



疑难病杂志

YINANBING ZAZHI

2023年4月 第22卷 第4期

CHINESE JOURNAL OF DIFFICULT
AND COMPLICATED CASES

Volume 22 Number 4 April 2023

中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)

万方数据——数字化期刊群收录期刊

中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊

美国《化学文摘(CA)》来源期刊

乌利希国际期刊指南(UPD)收录期刊

日本科学技术振兴机构数据库(JST)收录期刊

《国家科技学术期刊开放平台》全文收录

国家卫生计生委首届优秀期刊



ISSN 1671-6450



中华人民共和国
国家卫生健康委员会 主管
中国医师协会 主办



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

编 辑
疑难病杂志编辑委员会

顾 问
王永炎 张 运 李春岩 张伯礼
葛均波 于金明 张英泽 刘 良
王 琦 丛 斌 黄璐琦 李佃贵

名誉总编辑
吴以岭

总编辑
贾振华

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
国内: 中国邮政集团有限公司
河北省报刊发行局
海外总发行: 中国国际图书贸易
集团有限公司
海外发行代号: M6888

订 购
全国各地邮政局(所)
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 20.00 元 全年 240.00 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1671-6450
CN 13-1316/R

2023 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

目 次

述 评

基于中医“治未病”思想 积极推进健康老龄化

..... 李红蓉 李雅文 陆璇 常丽萍 魏聪 337

心血管疾病专题

H 型高血压合并急性心肌梗死患者外周血 Furin、sTWEAK、

NLR 与心肌损伤指标和预后不良的关系

..... 刘红艳 杜玉杰 尤冉冉 孟祥慧 343

芪蒴强心胶囊联合左西孟旦注射液治疗老年急性心肌梗死合并

左心衰竭患者临床观察..... 刘杨 张娟 胡莹 张静文 350

冠心病合并甲状腺功能亢进患者肾素—血管紧张素系统活性及其

与并发心房颤动的相关性 孙兑荣 孙宇飞 李君 张宏伟 356

依洛尤单抗联合常规他汀与单纯他汀强化对急性冠脉综合征

患者疗效及对血清 HMGB1、SAA1、CCL19 表达的影响

..... 刘天骄 张欣 王晓菲 张田田 张俊峰 361

川崎病患儿血浆 YKL-40、CRP、IL-6 对急性期冠状动脉损伤的

诊断价值 闵丽 袁时健 刘亚红 王晋 牛少敏 杨轶男 董湘玉 367

肿瘤防治专题

KMT2D 在前列腺癌患者中的表达及其与临床病理特征

和预后的关系 李鸿斌 贺宝忠 侯琳 冯东 樊茂宇 373

FBXL2 和 Dkk-1 在结直肠癌组织中的表达及临床意义

..... 李晓宁 李小龙 宋瑞 张惠卿 377

结直肠癌患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 Wnt/ β -catenin

信号通路和预后的关系分析

..... 胡立宏 潘雪峰 关佳恒 张倩 郑国宝 383

宫颈液基细胞学 p16 及其联合高危 HPV 检测在宫颈癌和癌前病变筛查中的诊断价值	赵芳 马德勇 王婷婷 张岩 董颖 赵健	390
乳腺癌组织中 UEV1A、UBE2N 表达与上皮间质转化的关系及临床预后价值	吴欣妍 林小龙 王健宝 黄心瑜 唐仁梅	395
论著·临床		
慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 表达及其在肝纤维化诊断中的应用价值	孙瑞青 邓娟 李丰 王龙 王秀芳	402
生酮饮食联合高强度间歇训练干预非酒精性脂肪肝的效果	文艺霏 郑嵘灵 刘华英 潘珂君	408
支气管肺发育不良早产儿血浆 miR-15b、VEGF 水平变化及临床意义	张雯雯 翁景文 吴丹 向希盈 郑旭	414
系统性红斑狼疮患者外周血 Th17/Treg 细胞和尿单核细胞趋化蛋白-1 的检测及意义	郑雪娜 杨华强 李博君 覃骏	420
机器人辅助 MIS-TLIF 对腰椎管狭窄症患者肌电图、红细胞免疫的影响	李光富 彭丰 吴美平 杨威 彭博	426
罕见病例		
Aicardi-Goutières 综合征 2 例及文献复习	蒋琼 曾兰 朱会 王齐艳 罗泽民 孙春华 朱书瑶	432
Ⅱ型 Griscelli 综合征继发噬血细胞综合征 1 例并文献复习	黄娇娇 黄佩 施晓琦 李纯莎 徐艳朋 冒青 陈艳	434
综 述		
WNT/ β -catenin 信号通路在消化系统肿瘤靶向治疗中的最新研究进展	冯富娟 高春 张久聪	436
CD19 在急性髓系白血病中的研究进展	白会恩 闫理想 林旭 史哲新	441
肝纤维化分子机制的研究进展	吴智煌 沈瑶 冯敏 杨胜辉	445
作者·编者·读者		440

期刊基本参数: CN13-1316/R * 2002 * m * A4 * 112 * zh * P * ¥20.00 * 1 500 * 21 * 2023-04

本期责任编辑: 高明远 英文编辑: 马晓海

CHINESE JOURNAL OF DIFFICULT AND COMPLICATED CASES

Monthly Established in June 2002 Volume 22, Number 4 18 April, 2023

Responsible Institution
National Health Commission of
the People's Republic of China

Sponsor
Chinese Medical Doctor Association

Editing
Editorial Board of Chinese Journal of Difficult
and Complicated Cases

Adviser
Wang Yongyan Zhang Yun Li Chunyan
Zhang Boli Ge Junbo Yu Jinming
Zhang Yingze Liu Liang Wang Qi
Cong Bin Huang Luqi Li Diangui

Honorary Editor-in-Chief
Wu Yiling

Editor-in-Chief
Jia Zhenhua

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
Code No. M6888

Overseas Price
\$ 20.00 per issue; \$ 240.00 a year

CSSN
ISSN 1671-6450 CN 13-1316/R

Copyright 2023 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 editor-
ial board, unless clearly specified.

CONTENTS

Editorial

**Actively prompting healthy aging based on the thought of "prevention of
disease" in traditional Chinese medicine**
..... Li Hongrong, Li Yawen, Lu Xuan, et al 337

Cardiovascular Disease

**Relationship between peripheral blood Furin, sTWEAK, NLR, myocardial
injury markers, and poor prognosis in patients with type H
hypertension and acute myocardial infarction**
..... Liu Hongyan, Du Yujie, You Ranran, et al 343

**Clinical observation on the treatment of senile patients with acute myocardial
infarction and left heart failure with *Qiliqiangxin* Capsule and
levosimendan injection**
..... Liu Yang, Zhang Juan, Hu Ying, et al 350

**Relationship between renin angiotensin system activity and atrial fibrillation
in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism**
..... Sun Duirong, Sun Yufei, Li Jun, et al 356

**Effect of combination of elosumab and conventional statin versus statin alone
on the expression of serum HMGB1, SAA1, and CCL19 in patients
with acute coronary syndrome**
..... Liu Tianjiao, Zhang Xin, Wang Xiaofei, et al 361

**Diagnostic value of plasma YKL-40, CRP, IL-6 in acute coronary artery
injury in children with Kawasaki disease**
..... Min Li, Yuan Shijian, Liu Yahong, et al 367

Cancer Prevention and Treatment

**Expression of KMT2D in patients with prostate cancer and its relationship
with clinicopathological characteristics and prognosis**
..... Li Hongbin, He Baozhong, Hou Lin, et al 373

Expression and clinical significance of FBXL2 and Dkk-1 in colorectal cancer	Li Xiaoning, Li Xiaolong, Song Rui,et al	377
Expression of serum miR-21-5p, miR-377-3p in patients with colorectal cancer and the relationship between Wnt/ β -catenin signal pathway and prognosis	Hu Lihong, Pan Xuefeng, Guan Jiaheng,et al	383
Diagnostic value of cervical liquid-based cytology p16 and its combination with high-risk HPV detection in screening cervical cancer and precancerous lesions	Zhao Fang, Ma Deyong, Wang Tingting,et al	390
Relationship between expression of UEV1A, UBE2N and epithelial mesenchymal transformation in breast cancer and its clinical prognostic value	Wu Xinyan, Lin Xiaolong, Wang Jianbao,et al	395
Original Artical: Clinical Research		
Serum expression of β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 and the application in the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B	Sun Ruiqing, Deng Juan, Li Feng,et al	402
Effect of ketogenic diet combined with high-intensity intermittent training on nonalcoholic fatty liver	Wen Yifei, Zheng Rongjiong, Liu Huaying,et al	408
Changes and clinical significance of plasma miR-15b and VEGF levels in premature infants with bronchopulmonary dysplasia	Zhang Wenwen, Weng Jingwen, Wu Dan,et al	414
Detection and significance of peripheral blood Th17/Treg cells and urinary monocyte chemoattractant protein-1 in patients with systemic lupus erythematosus	Zheng Xuena, Yang Huaqiang, Li Bojun,et al	420
Effect of robot-assisted MIS-TLIF on electromyography and erythrocyte immunity in patients with lumbar spinal stenosis	Li Guangfu, Peng Feng, Wu Meiping,et al	426
Rare Case Report		
Aicardi-Goutières syndrome: two cases and literature review	Jiang Qiong, Zeng Lan, Zhu Hui,et al	432
A case of type II Gricelli syndrome secondary to hemophagocytic syndrome and literature review	Huang Jiaojiao, Huang Pei, Shi Xiaoqi,et al	434
Review		
The latest research progress of WNT/ β -catenin signal pathway in targeted therapy of digestive system tumor	Feng Fujuan, Gao Chun, Zhang Jiucong	436
Research progress of CD19 in acute myeloid leukemia	Bai Huien, Yan Lixiang, Lin Xu,et al	441
Research progress in the molecular mechanism of liver fibrosis	Wu Zhihuang, Shen Yao, Feng Min,et al	445

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 001

述 评

基于中医“治未病”思想 积极推进健康老龄化

李红蓉, 李雅文, 陆璇, 常丽萍, 魏聪

基金项目: 中国工程院咨询研究项目(2022-XY-45); 河北省自然科学基金项目(H2022106065); 河北省中医药管理局科研计划项目(2022216, 2023172)

作者单位: 050035 石家庄, 河北省中西医结合医药研究院(李红蓉、李雅文、陆璇、常丽萍、魏聪); 050035 石家庄, 络病研究与创新中药国家重点实验室(李红蓉); 050091 石家庄, 河北以岭医院国家中医药管理局中医络病学重点学科(李雅文、陆璇); 050035 石家庄, 河北以岭医药研究院国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病)(常丽萍); 050035 石家庄, 河北以岭医药研究院络病重点实验室(魏聪)

通信作者: 李红蓉, E-mail: lihongrong@yiling. cn

【摘 要】 衰老引发的多病失能问题是人口老龄化对经济运行全领域、社会建设各环节、社会文化多方面乃至国家综合实力和国际竞争力均产生深远影响的核心原因。基于中医“治未病”思想, 积极应对人口老龄化需要增强预防观念, 推进健康老龄化, 积极防止老龄人口多病失能问题的出现。将未老先防、已老防衰、已衰防病、已病防失智失能有机结合, 通过采取主动抗衰老措施来延缓甚或阻止老龄人口身体功能的减退, 以实现老龄人口不得病、少得病、晚得病、不得大病、得病后能够很快康复的健康老龄化的目标, 从根本上减轻人口老龄化带来的医疗、保健、养老、居家照护等社会经济压力。

【关键词】 治未病; 抗衰老; 人口老龄化; 预防; 失能

【中图分类号】 R22; R339.3⁺8

【文献标识码】 A

Actively prompting healthy aging based on the thought of “prevention of disease” in traditional Chinese medicine Li Hongrong^{*}, Li Yawen, Lu Xuan, Chang Liping, Wei Cong. ^{*} Hebei Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei Province, Shijiazhuang, 050035, China

Corresponding author: Li Hongrong, E-mail: lihongrong@yiling. cn

Funding program: Consulting and Research Project of Chinese Academy of Engineering (2022-XY-45); Hebei Natural Science Foundation Project (H2022106065); Scientific Research of Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (2022216, 2023172)

【Abstract】 The problem of multiple diseases and disability caused by aging is the core reason for the profound impact of population aging on the whole field of economic operation, all links of social construction, social and cultural aspects, as well as the comprehensive strength and international competitiveness of the country. Based on the "prevention of disease" thought of traditional Chinese medicine, it is necessary to strengthen the concept of prevention to actively respond to the aging of the population, promote healthy aging, and actively prevent the emergence of the problem of disability of the aging population due to multiple diseases. We will organically combine prevention before aging, prevention of aging, prevention of disease after aging, prevention of dementia and disability after aging, and take active anti-aging measures to delay or even prevent the decline of physical functions of the elderly population, so as to achieve the goal of healthy aging of the elderly population without getting sick, less sick, late sick, no serious disease, and can recover quickly after getting sick, and fundamentally reduce the medical, health care, elderly care Social and economic pressures such as home care.

【Key words】 Preventive treatment of disease; Anti-aging; Population aging; Prevention; Disability

我国第七次人口普查的数据显示^[1], 我国 60 岁及以上老年人口有 2.64 亿, 占总人口的 18.7%, 65 岁及以上老年人口约 1.9 亿, 占总人口的 13.5%, 这意味着我国总体上已进入中度老龄化阶段。据测算, 我国

老龄化程度将持续加深, 到 2035 年 60 岁及以上的老年人口将突破 4 亿, 占总人口的比例超过 30%, 进入重度老龄化阶段^[2]。人口老龄化是今后较长一段时期我国的基本国情, 面对人口老龄化加深的严峻形势,

党和国家将积极应对人口老龄化确立为国家战略,强调要推动老龄事业的全面协调可持续发展。应对人口老龄化问题的关键在于改善老龄人口的健康状况,即推进健康老龄化。”“治未病”思想是中医学的特色健康理念,几千年来,其未病先防、既病防变、瘥后防复的思想精髓在保障我国人民健康、促进医疗卫生事业发展方面发挥了重要作用。在积极应对人口老龄化事业过程中,充分融入中医“治未病”思想,对于提高老龄人口的健康水平、提高生活质量、延长健康寿命具有重要意义。本文将基于“治未病”思想探讨如何积极应对人口老龄化。

1 “治未病”的思想精髓在于预防

中医“治未病”思想源于“防患于未然”的预防思想,如《周易》所载:“水在火上,既济,君子以思患而豫防之。”《黄帝内经》首次提出“治未病”一词,曰:“圣人不治已病治未病,不治已乱治未乱”(《素问·四气调神大论》),“上工治未病,不治已病”(《灵枢·逆顺》),并具体指出“治未病”是在病未发之时就予以治疗,即“病虽未发,见赤色者刺之,名曰治未病”(《素问·刺热篇》)。此后,“治未病”思想逐渐发展完善,形成了未病先防、既病防变、瘥后防复的主体思想。

未病先防是指在疾病发生之前,通过采取各种预防性措施增强机体抗病能力以防止疾病的发生,即现代医学所提倡的零级预防、一级预防。如《素问·生气通天论》所言:“夫上古圣人之教下也,皆谓之虚邪贼风,避之有时,恬淡虚无,真气从之,精神内守,病安从来。”既病防变是指在疾病发生之后,采取早期发现、早期诊断、早期治疗、控制危险因素等措施以防止疾病的恶化加重以及并发症的发生,涵盖了现代医学所说的二级预防、三级预防。如《金匮要略》所言:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾。”络病理论指导外感温热病防治所提出的“先证用药、截断病势”的积极干预策略即体现了“既病防变”的思想。瘥后防复是指疾病有所好转或痊愈之后,通过改善生活方式、控制危险因素等方式防止疾病的复发,可归属于一级预防的范畴。《素问·热论》所言“病热少愈,食肉则复,多食则遗,此其禁也”,即是瘥后防复思想的具体应用。总体而言,“治未病”思想在防治疾病、促进康复方面具有重要指导价值。

2 积极应对人口老龄化的关键在预防

人口老龄化对经济运行全领域、社会建设各环节、社会文化多方面乃至国家综合实力和国际竞争力都具有深远影响,原因在于老龄人口具有健康水平下降、体力智力下降、社会适应能力下降、疾病高发多发、失智

失能比例提高、对医疗照护乃至公共服务和社会保障需求增加的特点,而各种原因引起或加剧的衰老则是导致上述情况发生的关键机制。因此防止老龄人口的健康状况下降,减少疾病的发生和恶化、降低失智失能发生率对于实施积极应对人口老龄化具有重要意义。

2.1 未老先防 当前,老龄化社会通用的评价标准是 60 岁或 65 岁及以上人群在总人口中的占比,我国《老年人权益保障法》第 2 条规定老年人是指 60 周岁以上的公民。然而《说文解字》曰:“七十曰老”,即从 70 岁以上才是老年人。此外,英国剑桥大学在 *Nature* 上发表的研究也表明 70 岁是衰老的真正开始^[3]。可见,过早衰老是目前普遍存在的问题。关于过早衰老,从秦汉时期开始就有了相关认识,不仅指出早衰的表现包括“年四十,而阴气自半也,起居衰矣;年五十,体重,耳目不聪明矣;年六十,阴痿,气大衰,九窍不利,下虚上实,涕泣俱出矣”(《素问·阴阳应象大论》),还指出不健康的生活方式及肾精肾气耗损可以导致早衰,即“以酒为浆,以妄为常,醉以入房,以欲竭其精,以耗散其真,不知持满,不时御神,务快其心,逆于生乐,起居无节,故半百而衰也”(《素问·上古天真论》),“肾气盛则寿延,肾气衰则寿夭”(《医学正传》),而且通过正确调理可以防止早衰,如“法于阴阳,和于术数,饮食有节,起居有常,不妄作劳,故能形与神俱,而尽终其天年,度百岁乃去”(《素问·上古天真论》),“能知七损八益,则二者可调,不知用此,则早衰之节也”(《素问·阴阳应象大论》)。

现代研究表明,精神压力和负面情绪可以显著加速衰老,而且压力和衰老加速的关系在情绪调节能力差的人中最为突出^[4-5];久坐也被证实对衰老的关键机制均有影响,久坐人群的细胞年龄比常锻炼人群老 8 岁^[6];吸烟、熬夜、过饱饮食等不良生活方式也被证实具有加速衰老的作用,还会增加多种疾病的发病率^[7-9]。最新研究显示,改善生活方式则具有显著的抗衰老作用。2 449 例受试者参与的临床研究证实^[10],坚持健康饮食、保持认知活动、定期运动锻炼、不吸烟、限制饮酒等健康生活方式不仅可以使 65 岁以上老年人的大脑保持敏锐,将阿尔茨海默病的患病风险降低 60%,还具有延长寿命的作用,其中女性延长了 3.1 年,男性延长了 5.7 年。规律运动可以改善老年人的免疫系统,阻止肌肉含量和力量随着衰老而流失,提高神经肌肉性能,改善功能灵活性^[11-12]。配合昼夜节律变化的饮食限制可以延长衰老小鼠的寿命,并指出 12 h 以上的禁食间隔加上夜间(正常)进食对延长寿命的益处最大^[13]。

基于中医“治未病”思想,对于尚未衰老的人群,积极应对人口老龄化应该进行零级预防和一级预防。通过多种形式的健康教育提升公众对衰老的认知,增强公众的抗衰老意识,主动行动起来,从点滴做起未老先防。比如,通过加强社会保障等方式减轻公众的压力,通过建设体育公园、公益运动场所等方式给公众提供便利的运动条件,通过电视、广播电台、报纸、杂志、短视频、微博等各种传统媒体和新媒体,以及在超市、餐厅、健身房、小区公告栏、公交站等公共场所宣传哪些不良方式可以导致过早衰老,衰老的表现有哪些,如何判断自己是否已经具有衰老的表现,可以采取哪些有效的措施预防衰老。

