Y S, Liu Z Q. Regularity of distribution of immunoreactive pulmonary surfactant protein A in rat tissues[J]. *Int J Mol med*, 2004, 14(3): 343-351.
- [47] Schob S, Schicht M, Sel S, et al. The Detection of Surfactant Proteins A, B, C and D in the Human Brain and Their Regulation in Cerebral Infarction, Autoimmune Conditions and Infections of the CNS[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e74412. DOI: 10.1371/journal.pone.0074412.
- [48] Yang X, Yan J, Feng J. Surfactant protein A is expressed in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis, and suppresses inflammation in human astrocytes and microglia[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 3555-3565. DOI: 10.3892/mmr.2017.6441.
- [49] Sylvia U, William GCH, Arie AK, et al. Non-Pulmonary Immune Functions of Surfactant Proteins A and D[J]. *J Innate Immun*, 2017, 9(1): 3-11. DOI: 10.1159/000451026.

(收稿日期: 2019-12-24)