2.2 已老防衰,已衰防病 “衰”和“老”相关但无必然联系,“衰”指身体功能的衰弱、衰减或衰退,“老”指年龄的老迈。正如古代医家所论,“及其老也,血气既衰”(《古今医统大全》),“平生遇事知谨节,不久劳心疲神,故老而不衰”(《寿世传真》),可见“老”者可“衰”,但“老”者未必“衰”,现在所说的“衰老”是一个偏义词汇,关键在“衰”而不在“老”。“有独尽天寿而无邪僻之病,百年不衰”(《灵枢·本脏》),“春秋皆度百岁,而动作不衰……故能形与神俱,而尽终其天年,度百岁乃去”(《素问·上古天真论》),则明确指出人可以实现健康长寿,尽享天年,而不出现衰、病的表现。而且通过适当的调理还可以实现“身体强健,老者复壮,壮者益治”(《素问·阴阳应象大论》),“耳目聪明,骨节坚强,颜色悦怿,老而不衰,延年久视”(《抱朴子内篇》)。

现代研究也表明,衰老不仅会导致机体整体功能下降和多种组织器官的退行性变化,而且是心血管、神经、内分泌、免疫、运动、消化、皮肤、生殖等多个系统“老年性疾病”的重要驱动因素,最常见的衰老相关疾病包括心血管疾病(如动脉粥样硬化、高血压、冠心病、心肌梗死、慢性心力衰竭等)、脑血管及神经退行性疾病(如脑卒中、阿尔茨海默病、帕金森病等)、代谢性疾病(如糖尿病及其并发症等)、骨骼肌肉系统疾病(如骨质疏松、退行性骨关节炎、肌少症等)、癌症(如泌尿生殖和胃肠道癌症)、免疫系统疾病等^[14]。2017 年全球疾病负担研究(GBD 2017)中指出 293 种疾病中有 92 种(31.4%)被确定为与年龄相关^[15]。当前,我国老龄人口的健康状况十分严峻。《中国心血管健康与疾病报告 2021》指出,我国心血管病患病率处于持续上升阶段,现有心血管病患者 3.3 亿^[16]。《柳叶刀公共卫生》杂志 2020 年发布的数据显示,估测我国 60 岁以上老年人中痴呆患者有 1 507 万^[17]。2018 年

慢性阻塞性肺疾病监测的数据显示^[18],我国 60~69 岁的老年人慢性阻塞性肺疾病患病率达到 21.2%,70 岁以上达到 35.5%。第四次口腔流行病学调查显示^[19],我国 65~74 岁老年人当中,86% 存在牙缺失,全口失牙率达到 4.5%。我国首次骨质疏松症流行病学调查结果显示^[20],我国 50 岁以上人群低骨量率为 46.4%,骨质疏松症患病率为 19.2%,65 岁以上人群骨质疏松症患病率高达 32.0%。“中国老年人肌少症诊疗专家共识(2021)”^[21]指出我国老年人肌少症患病率为 8.9%~38.8%,且随年龄增长患病率显著增加,80 岁及以上可高达 67.1%。国家癌症中心发布的 2016 年中国癌症疾病负担情况显示^[22],我国癌症新发病例和死亡的峰值均在 60~79 岁,60 岁以上的发病率和病死率分别高达 60.66%、73.72%。此外,还有庞大的老龄人口存在老年综合征和精神心理问题。

对于衰老所致的身体功能减退和老年性疾病,除了改善生活方式外,现有研究表明中医中药、干细胞疗法、置换疗法及一些西药制剂等具有不同程度改善作用^[23-30]。补肾精中药八子补肾胶囊具有改善整体衰老、多系统衰老及衰老相关疾病的作用^[31],基础研究结果表明其可以改善衰老模型动物的认知功能,提高其筑巢能力、改善对新物体的识别记忆能力和空间学习记忆能力、提高运动协调能力;抑制动脉粥样硬化形成,改善心肌纤维化并提高心功能;改善骨质疏松,提高骨强度,改善肌肉耐力、抓力和平衡力;提高皮肤胶原纤维和弹力纤维含量,增加真皮层厚度,改善脱毛变白情况;还可以改善衰老模型动物的睾丸生精功能,提高精子数量和活力;临床研究证实其能够改善肾精亏虚患者症状表现,改善阳痿患者性功能,提高运动能力。二仙汤、五子衍宗方、人参、枸杞等中药以及针灸等方法也被证实具有改善衰老所致脏器组织功能减退的作用^[32-36]。此外,间充质干细胞移植有助于提高老年人的 6 min 步行距离,改善老年人身体虚弱的表现^[24]。将年轻小鼠的脑脊液输注给老年小鼠可以改善老年小鼠的记忆能力^[25-26]。通过异体共生使年老小鼠和年轻小鼠的血液“互通互换”,可以显著降低年老个体多个组织的衰老标志物^[27]。 β -烟酰胺单核苷酸(NMN)、雷帕霉素、二甲双胍等制剂也被证实对衰老所致的功能减退或老年性疾病有不同程度的改善作用^[28-30]。

基于中医“治未病”思想,对于已经有衰老表现的人群,积极应对人口老龄化也应当注重二级预防、三级预防。老龄人口可以通过保持良好的生活方式、进行规律的身体锻炼和日常的中医保健以提高身体素质,

改善身体功能,防止衰弱综合征的发生。对于已经出现各系统衰老表现的老龄人群,可以通过服用有效且无不良反应的抗衰老药物或保健食品,改善衰老表现,防止进一步恶化成为老年性疾病。此外,还可以通过老年健康管理中心、社区门诊医院、老年衰弱门诊等专业机构对老龄人口的健康状况或衰老程度进行全面评估,并给予综合调理。

2.3 已病防失智能 失能是个体的身体结构和功能损伤、活动受限和社会参与受限的状态,是内在能力下降和外在环境综合作用的结果,具体体现在日常基本性/工具性生活活动能力、躯体活动能力、情感和认知功能、社会参与、交流能力和适应能力等众多维度,包括视力、听力、语言、饮食、行动、居室卫生和个人卫生、起居、外出购物、会友等任何一种能力障碍或丧失。2019 年国家卫健委宣布我国失能老人超过 4 000 万^[37],预计到 2030 年我国失能老人的规模将达到 10 531 万^[38]。庞大的失能老龄人口导致生活照料和长期护理需求成为刚需且需求量巨大,也对现有的照护体系提出了巨大挑战。一方面,失能老人往往患有多种疾病,其门诊和住院治疗不仅会造成医疗费用的急剧增加,还会耗费巨大的人力成本。另一方面,长期照护机构存在着数量不足、缺乏高水平专业护理人员、照护质量低下及照护费用高的问题,而长期照护机构的普及还存在很大差距。最重要的是,在“未富先老”“未备先老”的总体国情下,家庭照护仍然是失能老人最主要的照护方式,然而也正是因为老龄化程度加深和社会竞争加剧的背景下,对失能老人的长期照护也对家庭造成了巨大的人力、经济和精神压力,而且家庭成员往往缺乏专业的照护知识,反而会加剧失能老人的病情,总之,家庭照护具有高度的脆弱性和不可持续性,“一人失能,全家失衡”已经成了不少家庭面临的难题。此外,还有一部分失能老人属于独居无子女的空巢老人,往往处于有病难医、无人照护的困境,面临着更高的死亡风险。总体而言,失能老人的长期照护成为当下亟待解决的社会问题和潜在风险。

研究表明,年龄是老年人失能的主要危险因素之一,年龄越高则失能风险也随之增大。慢性病是导致老年人失能的关键因素,且患慢性病数量越多,老年人失能率越高。相对于生活能自理的人群,中度以上失能老年人的健康水平显著降低,97% 的人同时患有至少一种以上的慢性病,心脑血管病、癌症、阿尔茨海默病、呼吸系统疾病、帕金森病的患病比例与失能状态具有显著的关联性^[39]。研究显示,具有高致残率的内脏疾病、呼吸系统疾病、心脑血管与退行性疾病、精神与

关节疾病和代谢紊乱疾病等 5 种多病模式因子的得分越高,老年人的失能风险越高^[40]。慢性心力衰竭患者中,28% 的有中度失能,16.7% 的有重度失能^[41]。脑血管病患者因其语言障碍、肢体活动障碍及反应迟钝等而具有较高的失能风险,而且颈动脉粥样硬化病变也会加重其失能的风险。骨质疏松和肌少症造成的骨折、活动能力减弱也是造成老年人失能的重要因素,还有专家将骨质疏松症、肌少症、肥胖和活动能力受限等因素引起的骨折、跌倒等骨骼肌肉系统不良结局定义为失能综合征^[42]。老年髋部骨折患者肌肉质量越差,衰弱越明显,失能程度也越严重。阿尔茨海默病、血管性痴呆等造成的认知障碍通常表现为记忆、学习、定向、理解、判断、计算、语言、视空间功能、分析及解决问题的能力受损,导致患者的日常生活能力、工作能力和社会交往能力明显减退,而且常伴有精神、行为和人格异常,其所造成的失能往往程度较重而且照护难度较大。此外,躯体失能造成的有效社交和躯体活动减少及照护失常等往往会加重其失智失能的程度。吸烟、缺乏运动、体质量过轻或过重、居住环境恶劣等都会增加老年人失能的风险^[43-46]。总体而言,高龄多病是导致并加重老龄人口失能的最主要因素。

对于身患疾病的老年人而言,除了不可改变的年龄因素外,改善老年人的居住环境和生活方式、保持理想体质量、定期监测身体状况、有效治疗基础疾病等措施可以减轻老年人的失能风险。研究显示,保持经常参加体育锻炼、不吸烟酗酒等良好生活方式的老年人具有较低的失能风险和较长的预期完全自理时间^[47]。经常打牌、走亲访友、参加工作等社会活动也可以降低老年人的失能风险^[48]。定期进行体检并接受医疗健康信息的老年人失能发生率也较低,失去基础性日常生活活动能力(BADL)的风险可以降低 54% ~ 81%,失去工具性日常生活活动能力(IADL)的风险可以降低 55% ~ 77%,合并 IADL 和 BADL 失能发生风险下降 59% ~ 89%^[49]。改善居住环境也可以减少跌倒、磕碰等日常损伤的发生并改善老年人的精神状态,从而降低失能的风险^[46]。受教育程度、老年友好型环境及医疗保健可及性的改善与 2011—2020 年期间中国老年人群 3 级失能率下降 41.84% 有关^[38]。

基于中医“治未病”思想,对于已经有衰老表现且患有老年性疾病的人群,积极应对人口老龄化也应当注重三级预防。从老年人自身出发,需要提高健康素养、改善营养状况、维持社交活动、避免绝对静养、保持良好心态、尽可能选择舒适良好的居住环境。从社会保障出发,需要建设老年友善型社区和医疗机构、加强

老年医学科的发展建设、提高专业照护机构的数量和照护水平、加强老年医疗护理人员的培养,构建起衰老状态与失能风险识别评估、基础疾病诊断治疗、身心功能康复护理一体化的老病人员医护体系^[50]。

总体而言,基于中医“治未病”思想,积极应对人口老龄化需要增强预防观念,树立积极老龄观,推进健康老龄化。将零级预防、一级预防、二级预防、三级预防思想充分融入积极应对人口老龄化的国家战略,将未老先防、已老防衰、已衰防病、已病防失智失能有机结合,尤其是要做好未老先防、已老防衰、已衰防病,通过采取主动抗衰老措施来延缓甚或阻止老龄人口身体功能的减退,以实现老龄人口不得病、少得病、晚得病、不得大病、得病后能够很快康复的健康老龄化目标,从根本上减轻人口老龄化带来的医疗、保健、养老、居家照护等社会经济压力。

参考文献

- [1] 国家统计局. 第七次全国人口普查主要数据情况[EB/OL]. (2021-05-11)[2022-03-03]. http://www.stats.gov.cn/tjsj/zxfb/202105/t20210510_1817176.html.
- [2] 国家发展改革委,民政部,国家卫生健康委.“十四五”积极应对人口老龄化工程和托育建设实施方案[EB/OL]. (2021-06-11)[2023-03-03]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-06/25/content_5620868.htm.
- [3] Mitchell E, Spencer Chapman M, Williams N, et al. Clonal dynamics of haematopoiesis across the human lifespan[J]. *Nature*, 2022, 606 (7913): 343-350. DOI: 10. 1038/s41586-022-04786-y.
- [4] Harvanek ZM, Fogelman N, Xu K, et al. Psychological and biological resilience modulates the effects of stress on epigenetic aging[J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11 (1): 601. DOI: 10. 1038/s41398 -021-01735-7.
- [5] Galkin F, Kochetov K, Koldasbayeva D, et al. Psychological factors substantially contribute to biological aging: evidence from the aging rate in Chinese older adults[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14 (18): 7206-7222. DOI: 10. 18632/aging. 204264.
- [6] Shadyab AH, Macera CA, Shaffer RA, et al. Associations of accelerometer-measured and self-reported sedentary time with leukocyte telomere length in older women[J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 185 (3): 172-184. DOI: 10. 1093/aje/kww196.
- [7] Mamoshina P, Kochetov K, Cortese F, et al. Blood biochemistry analysis to detect smoking status and quantify accelerated aging in smokers[J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 142. DOI: 10. 1038/s41598-018-35704-w.
- [8] Chang J, Garva R, Pickard A, et al. Circadian control of the secretory pathway maintains collagen homeostasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22 (1): 74-86. DOI: 10. 1038/s41556-019-0441-z.
- [9] Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study[J]. *Nature*, 2012, 489 (7415): 318-321. DOI: 10. 1038/nature11432.
- [10] Dhana K, Franco OH, Ritz EM, et al. Healthy lifestyle and life expectancy with and without Alzheimer's dementia: population based cohort

- study [J]. *BMJ*, 2022, 377: e068390. DOI: 10. 1136/bmj-2021-068390.
- [11] Pollock RD, O'Brien KA, Daniels LJ, et al. Properties of the vastus lateralis muscle in relation to age and physiological function in master cyclists aged 55-79 years[J]. *Aging Cell*, 2018, 17 (2): e12735. DOI: 10. 1111/ace1. 12735.
- [12] Lavin KM, Roberts BM, Fry CS, et al. The importance of resistance exercise training to combat neuromuscular aging[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2019, 34 (2): 112-122. DOI: 10. 1152/physiol. 00044. 2018.
- [13] Acosta-Rodríguez V, Rijo-Ferreira F, Izumo M, et al. Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice[J]. *Science*, 2022, 376 (6598): 1192-1202. DOI: 10. 1126/science. abk0297.
- [14] Li Z, Zhang ZK, Ren YK, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Biogerontology*, 2021, 22 (2): 165-187. DOI: 10. 1007/s10522-021-09910-5.
- [15] Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, et al. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet Public Health*, 2019, 4 (3): e159-e167. DOI: 10. 1016/S2468-2667 (19)30019-2.
- [16] 《中国心血管健康与疾病报告 2021》编写组.《中国心血管健康与疾病报告 2021》概述[J]. *中国心血管病研究*, 2022, 20 (7): 577-596. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5301. 2022. 07. 001.
- [17] Jia LF, Du YF, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5 (12): e661-e671. DOI: 10. 1016/S2468-2667 (20)30185-7.
- [18] 中国老年医学学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 中国老年慢性阻塞性肺疾病临床诊治实践指南[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43 (2): 100-119. DOI: 10. 3706/cma. j. issn. 1001-0939. 2020. 02. 007.
- [19] 国家卫生计生委员会. 第四次全国口腔健康流行病学调查等情况举行发布会[EB/OL]. (2017-09-19)[2022-12-01]. http://www.gov.cn/xinwen/2017-09/19/content_5226124.htm#1.
- [20] 胡洁玫, 刘晨. 骨质疏松症流行病学概况及相关危险因素[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19 (42): 55-57. DOI: 10. 19613/j. cnki. 1671-3141. 2019. 42. 023.
- [21] 刘娟, 丁清清, 周白瑜, 等. 中国老年人肌少症诊疗专家共识 (2021)[J]. *中华老年医学杂志*, 2021, 40 (8): 943-952. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-9026. 2021. 08. 001.
- [22] Zheng RS, Zhang SW, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *Journal of the National Cancer Center*, 2022, 2 (1): 1-9. DOI: 10. 1016/j. jncc. 2022. 02. 002.
- [23] 马凤君, 颜晓, 潘亚辉, 等. 近十年中医药抗衰老疗法研究概况[J]. *山东中医杂志*, 2020, 39 (4): 407-412. DOI: 10. 16295/j. cnki. 0257-358x. 2020. 04. 023.
- [24] Zhu YQ, Ge JL, Huang C, et al. Application of mesenchymal stem cell therapy for aging frailty: from mechanisms to therapeutics[J]. *Theranostics*, 2021, 11 (12): 5675-5685. DOI: 10. 7150/thno. 46436.

- [25] Iram T, Kern F, Kaur A, et al. Young CSF restores oligodendrogenesis and memory in aged mice via Fgf17[J]. *Nature*, 2022, 605(7910): 509-515. DOI: 10. 1038/s41586-022-04722-0.
- [26] Zawadzki M, Lehtinen MK. Young cerebrospinal fluid improves memory in old mice[J]. *Nature*, 2022, 605(7910): 428-429. DOI: 10. 1038/d41586-022-00860-7.
- [27] Ma S, Wang S, Ye YX, et al. Heterochronic parabiosis induces stem cell revitalization and systemic rejuvenation across aged tissues[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(6): 990-1005. e10. DOI: 10. 1016/j. stem. 2022. 04. 017.
- [28] Nadeeshani H, Li JY, Ying TL, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product - Promises and safety concerns[J]. *J Adv Res*, 2021, 37: 267-278. DOI: 10. 1016/j. jare. 2021. 08. 003.
- [29] Selvarani R, Mohammed S, Richardson A. Effect of rapamycin on aging and age-related diseases-past and future[J]. *Geroscience*, 2021, 43(3): 1135-1158. DOI: 10. 1007/s11357-020- 00274-1.
- [30] Glossmann HH, Lutz OMD. Metformin and Aging: A Review[J]. *Gerontology*, 2019, 65(6): 581-590. DOI: 10. 1159/000502257.
- [31] 李红蓉, 魏聪, 集川原, 等. 八子补肾胶囊的抗衰老研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 239-246. DOI: 10. 13422/j. cnki. syfx. 20220349.
- [32] 石磊. 二仙汤抗衰老性骨质疏松症的药效作用及网络药理学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019. DOI: 10. 27231/d. cnki. gnmyc. 2019. 000368.
- [33] 马娜, 张长城, 陈茜, 等. 基于内质网应激研究五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞凋亡的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(19): 3899-3904. DOI: 10. 19540/j. cnki. cjmm. 20180530. 001.
- [34] 王顺鹏, 韩翰. 人參多糖抗氧化延缓衰老作用研究进展[J]. *沈阳医学院学报*, 2020, 22(1): 87-89. DOI: 10. 16753/j. cnki. 1008-2344. 2020. 01. 021.
- [35] 李春生, 侯荣先. 枸杞子延缓衰老作用的药效学研究概况[J]. *中医杂志*, 2009, 50(8): 751-754. DOI: 10. 3321/j. issn: 1001-1668. 2009. 08. 034.
- [36] 靖媛, 赵碧云, 陈梦羽, 等. 从经络实质假说探讨针灸延缓皮肤衰老的内涵和意义[J]. *福建中医药*, 2022, 53(7): 35-38. DOI: 10. 13260/j. cnki. jfjtm. 012515.
- [37] 国家卫生健康委. 国家卫生健康委员会 2019 年 11 月 1 日专题新闻发布会文字实录[EB/OL]. (2019-11-04) [2022-12-08]. http://wsjkw. gxzf. gov. cn/hdjl_49617/zxft_49622/zxft_49714/t2455954.shtml.
- [38] Gong JQ, Wang GW, Wang YF, et al. Nowcasting and forecasting the care needs of the older population in china: analysis of data from the china health and retirement longitudinal study (CHARLS)[J]. *Lancet Public Health*, 2022, 7(12): e1005-e1013. DOI: 10. 1016/S2468-2667(22) 00203-1.
- [39] 中国保险行业协会, 中国社会科学院人口与劳动经济研究所. 2018-2019 中国长期护理调研报告[R/OL]. (2020-07-06) [2022-12-06]. http://www. iachina. cn/art/2020/7/6/art_22_104560.html.
- [40] 肖文娟, 陈诗琪, 李中英, 等. 中国老年人多病模式与身体活动水平及失能的关系[J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2022, 50(6): 87-94. DOI: 10. 15983/j. cnki. jsnu. 2022218.
- [41] 陈玲, 魏霞霞, 汪凤兰, 等. 我国 60 岁及以上老年人失能情况及相关因素分析[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(7): 1241-1245.
- [42] 徐凌杰, 肖谦, 程雯, 等. 老年人失能综合征[J]. *中华老年医学杂志*, 2015, 34(11): 1262-1264. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-9026. 2015. 11. 030.
- [43] 张小宁, 陈爽. 中国老年人失能情况及影响因素研究[J]. *中国全科医学*, 2019, 22(31): 3841-3844. DOI: 10. 12114/j. issn. 1007-9572. 2019. 00. 508.
- [44] 张丽, 马丽娜, 孙菲, 等. 老年住院患者失能现状及其相关因素的研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2020, 39(7): 840-844. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-9026. 2020. 07. 025.
- [45] 张晗, 王志会, 王丽敏, 等. 中国社区老年居民日常生活活动能力失能状况调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(3): 266-271. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-6450. 2019. 03. 003.
- [46] Chen X, Lee C, Huang H. Neighborhood built environment associated with cognition and dementia risk among older adults: A systematic literature review[J]. *Soc Sci Med*, 2022, 292: 114560. DOI: 10. 1016/j. socscimed. 2021. 114560.
- [47] Artaud F, Dugravot A, Sabia S, et al. Unhealthy behaviours and disability in older adults: three-City Dijon cohort study[J]. *BMJ*, 2013, 347: f4240. DOI: 10. 1136/bmj. f4240.
- [48] Bourassa KJ, Memel M, Woolverton C, et al. Social participation predicts cognitive functioning in aging adults over time: Comparisons with physical health, depression, and physical activity[J]. *Aging Ment Health*, 2017, 21(2): 133-146. DOI: 10. 1080/13607863. 2015. 1081152.
- [49] Chen CM, Su YY, Lan TY, et al. Health-related services use and the onset of functional disability: 10 year follow-up study[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2014, 58(3): 356-363. DOI: 10. 1016/j. archger. 2013. 11. 011.
- [50] 吴以岭, 李红蓉. 发挥中医药抗衰老优势推进健康老龄化事业发展[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(8): 781-783. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 08. 001.

(收稿日期: 2022-12-08)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 002

心血管疾病专题

H 型高血压合并急性心肌梗死患者外周血 Furin、sTWEAK、NLR 与心肌损伤指标和预后不良的关系

刘红艳, 杜玉杰, 尤冉冉, 孟祥慧

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7204278)

作者单位: 102400 北京中医药大学房山医院心血管科

通信作者: 孟祥慧, E-mail: lhysf7781@163.com

【摘要】目的 分析 H 型高血压(HHT)合并急性心肌梗死(AMI)患者外周血弗林蛋白酶(Furin)、可溶性肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子(sTWEAK)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)与心肌损伤指标和预后不良的关系。方法 选取 2019 年 1 月—2021 年 2 月北京中医药大学房山医院心血管科收治的 HHT 合并 AMI 患者 231 例为 HHT + AMI 组,单纯 HHT 患者 77 例为 HHT 组,健康体检者 52 例为健康对照组。比较 3 组受试者外周血 Furin、sTWEAK、NLR 及血清心肌损伤指标[肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)],并分析外周血 Furin、sTWEAK、NLR 与心肌损伤指标的相关性。随访 1 年统计 HHT + AMI 组患者主要不良心血管事件(MACE)发生情况,采用 Logistic 回归分析 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的影响因素,绘制受试者工作特征曲线(ROC)分析三者对 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的预测价值。结果 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平比较,HHT + AMI 组 > HHT 组 > 健康对照组($F/P = 981.029 / <0.001, 1032.486 / <0.001, 326.617 / <0.001$),MACE 亚组高于非 MACE 亚组($t/P = 19.498 / <0.001, 17.909 / <0.001, 2.507 / <0.001$);HHT + AMI 组 CK-MB 水平高于 HHT 组和健康对照组,血清 cTnI、NT-proBNP 水平比较,HHT + AMI 组 > HHT 组 > 健康对照组($F/P = 580.966 / <0.001, 672.830 / <0.001, 463.233 / <0.001$);外周血 Furin、sTWEAK、NLR 与血清 CK-MB、cTnI、NT-proBNP 水平均呈显著正相关(Furin: $r/P = 0.713 / <0.001, 0.604 / <0.001, 0.515 / <0.001$;sTWEAK: $r/P = 0.412 / 0.002, 0.533 / <0.001, 0.502 / <0.001$;NLR: $r/P = 0.513 / <0.001, 0.554 / <0.001, 0.481 / <0.001$);Killip III/IV 级、Gensini 评分高、Furin 高、sTWEAK 高、NLR 高均是导致 HHT 合并 AMI 患者 MACE 发生的独立危险因素[OR(95% CI) = 1.725(1.178 ~ 2.524)、1.571(1.160 ~ 2.128)、2.412(1.527 ~ 3.806)、2.204(1.421 ~ 3.418)、1.784(1.213 ~ 2.624)]。外周血 Furin、sTWEAK、NLR 及三者联合检测预测 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的曲线下面积(AUC)分别为 0.740、0.715、0.693、0.841,三指标联合预测效能优于各指标单独检测($Z/P = 2.038 / 0.042, 2.459 / 0.014, 4.037 / <0.001$)。结论 Furin、sTWEAK、NLR 在 HHT 合并 AMI 患者外周血中均异常升高,且与心肌损伤、预后不良关系密切,三者联合检测可作为预测 HHT 合并 AMI 患者预后不良的参考依据。

【关键词】 H 型高血压;心肌梗死,急性;弗林蛋白酶;可溶性肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子;中性粒细胞/淋巴细胞比值;心肌损伤指标;预后

【中图分类号】 R542.2+2

【文献标识码】 A

Relationship between peripheral blood Furin, sTWEAK, NLR, myocardial injury markers, and poor prognosis in patients with type H hypertension and acute myocardial infarction Liu Hongyan, Du Yujie, You Ranran, Meng Xianghui. Department of Cardiovascular, Fangshan Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102400, China

Corresponding author: Meng Xianghui, E-mail: lhysf7781@163.com

Funding program: Natural Science Foundation of Beijing(7204278)

【Abstract】 Objective To analyze the relationship between peripheral blood furin (Furin), soluble tumor necrosis factor like weak apoptotic inducer (sTWEAK), neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), myocardial injury indicators, and poor prognosis in patients with type H hypertension (HHT) and acute myocardial infarction (AMI). Methods Two hundred and thirty-one patients with HHT and AMI treated in the Cardiovascular Department of Fangshan Hospital, Beijing University of Chinese Medicine from January 2019 to February 2021 were selected as the HHT + AMI group, 77 patients with HHT only

were selected as the HHT group, and 52 healthy examinees from the hospital were selected as the healthy control group. The peripheral blood levels of Furin, sTWEAK, NLR, and serum myocardial injury indicators [creatin kinase isoenzyme (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)] were compared among the three groups, and the correlation between peripheral blood levels of Furin, sTWEAK, NLR, and myocardial injury indicators was analyzed. The main adverse cardiovascular events (MACE) in the HHT + AMI group were recorded during a 1-year follow-up, and logistic regression was used to analyze the factors influencing the occurrence of MACE in HHT + AMI patients. The receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted to analyze the predictive value of the three factors for MACE in HHT + AMI patients. **Results** Comparison of peripheral blood Furin, sTWEAK, and NLR levels in HHT + AMI group > HHT group > healthy control group ($F/P=981.029/ <0.001$, $1\ 032.486/ <0.001$, $326.617/ <0.001$), and MACE subgroup was higher than non MACE subgroup ($t/P=19.498/ <0.001$, $17.909/ <0.001$, $2.507/ <0.001$); The levels of CK-MB in HHT + AMI group were higher than those in HHT group and healthy control group, and the levels of serum cTnI and NT-proBNP in HHT + AMI group were higher than those in HHT group and healthy control group ($F/P=580.966/ <0.001$, $672.830/ <0.001$, $463.233/ <0.001$); Peripheral blood Furin, sTWEAK, and NLR were significantly positively correlated with serum CK-MB, cTnI, and NT-proBNP (Furin: $r/P=0.713/ <0.001$, $0.604/ <0.001$, $0.515/ <0.001$; sTWEAK: $r/P=0.412/0.002$, $0.533/ <0.001$, $0.502/ <0.001$; NLR: $r/P=0.513/ <0.001$, $0.554/ <0.001$, $0.481/ <0.001$); Killip III/IV, high Gensini score, high Furin, high sTWEAK, and high NLR are independent risk factors for MACE in patients with HHT and AMI [$OR(95\% CI)=1.725$ (1.178 to 2.524), 1.571 (1.160 to 2.128), 2.412 (1.527 to 3.806), 2.204 (1.421 to 3.418), 1.784 (1.213 to 2.624)]. The area under the curve (AUC) of peripheral blood Furin, sTWEAK, NLR, and their combined detection in predicting MACE in patients with HHT and AMI were 0.740, 0.715, 0.693, and 0.841, respectively. The combined prediction efficacy of the three indicators was better than that of each indicator alone ($Z/P=2.038/0.042$, $2.459/0.014$, $4.037/ <0.001$). **Conclusion** Furin, sTWEAK, and NLR are abnormally elevated in the peripheral blood of patients with HHT and AMI, and are closely related to myocardial injury and poor prognosis. The combined detection of the three can be used as a reference basis for predicting poor prognosis in patients with HHT and AMI.

【Key words】 H-type hypertension; Myocardial infarction,acute; Furin; Soluble tumor necrosis factor like weak apoptosis inducing factor; Neutrophil/lymphocyte ratio; Myocardial injury index; Prognosis

高同型半胱氨酸 (Hcy) 对冠状动脉、外周微血管均存在不利影响, H 型高血压 (H-type hypertension, HHT) 患者急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发病风险增加^[1-4]。炎症反应与动脉粥样硬化 (AS) 作为 AMI 发生和发展的重要病理机制已被证实^[5]。弗林蛋白酶 (Furin) 是广泛表达于多种细胞中的内切蛋白酶, 研究显示, 抑制 Furin 表达可减少小鼠冠状动脉血管重塑及 AS 进展^[6], 故推测 Furin 可能参与冠心病的发生和发展。可溶性肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子 (soluble tumor necrosis factor like weak apoptosis inducing factor, sTWEAK) 是调控炎症反应的关键因子, 通过与不同受体结合参与调控心血管疾病进展^[7]。研究显示, sTWEAK 水平增加与慢性肾脏病患者冠状动脉粥样硬化严重程度有关^[8]; 也能够增加系统性红斑狼疮患者心血管事件风险^[9]。中性粒细胞/淋巴细胞比值 (neutrophil/lymphocyte ratio, NLR) 可反映机体炎症反应程度, 有研究证实, NLR 对 AMI 预后 MACE 的发生有较好的预测价值^[10]。现分析外周血 Furin、sTWEAK、NLR 在 HHT 合并 AMI 患者中的表达变化及其与心肌损伤、预后不良的关系, 为早期合理干

预提供参考, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2019 年 1 月—2021 年 2 月北京中医药大学房山医院心血管科收治的 HHT 合并 AMI 患者 231 例为 HHT + AMI 组, 单纯 HHT 患者 77 例为 HHT 组, 医院健康体检者 52 例为健康对照组。HHT + AMI 组男 123 例, 女 108 例, 年龄 47 ~ 79 (65.47 ± 9.37) 岁; 体质指数 (BMI) (23.17 ± 2.37) kg/m^2 ; 吸烟史 106 例; 冠心病家族史 51 例; 合并糖尿病 95 例; 冠心病病程 (4.84 ± 1.10) 年, HHT 病程 (9.12 ± 2.94) 年; 治疗前 Killip 分级: I / II 级 139 例, III / IV 级 92 例; AMI 发作至医疗干预时间 (5.50 ± 1.75) h。HHT 组男 40 例, 女 37 例, 年龄 46 ~ 79 (65.04 ± 9.26) 岁; BMI (22.91 ± 2.65) kg/m^2 ; 吸烟史 29 例; 冠心病家族史 14 例; 合并糖尿病 24 例; HHT 病程 (8.51 ± 2.70) 年。健康对照组男 27 例, 女 25 例, 年龄 46 ~ 79 (65.21 ± 10.18) 岁; BMI (22.57 ± 2.84) kg/m^2 ; 吸烟史 19 例; 无基础疾病 (高血压、糖尿病等)。3 组性别、年龄、BMI、吸烟比例等比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究获得医院伦理委员会批

准(BZYFS-201810147),受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①HHT 患者符合“H 型高血压诊断与治疗专家共识”^[11]中相关诊断标准:收缩压(SBP)≥140 mmHg,舒张压(DBP)≥90 mmHg,血清 Hcy≥10 μmol/L。AMI 患者符合“急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南”^[12]中的相关标准:冠心病病史,心电图和/或血清心肌酶异常改变,包括 ST 段抬高型心肌梗死(STEMI)与非 ST 段抬高型心肌梗死(NSTEMI),发病至首次医疗接触时间<24 h。HHT 合并 AMI 患者同时符合 HHT 与 AMI 诊断标准。②AMI 首次发作,并于 2 h 内入院。③6 个月内未接受心脏相关手术者。(2)排除标准:①合并其他类型心脏疾病,如瓣膜病、心肌病等;②严重肝、肾、甲状腺功能异常者;③近期脑血管意外发作者;④伴全身感染、血液系统疾病者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 外周血 Furin、sTWEAK 及 NLR 水平检测:采集所有受试者入组后肘静脉血 4 ml 2 份,一份离心留取血清,按照 Furin、sTWEAK 酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒说明书步骤操作,反应终止后即刻在酶标仪上检测 450 nm 波长处光密度(A)值,根据试剂盒提供的标准品制作标准曲线,通过标准曲线计算 Furin、sTWEAK 浓度。Furin ELISA 试剂盒购自北京诺为生物技术有限公司;sTWEAK ELISA 试剂盒购自上海润裕生物科技有限公司。另一份血样采用血常规分析仪(迈瑞 Mindray,型号 BC-5120)进行血常规检测,记录中性粒细胞计数与淋巴细胞计数,计算 NLR = 中性粒细胞计数/淋巴细胞计数。

1.3.2 血清 CK-MB、cTnI 及 NT-proBNP 水平检测:上述血清采用免疫抑制法(美国 Beckman 公司生产的 DX-800 型全自动生化分析仪及配套试剂)检测肌酸激酶同工酶(CK-MB,参考范围<24 IU/L);采用免疫荧光干式定量法(韩国 Boditech MED Inc 公司生产的 iCHROMA Reader 免疫荧光分析仪),以电化学发光法(美国罗氏生产的 Cobas e601 全自动电化学发光仪)及其配套试剂检测心肌肌钙蛋白 I(cTnI,参考范围<0.3 μg/L)、N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP,参考范围<300 ng/L)。

1.3.3 随访情况:HHT 合并 AMI 患者均依据专家共识或指南给予规范化治疗^[13-14],并随访 1 年,随访截止时间为患者死亡或 2022 年 2 月,统计 1 年期间主要不良心血管事件(MACE),包括心力衰竭、再发 AMI 及心源性休克、死亡等发生情况。将发生 MACE 的患

者纳入 MACE 亚组,其余纳入非 MACE 亚组。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件处理数据。不符合正态分布的计量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,采用 Kruskal-Wallis 非参数秩和检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 LSD- t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较行 χ^2 检验;采用 Pearson 相关性分析外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平与心肌损伤指标的相关性;采用 Logistic 回归分析影响 HHT 合并 AMI 发生 MACE 的危险因素;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析外周血 Furin、sTWEAK、NLR 对 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平比较 外周血 Furin、sTWEAK 及 NLR 水平比较,HHT + AMI 组>HHT 组>健康对照组(P 均<0.01),见表 1。

表 1 HHT + AMI 组、HHT 组及健康对照组外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of peripheral blood Furin, sTWEAK, and NLR levels in HHT + AMI group, HHT group, and healthy control group

组 别	例数	Furin (ng/L)	sTWEAK (ng/L)	NLR
健康对照组	52	52.11 ± 10.35	620.19 ± 104.85	2.14 ± 0.85
HHT 组	95	101.36 ± 32.19	817.25 ± 143.07	3.26 ± 1.13
HHT + AMI 组	231	285.02 ± 51.37	1 462.73 ± 162.81	8.18 ± 2.40
F 值		981.029	1032.486	326.617
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Furin. 弗林蛋白酶;sTWEAK. 可溶性肿瘤坏死因子样凋亡弱诱导因子;NLR. 中性粒细胞/淋巴细胞比值。

2.2 3 组血清心肌损伤指标比较 HHT + AMI 组 CK-MB 水平高于 HHT 组和健康对照组($P < 0.05$),但 HHT 组与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);血清 cTnI、NT-proBNP 水平比较,HHT + AMI 组>HHT 组>健康对照组(P 均<0.01)。见表 2。

2.3 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平与血清心肌损伤指标的相关性 Pearson 相关性分析显示,外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平与血清 CK-MB、cTnI、NT-proBNP 均呈显著正相关($P < 0.01$),见表 3。

2.4 非 MACE 亚组与 MACE 亚组临床资料比较 随访 1 年,HHT + AMI 组患者 MACE 发生率为 21.21% (49/231)。49 例 MACE 患者中心力衰竭 8 例(3.46%),再发 AMI 39 例(16.88%),心源性死亡 2 例(0.87%)。MACE 亚组患者年龄、Gensini 评分、SCr、UA、hs-CRP、

表 2 HHT + AMI 组、HHT 组及健康对照组血清心肌损伤指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of Serum Myocardial Injury Indexes in the HHT + AMI Group, HHT Group, and Health Control Group

组 别	例数	CK-MB (IU/L)	cTnI ($\mu\text{g/L}$)	NT-proBNP (ng/L) *
健康对照组	52	9.25 $\pm$ 2.34	0.03 $\pm$ 0.01	71.4 (23.9, 131.5)
HHT 组	95	10.34 $\pm$ 3.65	0.06 $\pm$ 0.03 ^a	114.2 (45.3, 208.4) ^a
HHT + AMI 组	231	28.56 $\pm$ 6.10 ^a	0.90 $\pm$ 0.28 ^{ab}	762.1 (263.2, 2 354.2) ^{ab}
F/H _c 值		580.966	672.830	463.233
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: * 为 $M(Q_1, Q_3)$ 。与健康对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HHT 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

Hcy、CK-MB、cTnI、NT-proBNP、Furin、sTWEAK、NLR 水平及 Killip III/IV 级占比均高于非 MACE 亚组, 而 LVEF 低于非 MACE 亚组 (P 均 < 0.05); 2 组在性别、BMI、吸烟史、收缩压、舒张压、合并糖尿病、前壁心肌梗死、罪犯血管数 ≥ 2 条、急诊 PCI、HDL-C、LDL-C、

表 3 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平与血清心肌损伤指标的相关性

Tab. 3 Correlation between the levels of Furin, sTWEAK, and NLR in peripheral blood and serum myocardial injury indicators

项 目	Furin		sTWEAK		NLR	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
CK-MB	0.713	<0.001	0.412	0.002	0.513	<0.001
cTnI	0.604	<0.001	0.533	<0.001	0.554	<0.001
NT-proBNP	0.515	<0.001	0.502	<0.001	0.481	<0.001

ALT、AST、WBC 方面比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 Logistic 回归分析 HHT 合并 AMI 患者 MACE 发生的危险因素 以 HHT 合并 AMI 患者是否发生 MACE 为因变量, 将上述结果中 $P < 0.05$ 项目为自变量, 进行 Logistic 回归分析, 结果显示, Killip III/IV 级、Gensini 评分高、Furin 高、sTWEAK 高、NLR 高均是导致 HHT 合并 AMI 患者 MACE 发生的独立危险因素

表 4 非 MACE 亚组与 MACE 亚组临床资料比较

Tab. 4 Comparison of clinical data between non MACE subgroups and MACE subgroups

项 目	非 MACE 亚组 ($n = 182$)	MACE 亚组 ($n = 49$)	χ^2/U_c 值	<i>P</i> 值
男 [例 (%)]	95 (52.20)	28 (57.14)	0.379	0.538
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	65.01 $\pm$ 9.58	67.20 $\pm$ 9.14	2.451	0.015
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	23.15 $\pm$ 2.27	23.26 $\pm$ 2.42	0.297	0.767
吸烟史 [例 (%)]	81 (44.51)	25 (51.02)	0.660	0.417
收缩压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	147.65 $\pm$ 15.42	149.70 $\pm$ 13.07	0.852	0.395
舒张压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	95.64 $\pm$ 9.25	98.25 $\pm$ 10.11	1.718	0.087
LVEF ($\bar{x} \pm s$, %)	57.13 $\pm$ 9.06	52.69 $\pm$ 8.42	3.089	0.002
合并糖尿病 [例 (%)]	72 (39.56)	23 (46.94)	0.868	0.352
Gensini 评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)	55.30 $\pm$ 16.22	72.50 $\pm$ 15.16	6.678	<0.001
Killip III/IV 级 [例 (%)]	62 (34.07)	30 (61.22)	11.882	0.001
前壁心肌梗死 [例 (%)]	86 (47.25)	26 (53.06)	0.521	0.470
罪犯血管数 ≥ 2 条 [例 (%)]	109 (59.89)	34 (69.39)	1.447	0.224
接受急诊 PCI [例 (%)]	112 (61.54)	29 (59.18)	0.090	0.764
HDL-C ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	1.17 $\pm$ 0.47	1.05 $\pm$ 0.41	1.628	0.105
LDL-C ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	2.82 $\pm$ 0.91	3.11 $\pm$ 0.95	1.962	0.051
ALT (U/L) *	32.4 (21.8, 58.9)	34.1 (22.4, 59.8)	1.141	0.254
AST (U/L) *	21.3 (18.7, 46.2)	22.6 (19.1, 45.9)	1.353	0.176
SCr ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)	78.64 $\pm$ 9.13	82.51 $\pm$ 8.25	2.686	0.008
UA ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)	305.19 $\pm$ 71.38	371.50 $\pm$ 69.42	5.805	<0.001
WBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/\text{L}$)	9.48 $\pm$ 2.34	9.83 $\pm$ 2.20	0.941	0.348
hs-CRP ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	54.39 $\pm$ 23.20	65.34 $\pm$ 22.35	2.955	0.003
Hcy ($\mu\text{mol/L}$) *	12.2 (10.3, 17.9)	15.8 (12.3, 23.2)	4.341	<0.001
CK-MB ($\bar{x} \pm s$, IU/L)	27.33 $\pm$ 5.78	33.13 $\pm$ 6.14	6.153	<0.001
cTnI ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)	0.85 $\pm$ 0.24	1.09 $\pm$ 0.31	5.029	<0.001
NT-proBNP (ng/L) *	552.6 (283.4, 2 112.7)	784.3 (291.5, 2 544.1)	4.147	<0.001
Furin ($\bar{x} \pm s$, ng/L)	257.11 $\pm$ 34.95	388.69 $\pm$ 43.62	19.498	<0.001
sTWEAK ($\bar{x} \pm s$, ng/L)	1 352.60 $\pm$ 182.34	1 871.78 $\pm$ 171.50	17.909	<0.001
NLR ($\bar{x} \pm s$)	7.94 $\pm$ 2.16	9.07 $\pm$ 2.95	2.507	0.015

注: * 为 $M(Q_1, Q_3)$ 。Furin. 弗林蛋白酶; sTWEAK. 可溶性肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子; NLR. 中性粒细胞/淋巴细胞比值。

($P<0.01$),见表 5。

2.6 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 预测 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的价值 绘制 ROC 曲线结果显示,外周血 Furin、sTWEAK、NLR 及三者联合检测预测 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的曲线下面积(AUC)分别为 0.740、0.715、0.693、0.841,三者联合检测诊断效能高于单项检测($Z/P=2.038/0.042$ 、 $2.459/0.014$ 、 $4.037/<0.001$),见表 6、图 1。

表 6 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 预测 HHT 合并 AMI 患者发生 MACE 的价值比较

Tab. 6 Comparison of the Value of Peripheral Blood Furin, sTWEAK, and NLR in Predicting MACE in Patients with HHT Complicated with AMI

指 标	Cut-off 值	AUC(95% CI)	敏感度	特异度	约登指数
Furin	310 ng/L	0.740(0.477~0.985)	0.714	0.731	0.445
sTWEAK	1 580 ng/L	0.715(0.516~0.911)	0.714	0.720	0.434
NLR	9	0.693(0.440~0.947)	0.653	0.736	0.389
联合检测		0.841(0.695~0.980)	0.837	0.830	0.667

3 讨 论

AMI 发病机制十分复杂,其中 AS 是 AMI 病变基础,炎性反应与 AMI 发生和发展息息相关^[15]。研究显示,炎性级联反应可导致心肌损害加重,梗死灶面积增大,同时还参与 AS 形成过程,过度炎性反应可诱发恶性心律失常、心室重构甚至死亡等严重后果^[16]。NLR 作为炎性标志物已被广泛用于冠心病、感染性疾病等病情程度及预后的判断^[17],但 NLR 缺乏特异性,寻找能够反映 HHT 合并 AMI 病情发展的特异性血清

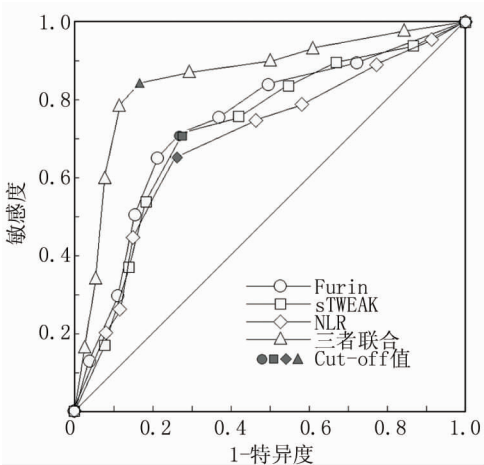


图 1 外周血 Furin、sTWEAK、NLR 检测对 HHT 合并 AMI 患者 MACE 发生的预测价值

Fig. 1 Predictive Value of Peripheral Blood Furin, sTWEAK, and NLR Tests for MACE in Patients with HHT and AMI

标志物仍是临床研究的重点。sTWEAK 是 TNF 家族重要成员之一,参与 AS 进展,有研究显示,sTWEAK 一方面能与成纤维细胞生长因子诱导蛋白 14 结合,诱导内皮细胞分泌促炎因子及趋化因子,另一方面与 AS 中的清道夫受体 CD163 结合,影响血浆中游离 CD163 的蛋白复合物摄取及清除能力^[18]。Furin 与心脏发育及心血管疾病发生发展的关系已有报道^[19]。近期研究表明,Furin 可通过调控下游底物,如脑钠肽(BNP)、血管紧张素 II 等,能够直接或间接参与血压维持,在高血压疾病中同样发挥重要调控作用^[20]。Furin、sTWEAK、NLR 通过影响 AS、炎性反应过程参与 AMI、

表 5 Logistic 回归分析 HHT 合并 AMI 患者 MACE 发生的危险因素

指 标	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
常数	-0.136	0.057	5.653	0.017	-	-
年龄 ≥ 66 岁	0.221	0.371	0.355	0.420	1.247	0.754~1.623
Killip III/IV 级	0.545	0.194	7.863	0.005	1.725	1.178~2.524
Gensini 评分 ≥ 60 分	0.452	0.155	8.537	0.003	1.571	1.160~2.128
SCr ≥ 80 $\mu\text{mol/L}$	0.134	0.251	0.285	0.449	1.143	0.632~1.539
UA ≥ 340 $\mu\text{mol/L}$	0.817	0.549	2.215	0.089	2.264	0.835~3.147
hs-CRP ≥ 60 mg/L	0.015	0.032	0.220	0.507	1.015	0.524~1.379
Hcy ≥ 13.5 $\mu\text{mol/L}$	0.001	0.017	0.003	0.912	1.001	0.600~1.521
CK-MB ≥ 30 IU/L	0.124	0.135	0.844	0.254	1.132	0.845~2.304
cTnI ≥ 1 $\mu\text{g/L}$	0.100	0.229	0.191	0.873	1.105	0.889~1.942
NT-proBNP ≥ 650 ng/L	0.429	0.395	1.180	0.102	1.536	0.950~2.378
Furin 高	0.880	0.233	14.274	<0.001	2.412	1.527~3.806
sTWEAK 高	0.790	0.224	12.445	<0.001	2.204	1.421~3.418
NLR 高	0.579	0.197	8.665	0.003	1.784	1.213~2.624
LVEF $\geq 55\%$	-0.223	0.421	0.281	0.814	0.800	0.155~1.035

高血压的发生和发展,我国人群中多数伴有高 Hcy 血症^[21],因此本研究旨在分析三者对 HHT 合并 AMI 心肌损伤程度及预后的影响,为临床合理干预提供依据。

有研究表明^[22],Furin 基因突变可能增加原发性高血压发病风险,Furin 是肾素原受体(PRR)加工的重要蛋白酶,Furin 突变导致酶失活,PRR 不能正常脱落成为可溶性肾素前体受体;此外有研究指出^[23],Furin 可通过裂解上皮钠通道蛋白维持远端肾单位 Na^+ 、 K^+ 重吸收稳态及血压,这可能是 HHT 合并 AMI 患者较单纯 AMI 患者表现出更高水平 Furin 的原因之一。Yamasaki 等^[24]发现 Furin 在心肌、血管平滑肌及内皮细胞中高表达,基因突变病例的心肌组织中 Furin 高于野生病例,提示 Furin 异常高表达可能与心肌损伤程度有关,但具体机制尚不明确。有研究表明^[25],sTWEAK 与腹膜透析患者颈动脉内膜中层厚度呈负相关,提示 sTWEAK 通过影响机体微炎性状态参与颈动脉粥样硬化病变。动物实验研究发现^[26],AMI 模型小鼠血清 sTWEAK 水平升高、左心室功能降低,抑制 sTWEAK 表达后左心室功能改善,小鼠存活率提高,说明 sTWEAK 与心肌损伤关系密切。NLR 是一种全身性炎症标志物,陈铀等^[27]研究指出,NLR 可作为预测新型冠状病毒重症肺炎患者心肌损伤的独立预测因子;殷云杰等^[28]在心绞痛择期 PCI 围术期患者中获得相似结论,说明 NLR 与心肌损伤关系密切。由上述研究可知,Furin、sTWEAK、NLR 与 HHT 合并 AMI 患者机体 AS、炎性反应过程关系密切,且参与心肌损伤过程,本研究 Pearson 结果也证实了三指标水平与心肌损伤指标密切相关。

冠状动脉病变程度、心功能分级是导致 MACE 发生的传统独立危险因素,外周血 Furin、sTWEAK、NLR 与 MACE 同样密切相关。Wang 等^[29]分析了 1 312 例 AMI 患者发现,高水平 Furin 患者的 2 年 MACE 风险、全因死亡风险均增加。Liu 等^[30]的研究显示,高水平 Furin 的 AMI 患者平均 cTnT 水平增加,且与非致死性心肌梗死有关。说明高水平 Furin 与心肌损伤有关,且能增加 MACE 发生风险,这与本研究结果相符。CD163 是 sTWEAK 主要受体之一,Mrak 等^[31]在外周动脉疾病(间歇性跛行)中发现,sCD163 可作为其病情程度的标志物,并认为 sTWEAK 可作为其心血管死亡与全因死亡的独立预测因子。说明 sTWEAK 可通过与其受体 CD163 作用,参与调节动脉血管损伤,进而影响疾病进展。Chung 等^[32]研究显示,NLR 可作为预测冠状动脉支架植入后半年内再接受非心脏手术治疗的患者 MACE 事件的独立预测因子。上述研究可

以说明,外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平升高与 MACE 事件关系密切,本研究也证实了这一结论。本研究进一步行 ROC 曲线分析发现,外周血 Furin、sTWEAK、NLR 单项及联合检测对 MACE 的发生有较高的预测价值,提示临床中可联合检测三指标对 AMI 患者的预后进行综合评估,选择合理干预方案以降低 MACE 发生风险。

综上所述,Furin、sTWEAK、NLR 在 HHT 合并 AMI 患者外周血中均异常升高,且与心肌损伤、预后不良关系密切,三者联合检测可作为预测 HHT 合并 AMI 患者预后不良的参考依据。提示监测 HHT 合并 AMI 患者外周血 Furin、sTWEAK、NLR 水平可为心肌损伤程度和预后的评估提供新的临床依据,同时为 MACE 的发生进行有效评估,以选择合理干预方案改善患者预后。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘红艳:设计研究方案,研究流程,论文撰写;杜玉杰、尤冉冉:资料搜集整理,分析试验数据,进行统计学分析;孟祥慧:研究构思,论文审核,论文修改

参考文献

- [1] Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10065): 197-210. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30677-8.
- [2] Ahmad A, Corban MT, Toya T, et al. Coronary microvascular endothelial dysfunction in patients with angina and nonobstructive coronary artery disease is associated with elevated serum homocysteine levels [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9 (19): e017746. DOI: 10.1161/JAHA.120.017746.
- [3] Toya T, Sara JD, Lerman B, et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with impaired peripheral microvascular vasomotor response [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2020, 28: 100515. DOI: 10.1016/j.ijcha.2020.100515.
- [4] Wang L, Niu H, Zhang J. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury through stimulating ROS production and the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20 (2): 938-944. DOI: 10.3892/etm.2020.8735.
- [5] Metwalli O, Hashem E, Ajabnoor MA Sr, et al. Study of some inflammatory mediators in the serum of patients with atherosclerosis and acute myocardial infarction [J]. *Cureus*, 2021, 13 (10): e18450. DOI: 10.7759/cureus.18450.
- [6] Yakala GK, Cabrera-Fuentes HA, Crespo-Avilan GE, et al. FURIN inhibition reduces vascular remodeling and atherosclerotic lesion progression in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39 (3): 387-401. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311903.
- [7] 杨俊, 陈昭喆, 王冠. 急性 ST 段抬高型心肌梗死患者血清可溶性肿瘤坏死因子样凋亡诱导因子对急诊介入术后院内心血管不良事件的预测价值 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28 (4): 339-

343. DOI:10.3969/j. issn. 1007-3949. 2020. 04. 014.
- Yang J, Chen ZZ, Wang G. The predictive value of serum soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis for cardiovascular adverse events after emergency intervention in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28 (4) : 339-343. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3949. 2020. 04. 014.
- [8] 陈珂, 聂振禹, 包蓓艳. 慢性肾脏病患者动脉粥样硬化相关生物标志物研究进展[J]. 浙江医学, 2020, 42 (23) : 2591-2593, 2598. DOI: 10. 12056/j. issn. 1006-2785. 2020. 42. 23. 2020-2945.
- Chen K, Nie ZY, Bao BY. Advances in biomarkers related to atherosclerosis in patients with chronic kidney disease[J]. Zhejiang Medicine Journal, 2020, 42 (23) : 2591-2593, 2598. DOI: 10. 12056/j. issn. 1006-2785. 2020. 42. 23. 2020-2945.
- [9] Skaggs BJ, Grossman J, Sahakian L, et al. A panel of biomarkers associates with increased risk for cardiovascular events in women with systemic lupus erythematosus [J]. ACR Open Rheumatol, 2021, 3 (4) : 209-220. DOI: 10. 1002/acr2. 11223.
- [10] Chen B, Yuan L, Chen X, et al. Correlations and prognostic roles of the nutritional status and neutrophil-to-lymphocyte ratio in elderly patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention[J]. Int Heart J, 2020, 61 (6) : 1114-1120. DOI: 10. 1536/ihj. 20-138.
- [11] 李建平, 卢新政, 霍勇, 等. H 型高血压诊断与治疗专家共识[J]. 中国实用内科杂志, 2016, 36 (4) : 295-299. DOI: 10. 7504/nk2016030205.
- Li JP, Lu XZ, Huo Y, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of H type hypertension[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2016, 36 (4) : 295-299. DOI: 10. 7504/nk2016030205.
- [12] 中国医师协会急诊医师分会, 中华医学会心血管病学分会, 中华医学会检验医学分会. 急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25 (4) : 397-404. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2016. 04. 002.
- Emergency Physicians Branch of Chinese Medical Doctor Association, Cardiovascular Branch of Chinese Medical Association, Laboratory Medicine Branch of Chinese Medical Association. Emergency rapid diagnosis and treatment of guidelines acute coronary syndrome Em [J]. Chin J emerg med, 2016, 25 (4) : 397-404. DOI: 10. 3760/cma. j. i SSN. 1671-0282. 2016. 04. 002.
- [13] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease [J]. Am J Cardiol, 1983, 51 (3) : 606. DOI: 10. 1016/s0002-9149(83)80105-2.
- [14] 陈冬生, 栾献亭, 杨进刚, 等. 中国急性心肌梗死不同 Killip 分级患者的临床特征、治疗和预后情况分析 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31 (9) : 849-853. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3614. 2016. 09. 005.
- Chen DS, Luan XT, Yang JG, et al. Analysis of clinical features, treatment and prognosis in acute myocardial infarction patients with different Killip grades in China [J]. Chinese Circulation Journal, 2016, 31 (9) : 849-853. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3614. 2016. 09. 005.
- [15] 于海荣, 王国宏, 董丹丹, 等. 替格瑞洛与氯吡格雷对急性心肌梗死患者介入治疗后的心功能和炎症反应的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19 (2) : 266-269, 299. DOI: 10. 13241/j. cnki. pmb. 2019. 02. 014.
- Yu HR, Wang GH, Dong DD, et al. Effects of the treatment of cardiac function and inflammatory response in patients with acute myocardial infarction after interventional therapy with the combination of ticagrelor and clopidogrel [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2019, 19 (2) : 266-269, 299. DOI: 10. 13241/j. cnki. pmb. 2019. 02. 014.
- [16] Ministrini S, Carbone F, Montecucco F. Updating concepts on atherosclerotic inflammation: From pathophysiology to treatment [J]. Eur J Clin Invest, 2021, 51 (5) : e13467. DOI: 10. 1111/eci. 13467.
- [17] Zahorec R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives [J]. Bratisl Lek Listy, 2021, 122 (7) : 474-488. DOI: 10. 4149/BLL_2021_078.
- [18] 洪长江, 李全亮, 张园. TWEAK 及其受体在心血管疾病中的作用研究进展 [J]. 军事医学, 2016, 40 (2) : 158-161. DOI: 10. 7644/j. issn. 1674-9960. 2016. 02. 020.
- Hong CJ, Li QL, Zhang Y. Research progress in TWEAK and its receptor functions in cardiovascular diseases [J]. Military Medical Sciences, 2016, 40 (2) : 158-161. DOI: 10. 7644/j. issn. 1674-9960. 2016. 02. 020.
- [19] Dupays L, Towers N, Wood S, et al. Furin, a transcriptional target of NKX2-5, has an essential role in heart development and function [J]. PLoS One, 2019, 14 (3) : e0212992. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0212992.
- [20] 李艳, 王静, 袁琛, 等. Furin 基因对高血压心肌梗死细胞增殖、迁移以及作用机制的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17 (9) : 913-916. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4695. 2018. 09. 006.
- Li Y, Wang J, Yuan C, et al. The study of Furin gene on the proliferation, migration and mechanism of hypertensive myocardial infarction cells [J]. J Clinical & Experimental Medicine Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2018, 17 (9) : 913-916. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4695. 2018. 09. 006.
- [21] 邢潇萌, 郑刚. H 型高血压的临床研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24 (22) : 4400-4403, 4410. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2018. 22. 007.
- Xing XM, Zheng G. Clinical research progress of H-type hypertension [J]. Medical Recapitulate, 2018, 24 (22) : 4400-4403, 4410. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2018. 22. 007.
- [22] Li NF, Luo WL, Zhang JH, et al. Associations between genetic variations in the FURIN gene and hypertension [J]. BMC Med Genet, 2010, 11 (8) : 124. DOI: 10. 1186/1471-2350-11-124.
- [23] Zachar R, Mikkelsen MK, Skjoldt K, et al. The epithelial Na channel α - and γ -subunits are cleaved at predicted furin-cleavage sites, glycosylated and membrane associated in human kidney [J]. Pflugers Arch, 2019, 471 (11-12) : 1383-1396. DOI: 10. 1007/s00424-019-02321-z.
- [24] Yamasaki G, Sakurada M, Kitagawa K, et al. Effect of FURIN SNP rs17514846 on coronary atherosclerosis in human cardiac specimens: An autopsy study of 106 cases [J]. Leg Med (Tokyo), 2022, 55 : 102006. DOI: 10. 1016/j. legalmed. 2021. 102006.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.003

心血管疾病专题

芪苈强心胶囊联合左西孟旦注射液治疗老年急性心肌梗死合并左心衰竭患者临床观察

刘杨, 张娟, 胡莹, 张静文

基金项目: 山东省自然科学基金联合基金(ZR202108140016); 山东省自然科学基金联合基金重点支持项目(ZR2021LZY038);

山东省自然科学基金面上项目(ZR2021LZY011); 山东省中医药科技发展计划(2021M180)

作者单位: 250014 济南, 山东中医药大学附属医院心血管科

通信作者: 张娟, E-mail: ajmermaid@163.com

【摘要】目的 观察芪苈强心胶囊联合左西孟旦注射液治疗老年急性心肌梗死(AMI)合并左心衰竭(HF)患者临床效果。方法 选择2019年2月—2021年9月山东中医药大学附属医院心血管科诊治AMI合并HF患者82例,根据随机数字表法分为对照组与观察组,各41例,对照组患者给予左西孟旦注射液治疗,观察组在对照组基础上联合芪苈强心胶囊治疗。观察2组临床疗效,治疗前后中医证候评分,心脏彩色超声指标[左心室射血分数(LVEF)、E/A值、左心室Tei指数],实验室检查指标[二氧化碳分压(PaCO₂)、氧分压(PaO₂)、N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、肌钙蛋白I(cTNI)、高敏C反应蛋白(hs-CRP)、同型半胱氨酸(Hcy)],随访1年记录患者主要心血管不良事件(MACE)发生情况。结果 治疗后观察组总有效率高于对照组(90.24% vs. 78.05%, $\chi^2/P=6.104/0.047$);2组中医证候评分(畏寒肢冷、肢体浮肿、心悸喘促、腰腹发凉、小便不利)均较治疗前降低,且观察组低于对照组($t/P=2.796/0.006$ 、 $2.357/0.021$ 、 $2.015/0.047$ 、 $2.632/0.010$ 、 $2.507/0.014$);2组LVEF、E/A值均较治疗前升高,左心室Tei指数较治疗前降低,且观察组升高/降低幅度大于对照组($t/P=3.156/0.002$ 、 $3.211/0.002$ 、 $3.604/0.001$);2组cTNI、Hcy、NT-proBNP、hs-CRP及PaCO₂水平均降低,PaO₂升高,观察组Hcy、NT-proBNP、hs-CRP、PaCO₂低于对照组,PaO₂水平高于对照组($t/P=2.651/0.010$ 、 $2.872/0.005$ 、 $7.560/ <0.001$ 、 $7.851/ <0.001$ 、 $6.632/ <0.001$),2组cTNI水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);观察组全因死亡、急性致死性心肌梗死、急性心力衰竭发生率均低于对照组($\chi^2/P=4.440/0.035$ 、 $3.888/0.049$ 、 $4.497/0.034$)。结论 芪苈强心胶囊联合左西孟旦注射液治疗老年急性心肌梗死合并左心衰竭患者临床疗效显著。

【关键词】 心肌梗死,急性;左心衰竭;芪苈强心胶囊;左西孟旦注射液;心功能;老年人

【中图分类号】 R542.2⁺2

【文献标识码】 A

Clinical observation on the treatment of senile patients with acute myocardial infarction and left heart failure with *Qiliqiangxin* Capsule and levosimendan injection Liu Yang, Zhang Juan, Hu Ying, Zhang Jingwen. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province, Jinan 250014, China

Corresponding author: Zhang Juan, E-mail: ajmermaid@163.com

Funding program: Natural Science Foundation of Shandong Province(ZR202108140016); Natural Science Foundation of Shandong Province Key Support Projects(ZR2021LZY038); Natural Science Foundation of Shandong Province General Project(ZR2021LZY011); TCM Science and Technology Development Program of Shandong Province(2021M180)

【Abstract】 Objective To observe the clinical effect of *Qiliqiangxin* Capsule combined with levosimendan injection in the treatment of elderly patients with acute myocardial infarction (AMI) and left heart failure (HF). Methods From February 2019 to September 2021, 82 patients with AMI and HF diagnosed and treated by the Second Department of Cardiovascular Disease, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine were randomly divided into a control group and an observation group, with 41 patients in each group. The control group was treated with levosimendan injection, and the observation group was treated with *Qiliqiangxin* Capsule on the basis of the control group. Observe the clinical efficacy of the two groups, the score of traditional Chinese medicine syndromes before and after treatment, cardiac color ultrasound indicators (left ventricular ejection fraction (LVEF), E/A value, left ventricular Tei index), laboratory examination indicators (partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂), partial pressure of oxygen (PaO₂), N-terminal proBNP precursor

(NT-proBNP), troponin I (cTNI), high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and homocysteine level (Hcy)), The incidence of major adverse cardiovascular events (MACE) was recorded during a one-year follow-up. **Results** After treatment, the total effective rate of the observation group was higher than that of the control group (90.24% vs. 78.05%, $\chi^2/P=6.104/0.047$); the TCM syndrome scores of both groups (aversion to cold and cold limbs, limb edema, palpitations and shortness of breath, coldness in the waist and abdomen, difficulty urinating) were lower than before treatment, and the scores of the observation group were lower than those of the control group ($t/P=2.796/0.006, 2.357/0.021, 2.015/0.047, 2.632/0.010, 2.507/0.014$); LVEF and E/A values of both groups increased and left ventricular Tei index decreased after treatment, and the increase/decrease amplitude of the observation group was greater than that of the control group ($t/P=3.156/0.002, 3.211/0.002, 3.604/0.001$); cTNI, Hcy, NT-proBNP, hs-CRP, and PaCO₂ levels of both groups decreased, and PaO₂ increased after treatment. The levels of Hcy, NT-proBNP, hs-CRP, and PaCO₂ in the observation group were lower than those in the control group, and the PaO₂ level was higher than that in the control group ($t/P=2.651/0.010, 2.872/0.005, 7.560/ <0.001, 7.851/ <0.001, 6.632/ <0.001$). There was no significant difference in cTNI levels between the two groups ($P>0.05$); the incidence of all-cause mortality, acute fatal myocardial infarction, and acute heart failure in the observation group was lower than that in the control group ($\chi^2/P=4.440/0.035, 3.888/0.049, 4.497/0.034$).. **Conclusion** The clinical efficacy of *Qiliqiangxin* Capsule combined with levosimendan injection in the treatment of elderly patients with acute myocardial infarction and left heart failure is significant.

【Key words】 Myocardial infarction,acute; Left heart failure; *Qiliqiangxin* Capsule; Levosimendan injection; Cardiac function; Elderly

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是最为常见的缺血性心脏病,由于经皮冠状动脉介入 (PCI) 或溶栓治疗的使用,AMI 的病死率有所下降^[1-2]。然而部分老年患者病情发现不及时,未能行 PCI 或溶栓治疗导致 AMI 后心室纤维重构,心肌细胞死亡,机体心肌内膜发生氧化应激、炎性反应,所有这些机制导致心室功能恶化,并逐渐发展为心力衰竭 (heart failure, HF)^[3-4]。因此老年 AMI 患者合并 HF 较为常见。AMI 合并 HF 患者极易出现血流动力学障碍,甚至心源性休克等严重并发症,病死率较高^[5]。中医认为本病属于“心衰病”范畴,老年人肾气自衰,阳气虚弱,阳虚水泛上逆冲心,心之气血阴阳耗损,无力鼓动心脉,血液运行失畅,气血瘀滞,发为本病。芪苈强心胶囊为“中成药治疗心力衰竭临床应用指南”^[6]推荐用药,临床研究发现可有效改善患者预后^[7-10]。对于芪苈强心胶囊联合左西孟旦治疗老年 AMI 合并 HF 患者临床未见相关报道,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2019 年 2 月—2021 年 9 月山东中医药大学附属医院心血管科诊治 AMI 合并 HF 患者 82 例,根据随机数字表法分为对照组与观察组,各 41 例,2 组治疗过程中未出现剔除脱落现象。2 组临床资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究通过医院伦理委员会批准[2019 伦审第 (19)号-KY],患者或家属知情同意并签署知情同意书。

表 1 对照组与观察组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Comparison of Clinical Data between the Control Group and the Observation Group

项 目	对照组 (<i>n</i> = 41)	观察组 (<i>n</i> = 41)	χ^2/t 值	<i>P</i> 值
男/女 (例)	21/20	24/17	0.443	0.506
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	70.34 $\pm$ 9.15	71.58 $\pm$ 8.46	0.637	0.526
病程 ($\bar{x} \pm s$, min)	22.63 $\pm$ 6.93	24.51 $\pm$ 7.02	1.220	0.226
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	22.25 $\pm$ 1.86	22.17 $\pm$ 2.04	0.186	0.853
收缩压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	148.97 $\pm$ 11.26	149.28 $\pm$ 10.47	0.129	0.898
舒张压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	82.91 $\pm$ 5.56	83.45 $\pm$ 6.18	0.416	0.679
吸烟史 [例 (%)]	16 (39.02)	18 (43.90)	0.201	0.654
基础疾病 高血压病	16 (39.02)	18 (43.90)	0.201	0.654
[例 (%)] 2 型糖尿病	19 (46.34)	14 (34.15)	1.268	0.260
NYHA 分级 Ⅲ级	26 (63.41)	28 (68.29)	0.217	0.641
[例 (%)] Ⅳ级	15 (36.59)	13 (31.71)		

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①符合“急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南 (2019)”^[11] AMI 诊断标准及“中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018”^[12] 左心衰竭诊断标准;②符合“慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识”^[13] 心力衰竭阳虚水停辨证标准:畏寒肢冷,肢体浮肿,心悸喘促,腰腹发凉,小便不利,舌胖有齿痕,脉弦滑或沉细;③年龄 ≥ 60 岁老年患者且未行冠状动脉介入或冠状动脉搭桥治疗;④新发 AMI 患者。(2)排除标准:①非 AMI 引发左心衰竭患者;②心力衰竭病史 >3 个月或陈旧性心肌梗死患者;③严重凝血功能障碍、重度贫血等血液系统疾病、严重肝肾功能不全、糖尿病酮症酸中毒患者;④合并主动脉夹层、急性脑梗死、室性心动过速等恶性心律失常、血流

动力学不稳定等患者;⑤卧床制动出现下肢静脉血栓或合并肺栓塞患者;⑥合并重症感染、恶性肿瘤等其他缩短生命周期重症疾病。(3)剔除及脱落标准:①患者家属放弃治疗;②随访过程失访不能判断生存周期;③治疗过程中出现严重不良反应;④未能按时遵医嘱服药或治疗不耐受而退出目前治疗方案。

1.3 治疗方法 对照组:在给予抗血小板聚集、降脂、利尿、控制心室率、抗感染、吸氧等对症治疗基础上,给予左西孟旦注射液(齐鲁制药有限公司)12.5 mg 加入 5% 葡萄糖注射液 45 ml 以 1.5 ml/h 速度微量泵泵入,根据患者血压情况进行泵速调节,注意预防低血压情况。每周用药 1 次,治疗 3 周。观察组:在对照组基础上给予芪苈强心胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司)1.2 g,每天 3 次,治疗 3 周。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 中医证候评分^[14]:治疗前及治疗 3 周后对患者畏寒肢冷、肢体浮肿、心悸喘促、腰腹发凉、小便不利进行评分,依据无、轻、中、重计 0、2、4、6 分。

1.4.2 心脏彩色超声指标检测:治疗前及治疗 3 周后对患者行心脏彩色超声(美国 GE 公司 Gevid7PRO 彩色多普勒电脑超声机)检查, S5-1 超声探头,频率 1.0~4.0 MHz,深度 14~20 cm,帧频 70~80 帧/s。患者左侧卧位,探头放于胸骨旁左缘于左心室长轴切面行 M 型超声测量左心室射血分数(LVEF),脉冲多普勒法测定 E/A 值及左心室 Tei 指数。

1.4.3 实验室指标检查:治疗前后采集患者肘静脉血 10 ml,离心取上层血清采用化学发光法(德国罗氏 co-base411 型)测定肌钙蛋白 I(cTNI)、同型半胱氨酸(Hcy);荧光免疫法(北京普朗医疗公司 upT-3A 型)测定 N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)水平;ELISA 法(LD-96A 莱恩德全波长酶标分析仪)测定高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)水平,试剂盒均购自北京九强生物科技有限公司。采集股动脉血 2 ml,采用血气分析仪(梅州康立有限公司血气分析仪 BG-800A)测定二氧化碳

分压(PaCO₂)、氧分压(PaO₂)水平。

1.4.4 随访情况:对所有患者进行为期 1 年随访,随访形式包括电话、门诊复诊等,每 2 个月进行 1 次,直至患者死亡或随访结束(2022 年 10 月 1 日),记录患者主要心血管不良事件(MACE)发生情况。

1.5 临床疗效评价标准 依据参考文献[14-15]制定,显效:患者畏寒肢冷、肢体浮肿、心悸喘促等症状显著减轻,中医证候评分较前减少≥80%,肺部湿啰音显著减轻,患者生命体征平稳,心功能改善 2 级;有效:患者畏寒肢冷、肢体浮肿、心悸喘促等症状有所减轻,中医证候评分较前减少≥60%,肺部湿啰音较前减轻,患者生命体征较前平稳,心功能改善 1 级;无效:患者上述症状无改善,心功能未改善,双肺仍有大量湿性啰音。总有效率=(显效+有效)/总例数×100%。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 26 版软件进行数据分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用χ²检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组比较采用 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 治疗 3 周后观察组总有效率为 90.24%,高于对照组的 78.05%,差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 对照组与观察组临床疗效比较 [例(%)]

Tab. 2 Comparison of Clinical Efficacy between the Control Group and the Observation Group

组 别	例数	显效	有效	无效	总有效率(%)
对照组	41	9(21.95)	23(56.09)	9(21.95)	78.05
观察组	41	19(46.34)	18(43.90)	4(9.76)	90.24
U/χ ² 值		U=2.441		χ ² =6.104	
P 值		0.015		0.047	

2.2 2 组治疗前后中医证候评分比较 治疗后 2 组患者畏寒肢冷、肢体浮肿、心悸喘促、腰腹发凉、小便不利评分均较治疗前降低,且观察组低于对照组(P<0.05),见表 3。

表 3 对照组与观察组治疗前后中医证候评分比较 ($\bar{x} \pm s$,分)

Tab. 3 Comparison of TCM syndrome scores between the control group and the observation group before and after treatment

组 别	时间	畏寒肢冷	肢体浮肿	心悸喘促	腰腹发凉	小便不利
对照组 (n=41)	治疗前	3.34±0.89	3.42±0.95	4.11±0.76	2.94±1.09	3.21±0.66
	治疗后	1.24±0.51	1.38±0.77	1.43±0.51	0.97±0.18	1.14±0.65
观察组 (n=41)	治疗前	3.38±0.73	3.48±1.01	4.06±0.82	2.96±1.05	3.17±0.51
	治疗后	0.99±0.26	1.04±0.51	1.17±0.65	0.84±0.26	0.87±0.23
t/P 对照组内值		13.109/ <0.001	10.682/ <0.001	18.749/ <0.001	11.418/ <0.001	14.308/ <0.001
t/P 观察组内值		19.748/ <0.001	13.808/ <0.001	17.685/ <0.001	12.549/ <0.001	26.324/ <0.001
t/P 治疗后组间值		2.796/ 0.006	2.357/ 0.021	2.015/ 0.047	2.632/ 0.010	2.507/ 0.014

2.3 2 组治疗前后心脏彩色超声指标比较 治疗后 2 组患者 LVEF、E/A 值均较治疗前升高,左心室 Tei 指数较治疗前降低,且观察组升高/降低幅度大于对照组 ($P<0.01$),见表 4。

表 4 对照组与观察组治疗前后心脏彩色超声指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison of Cardiac Color Ultrasound Indexes between the Control Group and the Observation Group before and after Treatment

组 别	时间	LVEF (%)	E/A 值	左心室 Tei 指数
对照组 (n=41)	治疗前	46.38 ± 9.91	0.81 ± 0.26	0.81 ± 0.17
	治疗后	52.38 ± 5.74	1.26 ± 0.23	0.51 ± 0.11
观察组 (n=41)	治疗前	45.24 ± 10.12	0.79 ± 0.22	0.82 ± 0.26
	治疗后	56.77 ± 6.81	1.47 ± 0.35	0.43 ± 0.09
t/P 对照组内值		3.355/ 0.001	8.301/ <0.001	9.487/ <0.001
t/P 观察组内值		6.052/ <0.001	10.532/ <0.001	9.076/ <0.001
t/P 治疗后组间值		3.156/ 0.002	3.211/ 0.002	3.604/ 0.001

2.4 2 组治疗前后实验室指标比较 治疗后 2 组 cTNI、Hcy、NT-proBNP、hs-CRP、PaCO₂ 水平均较治疗前降低,PaO₂ 均较治疗前升高,观察组 Hcy、NT-proBNP、hs-CRP、PaCO₂ 低于对照组,PaO₂ 水平高于对照组 ($P<0.05$),治疗后 2 组 cTNI 水平比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 5。

2.5 2 组 MACE 发生情况比较 治疗后观察组全因死亡、急性致死性心肌梗死、急性心力衰竭发生率均低于对照组 ($P<0.05$)。2 组急性脑梗死、恶性心律失常

常发生率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 6。

3 讨 论

中医认为本病属于“心衰病”“真心痛”范畴,老年人年过半百而肾气自衰,阳气虚弱,阳虚水泛上逆冲心,心之气血阴阳耗损,血脉循行失畅,久则化痰化瘀,心阳虚衰,无力鼓动心脉,血液运行失畅,气血瘀滞,发为本病。治疗以益气温阳、利水消肿、活血通络为治疗原则。研究发现^[16],芪苈强心胶囊联合常规西医治疗心力衰竭疗效显著,成本效果分析显示其经济性较高,可被更多患者接受,临床开展可行性强。

芪苈强心胶囊由黄芪、人参、黑附片、丹参、葶苈子、泽泻、玉竹、桂枝、红花、香加皮、陈皮等组成。方中黄芪益气健脾、益卫固表、利水消肿,可补益中焦脾胃,补而不滞,促进脾胃水谷精微运化,濡养心脏;利水消肿之功可减轻肢体浮肿,通利小便;益卫固表可温补阳气、抵御外邪,直达病机为君药。葶苈子、泽泻、香加皮可利水消肿,助君药增强利小便之功,减轻肢体浮肿、心悸喘促临床症状;丹参、红花活血化瘀,入心经,瘀血去而新血生,心脉正常运行,脉道通畅,通则不痛,共为臣药。佐以附片、人参回阳救逆、补火助阳,补肾阳祛寒邪,减轻畏寒肢冷、腰腹发凉临床症状,配合桂枝温阳化气,阳气足则温煦经络,气血津液于脉中运行,又可濡养各脏腑经络,减轻疼痛不适。玉竹养阴生津,防止温阳、化瘀太过伤及阴液。陈皮理气健脾,脾胃升清濡养心脏。促进心之气血正常运行。全方发挥益气温阳、利水消肿、活血通络之功。因此本研究结果发现,

表 5 对照组与观察组治疗前后实验室指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Comparison of Laboratory Indexes between the Control Group and the Observation Group before and after Treatment

组 别	时间	cTNI (ng/ml)	Hcy (mg/L)	NT-proBNP (ng/L)	hs-CRP (mg/L)	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)
对照组 (n=41)	治疗前	8.78 ± 0.37	1.98 ± 0.34	4 097.19 ± 1 128.74	16.34 ± 5.47	42.28 ± 3.84	52.72 ± 9.15
	治疗后	0.51 ± 0.14	1.36 ± 0.17	2 067.57 ± 802.43	9.34 ± 1.45	38.46 ± 1.45	91.27 ± 9.33
观察组 (n=41)	治疗前	8.72 ± 0.28	1.97 ± 0.27	4 156.64 ± 1 231.27	15.82 ± 5.12	42.45 ± 4.13	54.14 ± 8.47
	治疗后	0.48 ± 0.12	1.21 ± 0.32	1 571.88 ± 759.68	6.12 ± 2.31	35.27 ± 2.16	106.81 ± 11.75
t/P 对照组内值		13.857/ <0.001	10.444/ <0.001	9.384/ <0.001	7.921/ <0.001	5.959/ <0.001	18.889/ <0.001
t/P 观察组内值		17.199/ <0.001	11.623/ <0.001	11.440/ <0.001	11.058/ <0.001	9.864/ <0.001	23.284/ <0.001
t/P 治疗后组间值		1.042/ 0.301	2.651/ 0.010	2.872/ 0.005	7.560/ <0.001	7.851/ <0.001	6.632/ <0.001

表 6 对照组与观察组 MACE 发生率比较 [例(%)]

Tab.6 Comparison of the incidence of MACE between the control group and the observation group

组 别	例数	全因死亡	急性致死性心肌梗死	急性心力衰竭	急性脑梗死	恶性心律失常
对照组	41	10(24.39)	6(14.63)	13(31.71)	6(14.63)	5(12.20)
观察组	41	3(7.32)	1(2.44)	5(12.20)	5(12.20)	4(9.76)
χ ² 值		4.440	3.888	4.497	0.104	0.124
P 值		0.035	0.049	0.034	0.747	0.725

芪蒺强心胶囊可有效降低各中医证候评分,临床疗效显著,心血管不良事件发生率低。

本研究发现,芪蒺强心胶囊可有效提高患者心功能,提高体内氧分压水平,降低二氧化碳分压,减轻机体炎性反应,降低 cTNI、Hcy、NT-proBNP 等指标。芪蒺强心胶囊组方配伍发挥益气温阳、利水消肿、活血通络之功,促进心脉血液运行,心脏得以濡养,心功能得到改善,心功能改善可促进更多血液回流心脏,心脏得以濡养,机体内代谢增强,二氧化碳分压降低、氧分压升高;同时活血化瘀使经络运行不受阻,血液运行顺畅通而不痛,加之血能载气,促进人体气机正常运行,使得心络通畅,可降低 cTNI 水平,改善患者全身血液运行状态,活血而不留瘀,补而不滞,气机通畅,临床疗效显著。网络药理学研究发现^[17],芪蒺强心胶囊可以抑制心肌肥大细胞通路表达,还可抑制炎性通路及心肌纤维化通路,改善心脏重构,减轻心肌损伤,以达到纠正心力衰竭治疗目的。现代药理研究发现^[18-19],黄芪有效成分黄芪甲苷可通过下调相关炎性信号通路表达,抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌梗死引发心肌损伤,还可以抑制转化生长因子增加,改善线粒体功能障碍,增加三磷酸腺苷水平,纠正心力衰竭保护心肌细胞。人参有效成分人参皂苷可以改善心功能,降低心肌梗死面积,抑制机体炎性反应减轻心肌损伤,减少内源性线粒体细胞凋亡,改善心室重构,同时还可以抑制细胞凋亡和自噬,保护心肌细胞免受损伤,纠正心力衰竭^[20-21]。附片有效多糖成分可以促进硫蛋白合成,减轻氧化应激损伤及心肌细胞凋亡;其乌头碱成分具有显著强心功能,增强心肌收缩力并改善心力衰竭^[22]。葶苈子的水部位可以改善物质代谢紊乱,改善机体氧化应激失衡发挥强心作用,纠正心力衰竭;其黄酮苷成分可以减轻细胞氧化应激,抑制细胞凋亡,改善心室重构及心肌细胞纤维化^[23-24]。丹参有效成分丹参酮 II A 减轻促炎细胞因子释放,降低中性粒细胞等炎性浸润,具有强大抗炎作用;同时还可以抑制血管紧张素表达以减轻心脏肥大,提高一氧化氮活性发挥纠正心力衰竭治疗作用^[25]。

本研究将芪蒺强心胶囊应用于老年心肌梗死合并心力衰竭患者,为本研究创新之处,老年人肾气自衰,阳气虚弱,阳虚水泛上逆冲心,本方中黄芪、附片、人参均可补益阳气,改善老年人阳虚体质状态,同时黄芪还可利水消肿,配合葶苈子、泽泻改善水肿状态,降低心脏负荷,提高心功能,降低心肌损伤;同时老年患者久病心之气血阴阳耗损,血脉循行失畅,久则化瘀而无力鼓动心脉,方中丹参、红花可活血化瘀,清除机体瘀血,

增加心脏回心血流量,提高氧供,配合桂枝、玉竹,使得活血而不伤阴,最终达到提高心功能,降低心肌损伤的治疗目的。

综上,芪蒺强心胶囊联合左西孟旦注射液治疗老年急性心肌梗死合并左侧心力衰竭患者临床疗效显著,可降低中医证候评分,提高心功能,减轻心肌损伤,心血管不良事件发生率低。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘杨、张娟:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写及修改;胡莹:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;张静文:实施研究过程,资料搜集整理,进行统计学分析

参考文献

- [1] Kapur NK, Thayer KL, Zweck E. Cardiogenic shock in the setting of acute myocardial infarction [J]. *Methodist Debaque Cardiovasc J*, 2020, 16(1): 16-21. DOI: 10. 14797/mdcj-16-1-16.
- [2] Femia G, French JK, Juergens C, et al. Right ventricular myocardial infarction: pathophysiology, clinical implications and management [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2021, 22(4): 1229-1240. DOI: 10. 31083/j. rcm2204131.
- [3] Tomoaia R, Beyer RS, Simu G, et al. Understanding the role of echocardiography in remodeling after acute myocardial infarction and development of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Med Ultrason*, 2019, 21(1): 69-76. DOI: 10. 11152/mu-1768.
- [4] Nagele MP, Flammer AJ. Heart failure after right ventricular myocardial infarction [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2022, 19(6): 375-385. DOI: 10. 1007/s11897-022-00577-8.
- [5] Ghanshani S, Chen C, Lin B, et al. Risk of acute myocardial infarction, heart failure, and death in migraine patients treated with triptans [J]. *Headache*, 2020, 60(10): 2166-2175. DOI: 10. 1111/head. 13959.
- [6] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗心力衰竭临床应用指南(2021 年) [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(3): 261-275. DOI: 10. 7661/j. cjim. 20211119. 225.
- [7] 薛晓波, 印美, 潘晓丹, 等. 芪蒺强心胶囊联合常规西药治疗慢性心力衰竭临床研究 [J]. *新中医*, 2022, 54(19): 80-83. DOI: 10. 13457/j. enki. jncm. 2022. 19. 016.
- [8] 李世阁, 叶章正, 林英娜, 等. 芪蒺强心胶囊联合沙库巴曲缬沙坦钠片治疗慢性心力衰竭临床疗效及对 N 末端脑利钠肽前体、超敏 C 反应蛋白和炎症因子的影响 [J]. *河北中医*, 2022, 44(7): 1119-1122. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-2619. 2022. 07. 015.

- Li SG, Ye ZZ, Lin YN, et al. Clinical efficacy of Qili Qiangxin capsule combined with sacubitril valsartan sodium tablets for chronic heart failure and how to impact on N-terminal pro-brain nitric peptide, high-sensitivity C-reactive protein and inflammatory factors[J]. Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 44 (7) : 1119-1122. DOI:10. 3969/j. issn. 1002-2619. 2022. 07. 015.
- [9] 李刘文, 白红艳, 王岗, 等. 外源性脑利钠肽联合芪苈强心胶囊对急性心力衰竭病人心功能指标及 GDF-15 水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20 (4) : 691-694. DOI: 10. 12102/j. issn. 1672-1349. 2022. 04. 022.
- Li LW, Bai HY, Wang G, et al. Effects of exogenous brain natriuretic peptide combined with Qiliqiangxin Capsule on cardiac function indexes and GDF-15 levels in acute heart failure patients[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2022, 20 (4) : 691-694. DOI: 10. 12102/j. issn. 1672-1349. 2022. 04. 022.
- [10] 王丽昀, 商秀洋, 吴华芹, 等. 芪苈强心胶囊对扩张型心肌病失代偿心力衰竭治疗好转出院患者易损期心功能的影响[J]. 疑难病杂志, 2022, 21 (2) : 134-138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 02. 006.
- Wang LY, Shang XY, Wu HQ, et al. Effects of Qiliqiangxin capsule on cardiac function in vulnerable stage patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure[J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2022, 21 (2) : 134-138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 02. 006.
- [11] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南 (2019) [J]. 中华心血管病杂志, 2019 (10) : 766-783. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3758. 2019. 10. 003.
- Chinese Society of Cardiology, Editorial Board of Chinese Journal of Cardiovascular Diseases. 2019 Chinese Society of Cardiology (CSC) guidelines for the diagnosis and management of patients with ST segment elevation myocardial infarction[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2019 (10) : 766-783. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0253-3758. 2019. 10. 003.
- [12] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心力衰竭和心肌病杂志, 2018, 2 (4) : 196-225. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2096-3076. 2018. 12. 002.
- Heart failure Group, Cardiology Branch of Chinese Medical Association, Heart failure Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association, Editorial Board of Chinese Journal of Cardiovascular Diseases. Chinese Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Heart Failure 2018 [J]. Chinese Journal of Heart Failure and Cardiomyopathy, 2018, 2 (4) : 196-225. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2096-3076. 2018. 12. 002.
- [13] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36 (2) : 133-141. DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 02. 0133.
- Chen KJ, Wu ZG, Zhu MJ, et al. Expert consensus on diagnosis and treatment of chronic heart failure with integrated Chinese and Western medicine [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2016, 36 (2) : 133-141. DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 02. 0133.
- [14] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 69.
- [15] 李翔, 郑文武. 注射用益气复脉 (冻干) 联合米力农治疗急性心肌梗死合并心衰疗效及对患者血清 IL-6、CRP 水平的影响[J]. 药物评价研究, 2021, 44 (11) : 2498-2504. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-6376. 2021. 11. 033.
- Li X, Zheng WW. Therapeutic effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection combined with milrinone on acute myocardial infarction complicated with heart failure and its effect on serum IL-6 and CRP levels [J]. Drug Evaluation Research, 2021, 44 (11) : 2498-2504. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-6376. 2021. 11. 033.
- [16] 甘雄, 王文茜, 潘国洪, 等. 芪苈强心胶囊治疗慢性射血分数减少心衰的成本—效果分析[J]. 安徽医药, 2023, 27 (1) : 185-189. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-6469. 2023. 01. 040.
- [17] 张玉婕. 基于网络药理学探讨芪苈强心胶囊抗慢性心力衰竭的作用机制[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.
- [18] 陈要起, 穆金兴, 李延鑫, 等. 芪苈强心胶囊辅助陈旧性心肌梗死伴心力衰竭患者对心功能、肾功能及预后的影响[J]. 疑难病杂志, 2020, 19 (8) : 785-790. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 08. 007.
- [19] 孔祥琳, 吕琴, 李运伦, 等. 黄芪甲苷对心脑血管疾病的现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (2) : 218-223. DOI: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20210144.
- [20] 吕丽娜, 姜丽红. 人参皂苷 Rg1 对心血管系统的药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34 (6) : 83-86. DOI: 10. 13728/j. 1673-6427. 2020. 06. 018.
- [21] 郑思道, 李珂辉, 马学竹, 等. 芪苈强心胶囊治疗心力衰竭的 Meta 分析[J]. 疑难病杂志, 2022, 21 (1) : 84-89. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 01. 017.
- [22] 曾祥辉, 谢庆凤, 颜芳, 等. 附子现代药理研究及临床应用差异探讨[J]. 新中医, 2022, 54 (4) : 159-163. DOI: 10. 13457/j. cnki. jncm. 2022. 04. 041.
- [23] 格日勒, 吴云, 郭欣君, 等. 芪苈强心胶囊联合沙库巴曲缬沙坦钠治疗非射血分数减低型心力衰竭的疗效[J]. 疑难病杂志, 2021, 20 (7) : 653-657. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2021. 07. 002.
- [24] 林雪竹, 李蔚群, 关永霞, 等. 葶苈子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2022, 24 (3) : 550-558. DOI: 10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20201208002.
- [25] 贾静, 单士刚, 迟恒. 丹参酮 II A 药理作用的研究进展[J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2022, 36 (5) : 441-444. DOI: 10. 16751/j. cnki. 2095-4646. 2022. 05. 0441.

(收稿日期: 2022 - 12 - 16)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.004

心血管疾病专题

冠心病合并甲状腺功能亢进患者肾素—血管紧张素系统活性及其与并发心房颤动的相关性

孙兑荣, 孙宇飞, 李君, 张宏伟

基金项目: 山西省自然科学基金(201701D121165)

作者单位: 030001 太原, 山西省心血管病医院心内科(孙兑荣、孙宇飞、李君); 030013 太原, 山西省肿瘤医院血液内科(张宏伟)

通信作者: 张宏伟, E-mail: zhw_201@163.com

【摘要】目的 分析冠心病合并甲状腺功能亢进(甲亢)患者肾素—血管紧张素系统活性及其与并发心房颤动(房颤)的相关性。方法 选取 2020 年 4 月—2022 年 7 月山西省心血管病医院收治的冠心病患者 75 例为冠心病组, 冠心病合并甲亢患者 75 例为合并甲亢组, 同期健康体检者 75 例为健康对照组, 比较各组受试者肾素—血管紧张素系统活性[血浆肾素(PRA)、血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素 II(AT II)]、左心房内径(LAD), 应用 Pearson 分析肾素—血管紧张素系统活性与促甲状腺激素(TSH)、血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、血清游离甲状腺素(FT_4)、LAD 的相关性, 采用多因素 Logistic 回归分析冠心病合并甲亢患者并发房颤的相关影响因素。结果 PRA、ACE、AT II、LAD 水平比较, 合并甲亢组 > 冠心病组 > 健康对照组($P < 0.05$); PRA、ACE、AT II、LAD 水平比较, 冠心病组、合并甲亢组有房颤患者均高于无房颤患者($P < 0.05$), 合并甲亢组有房颤患者均高于冠心病组有房颤患者($P < 0.05$), 合并甲亢组无房颤患者均高于冠心病组无房颤患者($P < 0.05$), 持续性房颤患者均高于阵发性房颤患者($t/P = 9.647/ < 0.001$, $2.584/0.012$, $13.133/ < 0.001$, $3.559/ < 0.001$)。血清 TSH 水平比较, 合并甲亢组 < 冠心病组 < 健康对照组($F/P = 349.626/ < 0.001$), 血清 FT_3 、 FT_4 水平比较, 合并甲亢组 > 冠心病组 > 健康对照组($F/P = 472.196/ < 0.001$, $506.342/ < 0.001$)。Pearson 相关性分析显示, PRA 与 TSH 呈正相关, AT II、ACE 与 TSH 呈负相关($r = 0.769$ 、 -0.792 、 -0.803 , $P < 0.001$); ACE 与 FT_3 、 FT_4 呈正相关($r = 0.718$ 、 0.680 , $P < 0.001$); PRA、ACE、AT II 与 LAD 呈正相关($r = 0.795$ 、 0.790 、 0.751 , P 均 < 0.001); Logistic 回归分析显示, TSH 低、 FT_3 高、 FT_4 高、PRA 高、ACE 高、AT II 高是冠心病合并甲亢患者并发房颤的危险因素[OR(95% CI) = 9.080(1.694 ~ 48.671)、10.103(1.582 ~ 64.519)、10.200(1.805 ~ 57.643)、12.730(1.947 ~ 83.226)、15.123(3.684 ~ 62.081)、9.667(1.032 ~ 90.557)]。结论 冠心病合并甲亢患者 PRA、ACE、AT II、LAD 水平异常升高, 且与并发房颤联系密切, 肾素—血管紧张素系统活性与 TSH、 FT_3 、 FT_4 、LAD 相关, 且均为冠心病合并甲亢患者并发房颤的独立危险因素。

【关键词】 冠心病; 甲状腺功能亢进; 心房颤动; 肾素—血管紧张素系统

【中图分类号】 R541.4; R581.1

【文献标识码】 A

Relationship between renin angiotensin system activity and atrial fibrillation in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism Sun Duirong*, Sun Yufei, Li Jun, Zhang Hongwei. * Department of Cardiology, Shanxi Cardiovascular Hospital, Shanxi Province, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Zhang Hongwei, E-mail: zhw_201@163.com

Funding program: Shanxi Natural Science Foundation (201701D121165)

【Abstract】 Objective To analyze the activity of renin angiotensin system and its correlation with atrial fibrillation (AF) in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism. Methods From April 2020 to July 2022, 75 patients with coronary heart disease admitted to the Shanxi Provincial Cardiovascular Hospital were selected as the coronary heart disease group, 75 patients with coronary heart disease combined with hyperthyroidism as the hyperthyroidism group, and 75 healthy subjects in the same period were selected as the healthy control group. The renin angiotensin system activity [plasma renin (PRA), angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin II (AT II), and left atrial diameter (LAD)] of the subjects in each group were compared, Pearson was used to analyze the correlation between the activity of the renin angiotensin system and thyroid stimulating hormone (TSH), serum free triiodothyronine (FT_3), serum free thyroxine (FT_4), and LAD. Multivariate logistic regression was used to analyze the related influencing factors of atrial fibrillation in patients with coronary heart dis-

ease and hyperthyroidism. **Results** The levels of PRA, ACE, AT II, and LAD in patients with hyperthyroidism were higher than those in patients with coronary heart disease and healthy controls ($P<0.05$); The levels of PRA, ACE, AT II, and LAD in patients with atrial fibrillation in the coronary heart disease group and hyperthyroidism group were higher than those without atrial fibrillation ($P<0.05$). The levels of patients with atrial fibrillation in the hyperthyroidism group were higher than those in the coronary heart disease group ($P<0.05$). The levels of patients without atrial fibrillation in the hyperthyroidism group were higher than those without atrial fibrillation in the coronary heart disease group ($P<0.05$), Patients with persistent atrial fibrillation were higher than those with paroxysmal atrial fibrillation ($t/P=9.647/ <0.001, 2.584/0.012, 13.133/ <0.001, 3.559/ <0.001$). Comparison of serum TSH levels in patients with hyperthyroidism < coronary heart disease < healthy control group ($F/P=349.626/ <0.001$), and comparison of serum FT₃ and FT₄ levels in patients with hyperthyroidism > coronary heart disease > healthy control group ($F/P=472.196/ <0.001, 506.342/ <0.001$). Pearson correlation analysis showed that PRA was positively correlated with TSH, while AT II and ACE were negatively correlated with TSH ($r=0.769, -0.792, -0.803, P<0.001$); ACE was positively correlated with FT₃ and FT₄ ($r=0.718, 0.680, P<0.001$); PRA, ACE, AT II were positively correlated with LAD ($r=0.795, 0.790, 0.751, P<0.001$); Logistic regression analysis showed that low TSH, high FT₃, high FT₄, high PRA, high ACE, and high AT II were risk factors for atrial fibrillation in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism [$OR(95\% CI)=9.080 (1.694 \text{ to } 48.671), 10.103 (1.582 \text{ to } 64.519), 10.200 (1.805 \text{ to } 57.643), 12.730 (1.947 \text{ to } 83.226), 15.123 (3.684 \text{ to } 62.081), 9.667 (1.032 \text{ to } 90.557)$]. **Conclusion** The levels of PRA, ACE, AT II, and LAD in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism are abnormally elevated, and are closely related to atrial fibrillation. The activity of the renin angiotensin system is associated with TSH, FT₃, FT₄, and LAD, and are all independent risk factors for atrial fibrillation in patients with coronary heart disease and hyperthyroidism.

[Key words] Coronary artery disease; Hyperthyroidism; Atrial fibrillation; Renin-angiotensin system

心房颤动(房颤)是临床常见心脏系统疾病,是心力衰竭、卒中、心血管死亡的重要影响因素,如何有效控制、预防房颤仍为目前临床亟待解决的重要难题。房颤的发生机制及危险因素复杂,现阶段已有研究证实,房颤患病率与高血压、甲状腺功能异常、冠心病、心瓣膜疾病等有密切关系^[1-3]。其中甲状腺功能异常引发的甲状腺功能亢进(甲亢)可增强血管紧张素转换酶(ACE)水平,激活肾素-血管紧张素系统,可能与冠心病患者房颤发生存在关系^[4]。左心房结构重构、心房功能不可逆改变是房颤发生的病理基础,为明确肾素-血管紧张素系统活性对冠心病合并甲亢患者并发房颤的影响,本研究进一步分析其与促甲状腺激素

(TSH)、血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、血清游离甲状腺素(FT₄)、左心房内径(LAD)的关系,旨在为临床防治房颤提供新思路,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 4 月—2022 年 7 月山西省心血管病医院心内科收治的冠心病患者 75 例为冠心病组,冠心病合并甲亢患者 75 例为合并甲亢组,同期健康体检者 75 例为健康对照组,3 组人员基线资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经医院伦理委员会批准(SXZZ202208056),受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

表 1 3 组受试者临床资料比较
Tab. 1 Clinical Data Comparison of Three Groups of Subjects

项 目	健康对照组($n=75$)	冠心病组($n=75$)	合并甲亢组($n=75$)	F/χ^2 值	P 值
男/女(例)	40/35	42/33	37/38	0.678	0.713
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	62.32 $\pm$ 6.19	60.96 $\pm$ 5.84	63.14 $\pm$ 7.26	2.180	0.115
体质量指数($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	25.67 $\pm$ 1.89	25.21 $\pm$ 2.13	25.09 $\pm$ 1.96	1.765	0.174
冠心病病程($\bar{x}\pm s$,年)		3.58 $\pm$ 1.04	3.72 $\pm$ 1.26	0.742	0.459
基础疾病[例(%)]	瓣膜病	25(33.33)	28(37.33)	0.263	0.608
	高血压	0	36(48.00)	0.427	0.514
	心肌病	0	18(24.00)	0.312	0.577
	糖尿病	0	24(32.00)	0.256	0.593
既往冠心病手术治疗史[例(%)]	0	29(38.67)	34(45.33)	0.684	0.408
家族遗传史[例(%)]	0	21(28.00)	24(32.00)	0.286	0.593
吸烟史[例(%)]	22(29.33)	23(30.67)	27(36.00)	0.858	0.651
饮酒史[例(%)]	27(36.00)	35(46.67)	39(52.00)	4.024	0.134

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①符合“心房颤动:目前的认识和治疗的建议-2018”中的标准^[5];②房颤时心电图:P 波消失,f 波代之,频率 350 ~ 600 次/min,R-R 间期不匀齐;③NYHA 心功能 I ~ III 级;④左心室射血分数 >40%;⑤阵发性房颤:房颤发作持续时间 ≤7 d (常 <2 d),持续性房颤:发作持续时间 >7 d 且 <1 年,不可自行转复。(2)排除标准:①LAD >60 mm;②可逆性病因所致房颤;③曾接受起搏器植入术治疗;④近 6 个月有急性心肌梗死、急性脑血管病史;⑤存在重要脏器病变、难以控制的高血压病;⑥伴有活动性出血、其他恶性心律失常;⑦存在免疫系统、血液系统疾病;⑧精神异常。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 肾素—血管紧张素系统活性相关因子及 LAD 检测:患者入院后 1 h、健康体检者体检当日采集静脉血 4 ml,采用放射免疫法检测血浆肾素(PRA)活性,采用酶联免疫法检测 ACE 水平,化学发光法检测血管紧张素 II(AT II),以心脏超声长轴 M 型切面测量 LAD。

1.3.2 甲状腺功能指标检测:患者于入院第 2 天、健康体检者于体检当日采集清晨外周空腹静脉血 4 ml,离心取血清,以化学发光法检测 TSH、FT₃、FT₄ 水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;Pearson 分析肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功

能、左心房重构的相关性;Logistic 回归分析冠心病合并甲亢患者并发房颤的影响因素。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组肾素—血管紧张素系统活性及 LAD 水平比较 PRA、ACE、AT II、LAD 水平比较,合并甲亢组 > 冠心病组 > 健康对照组(P 均 <0.05);冠心病组、合并甲亢组有房颤患者上述指标高于无房颤患者($P < 0.05$);合并甲亢组有房颤患者上述指标高于冠心病组有房颤患者($P < 0.05$);合并甲亢组无房颤患者上述指标高于冠心病组无房颤患者($P < 0.05$),见表 2。

2.2 不同类型房颤患者肾素—血管紧张素系统活性及 LAD 水平比较 持续性房颤患者 PRA、ACE、AT II、LAD 水平高于阵发性房颤患者(P 均 <0.05),见表 3。

2.3 3 组甲状腺功能指标比较 3 组血清 TSH 水平比较,合并甲亢组 < 冠心病组 < 健康对照组,3 组血清 FT₃、FT₄ 水平比较,合并甲亢组 > 冠心病组 > 健康对照组(P 均 <0.01),见表 4。

2.4 肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功能指标的相关性 Pearson 相关性分析显示,PRA 与 TSH 呈正相关($P < 0.01$),AT II、ACE 与 TSH 呈负相关(P 均 <0.01);ACE 与 FT₃、FT₄ 呈正相关(P 均 <0.01);PRA、AT II 与 FT₃、FT₄ 均无相关性(P 均 >0.05),见表 5。

2.5 肾素—血管紧张素系统活性与左心房结构重构的相关性 PRA、ACE、AT II 与 LAD 均呈正相关($r = 0.795、0.790、0.751, P$ 均 <0.001)。

表 2 3 组肾素—血管紧张素系统活性及 LAD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of Renin Angiotensin System Activity and LAD Levels in Three Groups

组 别	例数	PRA($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ACE($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	AT II (ng/L)	LAD(mm)
健康对照组	75	0.67 ± 0.22	30.97 ± 7.83	56.44 ± 18.72	29.16 ± 3.59
冠心病组	75	1.64 ± 0.71 ^a	50.22 ± 16.44 ^a	113.91 ± 24.59 ^a	37.05 ± 4.68 ^a
房颤	41	2.30 ± 0.77 ^c	59.84 ± 13.26 ^c	157.30 ± 49.76 ^c	41.83 ± 4.25 ^c
无房颤	34	0.84 ± 0.25	38.62 ± 9.17	61.59 ± 20.33	31.28 ± 3.76
合并甲亢组	75	1.85 ± 0.60 ^{ab}	53.27 ± 13.38 ^{ab}	120.91 ± 22.01 ^{ab}	37.82 ± 6.93 ^{ab}
房颤	30	2.89 ± 0.95 ^{bc}	67.47 ± 16.99 ^{bc}	182.43 ± 60.12 ^{bc}	44.95 ± 5.02 ^{bc}
无房颤	45	1.15 ± 0.28 ^b	43.80 ± 10.54 ^b	79.90 ± 17.59 ^b	33.07 ± 3.11 ^b

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与冠心病组比较,^b $P < 0.05$;与本组无房颤患者比较,^c $P < 0.05$ 。

表 3 不同类型房颤患者肾素—血管紧张素系统活性及 LAD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of Renin Angiotensin System Activity and LAD Levels in Patients with Different Types of Atrial Fibrillation

组 别	例数	PRA($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ACE($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	AT II (ng/L)	LAD(mm)
阵发性房颤	43	1.89 ± 0.55	58.44 ± 17.39	107.53 ± 33.67	38.99 ± 10.40
持续性房颤	28	3.56 ± 0.91	70.16 ± 20.52	260.66 ± 64.25	49.54 ± 14.58
<i>t</i> 值		9.647	2.584	13.133	3.559
<i>P</i> 值		<0.001	0.012	<0.001	<0.001

表 4 3 组甲状腺功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of Thyroid Function Indexes in Three Groups

组 别	例数	TSH(mIU/L)	FT ₃ (pmol/L)	FT ₄ (pmol/L)
健康对照组	75	1.33 ± 0.41	2.06 ± 0.19	8.35 ± 2.42
冠心病组	75	0.96 ± 0.28 ^a	9.83 ± 3.04 ^a	13.62 ± 4.11 ^a
合并甲亢组	75	0.12 ± 0.03 ^{ab}	29.56 ± 9.30 ^{ab}	58.22 ± 17.63 ^{ab}
F 值		349.626	472.196	506.342
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与冠心病组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 5 肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功能指标的相关性

Tab. 5 Correlation Analysis between Renin Angiotensin System Activity and Thyroid Function Indexes

指 标	TSH		FT ₃		FT ₄	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
PRA	0.769	<0.001	0.085	>0.05	0.201	>0.05
AT II	-0.792	<0.001	0.021	>0.05	-0.076	>0.05
ACE	-0.803	<0.001	0.718	<0.001	0.680	<0.001

2.6 冠心病合并甲亢患者并发房颤的多因素 Logistic 回归分析 以冠心病合并甲亢患者是否并发房颤情况为因变量(否 = 0,是 = 1),纳入 TSH、FT₃、FT₄、PRA、ACE、AT II 作为自变量,结果显示,TSH 低、FT₃ 高、FT₄ 高、PRA 高、ACE 高、AT II 高均为冠心病合并甲亢患者并发房颤的独立危险因素($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 冠心病合并甲亢患者并发房颤的多因素 Logistic 回归分析

Tab. 6 Multivariate Logistic Regression Analysis of Atrial Fibrillation in Patients with Coronary Heart Disease and Hyperthyroidism

影响因素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
TSH 低	2.206	0.722	9.336	<0.001	9.080	1.694 ~ 48.671
FT ₃ 高	2.313	0.683	11.456	<0.001	10.103	1.582 ~ 64.519
FT ₄ 高	2.322	0.781	8.843	<0.001	10.200	1.805 ~ 57.643
PRA 高	2.544	0.821	9.601	0.009	12.730	1.947 ~ 83.226
ACE 高	2.716	0.790	11.822	<0.001	15.123	3.684 ~ 62.081
AT II 高	2.269	0.716	10.040	<0.001	9.667	1.032 ~ 90.557

3 讨 论

研究显示,甲亢患者中有 9% ~ 22% 合并房颤,且约 13% 房颤患者伴有甲状腺功能异常^[6]。本研究各组肾素—血管紧张素系统活性及 LAD 存在差异,且有无房颤对其有明显影响,均说明合并甲亢的房颤患者 ACE 活性增加,肾素—血管紧张素系统活性过度激活,AT II 高表达,引发左心房结构重构^[7]。左心房结构重构主要是因钙离子通道能力减弱,心房肌张力降低,心房扩大激活肾素—血管紧张素系统,增加 TGF- β_1 /Smad 信号通路中细胞调节因子的表达,促使心房

肌纤维增生,进而增加心房电活动,可能引发房颤^[8-9]。持续性房颤患者 PRA、ACE、AT II、LAD 较高,可能因甲状腺素一方面增强交感神经活性,另一方面促进水、钠排泄,增加 AT II、PRA 等表达^[10]。而 LAD 增大使心脏迷走神经与交感神经张力失衡,迷走神经下降而交感神经增高导致心率变异性减低,可影响自主神经系统对窦房结的调节作用,反映自主神经调节损伤情况^[11-12]。

肾素—血管紧张素系统与包括房颤在内的多种心血管疾病普遍相关^[13-14]。郑甲林等^[15]研究证实,高甲状腺素导致房颤过程中肾素—血管紧张素系统被激活,可介导心血管效应,引发左心房心肌细胞凋亡。同时,甲亢多重机制参与房颤的发生过程,其病理机制复杂,故冠心病合并甲亢患者并发房颤与肾素—血管紧张素系统的相关性可能缺乏特异性^[16]。本研究显示肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功能指标存在相关性,一方面可能是 TSH 过度激活肾素—血管紧张素系统,循环、组织 AT II 表达增高,AT II 诱导心房肌细胞凋亡,间接作用于心房,引发左心房电—解剖重构;且 TSH 直接作用于心肌细胞 K⁺、Na⁺ 等离子通道电流,直接影响心律^[17]。另一方面可能与甲状腺激素升高改变蛋白分解酶浓度有关,促使细胞大量表达可溶性循环 ACE。PRA 可反映继发性血压升高,AT II 在重构调节、血流动力学、细胞生长等方面具有一定作用,可通过调节冠状动脉血流、增强醛固酮生物活性,刺激平滑肌细胞的增殖并诱导血管纤维化;而 ACE 可发挥催化作用,促使 AT I 向 AT II 转化,与冠状动脉血管重构有关^[18-19]。本研究进一步 Logistic 回归分析结果显示,肾素—血管紧张素系统活性及甲状腺功能指标与冠心病合并甲亢患者并发房颤有关,对冠心病合并甲亢患者并发房颤的防治具有积极意义。

综上所述,冠心病合并甲亢患者肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功能相关,冠心病合并甲亢患者并发房颤患者 PRA、ACE、AT II、LAD 水平异常升高,且肾素—血管紧张素系统活性与甲状腺功能均为冠心病合并甲亢患者并发房颤的影响因素。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

孙兑荣:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;孙宇飞:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;李君:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;张宏伟:进行统计学分析,课题设计,论文撰写

参考文献

[1] Liang F, Wang Y. Coronary heart disease and atrial fibrillation: A vicious cycle[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021, 320(1): H1-

- H12. DOI:10.1152/ajpheart.00702.2020.
- [2] Shu Z, Chen M, Wang Q, et al. High-normal thyroid function and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation: A prospective observational study[J]. *Cardiology*, 2021, 146(5): 607-615. DOI: 10.1159/000517092.
 - [3] 胡静, 王业焕. 肾素-血管紧张素系统与急性心肌梗死 PCI 术预后的关系[J]. *中国医师杂志*, 2022, 24(3): 452-455. DOI: 10.3760/cma.j.cn431274-20210205-00178.
 - Hu J, Wang YH. Association between the renin-angiotensin system and the outcome of PCI for acute myocardial infarction[J]. *The Chinese Physician Journal*, 2022, 24(3): 452-455. DOI: 10.3760/cma.j.cn431274-20210205-00178.
 - [4] Marouli E, Kus A, Del Greco MF, et al. Thyroid function affects the risk of stroke via atrial fibrillation: A Mendelian randomization study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(8): 2634-2641. DOI: 10.1210/clinem/dgaa239.
 - [5] 中华医学会心电生理和起搏分会, 中国医师协会心律学专业委员会. 心房颤动: 目前的认识和治疗的建议-2018[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2018, 32(4): 315-368. DOI: 10.13333/j.cnki.cjcpe.2018.04.001.
 - Heart Electrophysiology and Pacing Branch of Chinese Medical Association, Heart Rhythmology Professional Committee of Chinese Medical Doctor Association. Atrial fibrillation: Current recognition and treatment recommendations-2018[J]. *The Chinese Journal of Heart Pacing and Heart Electrophysiology*, 2018, 32(4): 315-368. DOI: 10.13333/j.cnki.cjcpe.2018.04.001.
 - [6] Zubair Khan M, Gupta A, Hodge J, et al. Clinical outcomes of atrial fibrillation with hyperthyroidism[J]. *J Arrhythm*, 2021, 37(4): 942-948. DOI: 10.1002/joa3.12550.
 - [7] 王瑶, 陈桂英. 肾素-血管紧张素系统与心房颤动的研究进展[J]. *河北医药*, 2022, 44(2): 278-281, 288. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2022.02.032.
 - Wang Y, Chen GY. Progress in the renin-angiotensin system and atrial fibrillation[J]. *Hebei Medicine*, 2022, 44(2): 278-281, 288. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2022.02.032.
 - [8] Holzwirth E, Kornej J, Erbs S, et al. Myeloperoxidase in atrial fibrillation: Association with progression, origin and influence of renin-angiotensin system antagonists[J]. *Clin Res Cardiol*, 2020, 109(3): 324-330. DOI: 10.1007/s00392-019-01512-z.
 - [9] Qiu D, Peng L, Ghista DN, et al. Left atrial remodeling mechanisms associated with atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Eng Technol*, 2021, 12(3): 361-372. DOI: 10.1007/s13239-021-00527-w.
 - [10] 向玉萍, 曾玲, 罗天会, 等. 甲状腺功能减退与房颤发生风险关系的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2020, 20(5): 556-561. DOI: 10.7507/1672-2531.201909003.
 - Xiang YP, Zeng L, Luo TH, et al. Meta-analysis of the relationship between hypothyroidism and the risk of atrial fibrillation[J]. *Chinese Journal of Evidence-based Medicine*, 2020, 20(5): 556-561. DOI: 10.7507/1672-2531.201909003.
 - [11] 范佳丽, 蒋伟, 郑强荪, 等. 原发性高血压患者中估算肾小球滤过率水平及左心房直径与心房颤动的相关性分析[J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2020.01.001.
 - Fan JL, Jiang W, Zheng QS, et al. Correlation analysis of the estimated glomerular filtration rate level and left atrial diameter with atrial fibrillation in patients with essential hypertension[J]. *The Chinese Cardiovascular Disease Study*, 2020, 18(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2020.01.001.
 - [12] Krittayaphong R, Winijkul A, Sairat P. Left atrial diameter in the prediction of thromboembolic event and death in atrial fibrillation[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(7): 1838. DOI: 10.3390/jcm11071838.
 - [13] 石晶晶, 石树青, 胡元会, 等. 肾素-血管紧张素系统与心房颤动关系研究的可视化分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(5): 566-571. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2020.05.16.
 - Shi JJ, Shi SQ, Hu YH, et al. Visualized analysis of the relationship between the renin-angiotensin system and atrial fibrillation[J]. *Chinese Journal of Evidence-based Cardiovascular Medicine*, 2020, 12(5): 566-571. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2020.05.16.
 - [14] Moutzouri E, Lyko C, Feller M, et al. Subclinical thyroid function and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation[J]. *Eur J Endocrinol*, 2021, 185(3): 375-385. DOI: 10.1530/EJE-20-1442. PMID: 34228632.
 - [15] 郑甲林, 张新金, 郭涛, 等. 甲亢源性心房颤动与肾素-血管紧张素系统相关发病机制的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(2): 228-232. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.02.007.
 - Zheng JL, Zhang XJ, Guo T, et al. The pathogenesis of methylogenic atrial fibrillation associated with the renin-angiotensin system[J]. *Modern Biomedical Advances*, 2021, 21(2): 228-232. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.02.007.
 - [16] Aguilar M, Rose RA, Takawale A, et al. New aspects of endocrine control of atrial fibrillation and possibilities for clinical translation[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(7): 1645-1661. DOI: 10.1093/cvr/cvab080.
 - [17] Li SN, Zhang JR, Zhou L, et al. Sacubitril/valsartan decreases atrial fibrillation susceptibility by inhibiting angiotensin II-induced atrial fibrosis through p-Smad2/3, p-JNK, and p-p38 signaling pathways[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(1): 131-142. DOI: 10.1007/s12265-021-10137-5.
 - [18] 乔岩, 王悦, 李松南, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂对冠心病合并非瓣膜性心房颤动患者临床结局的影响[J]. *中国医药*, 2021, 16(12): 1769-1773. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2021.12.003.
 - Qiao Y, Wang Y, Li SN, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor antagonists on clinical outcomes in CAD patients with non-valvular atrial fibrillation[J]. *Chinese Pharmacology*, 2021, 16(12): 1769-1773. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2021.12.003.
 - [19] Zimmermann T, Walter JE, Lopez-Ayala P, et al. Influence of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on plasma levels of angiotensin-converting enzyme 2[J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(2): 1717-1721. DOI: 10.1002/ehf2.13249.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 005

心血管疾病专题

依洛尤单抗联合常规他汀与单纯他汀强化对急性冠脉综合征患者疗效及对血清 HMGB1、SAA1、CCL19 表达的影响

刘天骄, 张欣, 王晓菲, 张田田, 张俊峰

基金项目: 上海市第九医院临床研究助力计划(JYLJ202014)

作者单位: 200011 上海市第九人民医院北部心内科

通信作者: 张俊峰, E-mail: zhangjunfeng@163. com

【摘要】目的 观察依洛尤单抗联合常规他汀与单纯他汀强化对急性冠脉综合征(ACS)患者疗效及对血清高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、淀粉样蛋白 A1(SAA1)、CC 趋化因子 19(CCL19)表达的影响。方法 选择 2021 年 1 月—2022 年 1 月上海市第九人民医院北部心内科收治的 ACS 患者 92 例,按照随机数字表法分为对照组 46 例和联合组 46 例。对照组采用单纯他汀强化治疗,联合组采用依洛尤单抗联合常规他汀治疗。比较 2 组疗效及不良反应发生率,治疗前后血清 HMGB1、SAA1、CCL19、血脂水平。结果 治疗 6 个月后,联合组治疗总有效率高于对照组(93.48% vs. 78.26%, $\chi^2/P=4.389/0.036$);治疗 6 个月后 2 组血清 HMGB1、SAA1、CCL19 水平均低于治疗前,且联合组低于对照组($t/P=6.252/ <0.001$, $6.225/ <0.001$, $4.740/ <0.001$);治疗 6 个月后 2 组血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均低于治疗前,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)高于治疗前,且联合组降低/升高幅度大于对照组($t/P=10.281/ <0.001$, $7.619/ <0.001$, $4.740/ <0.001$, $2.801/0.040$);联合组不良反应发生率低于对照组($\chi^2/P=4.246/0.039$)。结论 依洛尤单抗联合常规他汀对 ACS 患者的疗效优于单纯他汀强化,可有效降低血脂,减轻炎症反应,降低血清 HMGB1、SAA1、CCL19 表达水平,安全性高。

【关键词】 急性冠脉综合征;依洛尤单抗;阿托伐他汀;高迁移率族蛋白 B1;淀粉样蛋白 A1;CC 趋化因子 19

【中图分类号】 R541.1

【文献标识码】 A

Effect of combination of elosumab and conventional statin versus statin alone on the expression of serum HMGB1, SAA1, and CCL19 in patients with acute coronary syndrome Liu Tianjiao, Zhang Xin, Wang Xiaofei, Zhang Tian-tian, Zhang Junfeng. Department of Cardiology, the Ninth People's Hospital, Shanghai 200011, China

Corresponding author: Zhang Junfeng, E-mail: zhangjunfeng@163. com

Funding program: Clinical Research Assistance Program of Shanghai Ninth Hospital (JYLJ202014)

【Abstract】Objective To observe the efficacy of elosumab combined with conventional statins and simple statin fortification in patients with acute coronary syndrome (ACS) and the effect on the expression of high mobility group protein B1 (HMGB1), amyloid protein A1 (SAA1), and CC chemokine 19 (CCL19) in serum. Methods From January 2021 to January 2022, 92 patients with ACS admitted to the Department of Cardiology in the North of Shanghai Ninth People's Hospital were randomly divided into a control group of 46 patients and a combined group of 46 patients. The control group was treated with simple statin intensive therapy, while the combined group was treated with elosumab combined with conventional statin therapy. Compare the efficacy and adverse reaction rates of the two groups, as well as the serum levels of HMGB1, SAA1, CCL19, and blood lipids before and after treatment. Results After 6 months of treatment, the total effective rate of the combination group was higher than that of the control group (93.48% vs. 78.26%, $\chi^2/P=4.389/0.036$); after 6 months of treatment, the serum levels of HMGB1, SAA1, and CCL19 in both groups were lower than before treatment, and the combination group was lower than the control group ($t/P=6.252/ <0.001$, $6.225/ <0.001$, $4.740/ <0.001$); after 6 months of treatment, the serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in both groups were lower than before treatment, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was higher than before treatment, and the reduction/increase amplitude of the combination group was greater than that of the control group ($t/P=10.281/ <0.001$,

7.619/ <0.001 , 4.740/ <0.001 , 2.801/0.040); the incidence of adverse reactions in the combination group was lower than that in the control group ($\chi^2/P=4.246/0.039$). **Conclusion** The efficacy of elosumab combined with conventional statins in patients with ACS is superior to that of simple statin fortification. It can effectively reduce blood lipids, alleviate inflammatory reactions, and reduce the expression levels of serum HMGB1, SAA1, and CCL19, with high safety.

【Key words】 Acute coronary syndrome; Elosumab; Atorvastatin; High mobility group protein B1; Amyloid A1; CC chemokine 19

多数急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是冠状动脉粥样硬化斑块不稳定的结果^[1]。低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 升高是启动、促进粥样硬化进程导致 ACS 致病的关键因素^[2]。ACS 患者可使用他汀类药物强化治疗,但在一定程度上会升高前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin kexin type 9, PCSK9) 水平,疗效有限^[3]。PCSK9 抑制剂属新型调脂药物,可强效、快速降低血脂水平和心血管事件发生风险^[4]。依洛尤单抗属 PCSK9 抑制剂,联合他汀类药物可进一步改善血脂及预后,疗效良好,安全性高^[5-6]。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 参与诸多免疫应答;淀粉样蛋白 A (amyloid A, SAA) 具有促炎作用,慢性炎症反应可促进粥样硬化形成;CC 趋化因子 19 (CC chemokine 19, CCL19) 水平可反映冠状动脉损伤严重程度,而炎症反应在斑块形成中发挥重要作用,在 ACS 病变进展中起主导作用^[7-8]。因此,本研究旨在观察依洛尤单抗联合常规他汀与单纯他汀强化对 ACS 患者疗效及对血清 HMGB1、SAA1、CCL19 表达的影响,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2021 年 1 月—2022 年 1 月上海市第九人民医院北部心内科收治的 ACS 患者 92 例,按照随机数字表法分为联合组和对照组,各 46 例。联合组男 26 例,女 20 例,年龄 50~75 (59.68 $\pm$ 5.33) 岁;体质量指数 18~26 (21.36 $\pm$ 1.52) kg/m²;病程 1~11 (4.57 $\pm$ 1.24) d;高血压 26 例,糖尿病 21 例,高血脂 30 例;有吸烟史 24 例,饮酒史 26 例;不稳定型心绞痛 13 例,非 ST 段抬高型心绞痛 15 例,ST 段抬高型心绞痛 18 例;Killip 分级 $\geq$ II 级 7 例。对照组男 28 例,女 18 例,年龄 50~75 (59.61 $\pm$ 5.35) 岁;体质量指数 18~26 (21.43 $\pm$ 1.54) kg/m²;病程 1~11 (4.52 $\pm$ 1.22) d;高血压 24 例,糖尿病 23 例,高血脂 27 例;有吸烟史 25 例,饮酒史 23 例;不稳定型心绞痛 11 例,非 ST 段抬高型心绞痛 16 例,ST 段抬高型心绞痛 19 例;Killip 分级 $\geq$ II 级 6 例。2 组基本资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会

批准 (SH9H-2020-T340-2),患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 诊断标准:符合“急性冠脉综合征急诊快速诊治指南 (2019)”^[9]中 ACS 的诊断标准,症状有持续性胸痛无缓解、闷痛、出汗、心悸、心律失常等,心电图检查显示 ST 段抬高或压低、T 波低水平或倒置、伴或不伴病理性 Q 波;心肌肌钙蛋白 I/T、D-二聚体、肌酸激酶同工酶异常增高。(2) 纳入标准:①入院前未使用 PCSK9 抑制剂;②无先天性心脏病、恶性肿瘤;③对依洛尤单抗、阿托伐他汀不过敏。(3) 排除标准:①具有器官移植史;②严重肝肾功能不全,存在自身免疫性疾病者;③近 3 个月内有严重恶性心律失常者;④已参与其他研究和依从性较差者。

1.3 治疗方法 2 组患者均予阿司匹林抗血小板、倍他乐克 (酒石酸美托洛尔) 控制血压、 β 受体阻滞剂抗心肌缺血、降糖药控制血糖、氧气吸入等对症治疗。对照组另予单纯他汀强化治疗,阿托伐他汀钙片 (北京百奥药业有限责任公司) 40 mg,晚饭后口服,每天 1 次。联合组另予依洛尤单抗联合常规他汀治疗,阿托伐他汀钙片 20 mg,晚饭后口服,每天 1 次,依洛尤单抗注射液 [Amgen Manufacturing Limited (AML) 公司] 140 mg 于腹部或下肢皮下注射,每 2 周注射 1 次。2 组患者均连续治疗 6 个月。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 血清 HMGB1、SAA1、CCL19 检测:于治疗前和治疗 6 个月后取患者空腹静静脉血 5 ml,离心留取上清,采用上海臻科生物公司人 HMGB1 ELISA 试剂盒、人 SAA1 ELISA 试剂盒及上海初态生物公司人 CCL19 ELISA 试剂盒检测血清 HMGB1、SAA1、CCL19,严格按照试剂盒说明书步骤操作。

1.4.2 血清血脂水平检测:于治疗前和治疗 6 个月后采集患者肘静脉血 5 ml,离心后取上清,采用博科全自动生化分析仪 BK-1200 及配套试剂检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。

1.4.3 记录不良反应:如肌肉疼痛、恶心乏力、头痛,检测患者丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 有无升高等。

1.5 临床疗效判定标准 治疗 6 个月后参照文献 [10] 对疗效进行判断。显效: 患者治疗后症状消失, 心功能改善 2 级以上, 心肌酶指标正常; 有效: 症状减轻好转, 心功能改善 1 级以上; 无效: 症状无改善, 心功能无变化, 甚至加重。总有效率 = (显效 + 有效) / 总例数 × 100%。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件统计分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以频数或率 (%) 描述, 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 组临床疗效比较 治疗 6 个月后, 联合组治疗总有效率为 93.48%, 高于对照组的 78.26% ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 对照组与联合组临床疗效比较 [例(%)]

Tab.1 Comparison of clinical efficacy between the control group and the combination group

组 别	例数	显效	有效	无效	总有效率 (%)
对照组	46	12 (26.09)	24 (52.17)	10 (21.74)	78.26
联合组	46	18 (39.13)	25 (54.35)	3 (6.52)	93.48
U/χ^2 值		$U = 1.968$		$\chi^2 = 4.389$	
P 值		0.049		0.036	

2.2 2 组治疗前后血清 HMGB1、SAA1、CCL19 水平比较 治疗 6 个月后, 2 组血清 HMGB1、SAA1、CCL19 水平均低于治疗前, 且联合组低于对照组 (P 均 < 0.01), 见表 2。

2.3 2 组治疗前后血清血脂水平比较 治疗 6 个月
后, 2 组血清 TC、TG、LDL-C 水平均低于治疗前,

表 3 对照组与联合组治疗前后血清血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab.3 Comparison of Serum Lipid Levels between the Control Group and the Combination Group before and after Treatment

组 别	时间	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照组 ($n = 46$)	治疗前	5.28 ± 1.41	1.65 ± 0.40	2.85 ± 1.06	1.06 ± 0.41
	治疗后	3.74 ± 0.84	1.32 ± 0.14	1.43 ± 0.62	1.25 ± 0.43
联合组 ($n = 46$)	治疗前	5.26 ± 1.43	1.63 ± 0.42	2.87 ± 1.02	1.08 ± 0.43
	治疗后	2.13 ± 0.65	1.12 ± 0.11	1.15 ± 0.52	1.45 ± 0.49
t/P 对照组内值		6.364/ <0.001	5.281/ <0.001	7.843/ <0.001	2.169/ <0.001
t/P 联合组内值		13.515/ <0.001	7.967/ <0.001	10.189/ <0.001	3.433/ <0.001
t/P 治疗后组间值		10.281/ <0.001	7.619/ <0.001	4.740/ <0.001	2.801/ 0.040

表 4 对照组与联合组不良反应发生率比较 [例(%)]

Tab.4 Comparison of Adverse Reaction Incidence between the Control Group and the Combination Group

组 别	例数	转氨酶升高	肌肉疼痛	恶心乏力	头痛	总发生率 (%)
对照组	46	8 (17.39)	4 (8.70)	4 (8.70)	2 (4.35)	39.13
联合组	46	4 (8.70)	1 (2.17)	2 (4.35)	2 (4.35)	19.57

表 2 对照组与联合组治疗前后血清 HMGB1、SAA1、CCL19 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of Serum HMGB1, SAA1, and CCL19 Levels between the Control Group and the Combined Group before and after Treatment

组 别	时间	HMGB1 (mg/L)	SAA1 (μg/L)	CCL19 (ng/L)
对照组 ($n = 46$)	治疗前	9.53 ± 2.61	352.66 ± 65.94	83.68 ± 15.03
	治疗后	5.06 ± 1.14	268.64 ± 45.78	71.68 ± 9.67
联合组 ($n = 46$)	治疗前	9.45 ± 2.43	358.35 ± 67.31	83.43 ± 14.62
	治疗后	3.65 ± 1.02	211.36 ± 42.42	62.29 ± 9.33
t/P 对照组内值		10.645/ <0.001	7.099/ <0.001	4.554/ <0.001
t/P 联合组内值		14.927/ <0.001	12.530/ <0.001	8.267/ <0.001
t/P 治疗后组间值		6.252/ <0.001	6.225/ <0.001	4.740/ <0.001

HDL-C 水平高于治疗前, 且联合组降低/升高程度大于对照组 (P 均 < 0.01 或 0.05), 见表 3。

2.4 2 组不良反应发生率比较 联合组不良反应发生率为 19.57%, 显著低于对照组的 39.13% ($\chi^2 = 4.246, P = 0.039$), 见表 4。

3 讨 论

ACS 是冠状动脉在各种病变基础上突然发生狭窄、痉挛导致的心肌缺血一系列综合征, 目前全球每年约 700 多万人被诊断 ACS, 中老年多见, 但近年来 ACS 逐渐年轻化^[11]。ACS 患者可引起部分心肌缺血或者全部心肌缺血, 表现为胸痛、呼吸困难, 严重者会导致猝死, ACS 病死率呈整体上升趋势。研究显示^[12], LDL-C 控制在 1.4 mmol/L 内时 ACS 患者死亡风险明显降低, 因此对 ACS 的治疗建议尽早将 LDL-C 达到标准值。

既往研究表明^[13], 我国居民体质特殊, 使用中强度他汀药物为降脂基础治疗, 但不能实现 LDL-C 低于

1.4 mmol/L、降幅超过 50% 的双达标,需要进一步考虑联合治疗。2020 年中华医学会心血管病学分会专家指出,对于最大耐受剂量他汀药物及联合依折麦布治疗 ACS 患者 LDL-C 仍不达标的患者,应尽早联合 PCSK9 抑制剂治疗^[14]。他汀类药物可抑制胆固醇合成,PCSK9 抑制剂可提高肝脏清除胆固醇能力,2 种药物作用于胆固醇代谢过程首尾,联合应用治疗 ACS 能获得良好治疗效果^[15]。他汀类药物是一种全面调脂药,可抑制动脉粥样硬化、血栓形成、抗炎、抗氧化、调整血管内皮功能,促进血管新生,具有血管保护作用。赵殿儒等^[16]研究显示,他汀类药物具有诸多作用,能减缓动脉粥样斑块形成速度,大剂量他汀类药物可有效提高疗效,改善 ACS 患者症状,控制患者体内炎症因子,改善心功能。PCSK9 抑制剂依洛尤单抗在血脂异常、心血管疾病的治疗中作用良好,安全性高^[17]。何蓉等^[18]研究表明,依洛尤单抗可降低血脂和炎症反应水平,改善心功能,提高左心室射血分数,以上研究结果与本研究结果相似。本研究结果显示,依洛尤单抗联合阿托伐他汀应用患者治疗 6 个月后 LDL-C 低于 1.4 mmol/L,优于他汀强化治疗患者,他汀强化主要通过抑制体内胆固醇合成过程中的 HMG CoA 还原酶活性,阻断胆固醇合成,继而上调细胞表面 LDL 受体,加速血浆 LDL 分解代谢,降低胆固醇水平,在清除胆固醇途径中降低 LDL-C 水平。依洛尤单抗通过特异性阻断肝细胞内 PCSK9 的 mRNA 转录,降低 PCSK9 蛋白水平,抑制 PCSK9 与 LDL 受体结合,增加清除血液中 LDL 数目,从而促使 LDL-C 水平下降。施方园等^[19]研究提示,他汀强化 LDL-C 可降低 6%,但 LDL-C 达标率并未提高。国外研究显示^[20],依洛尤单抗每 2 周注射 1 次,LDL-C 降低 59%,国内研究显示^[21],对于每 2 周注射 1 次依洛尤单抗的 ACS 患者,降脂幅度可高达 80%。相对西方人群,我国居民对依洛尤单抗每 2 周注射 1 次敏感度更高,原因可能与地域差异、种族差异、饮食结构差异有关。Rodriguez 等^[22]研究表明,不同种族心血管疾病患者应用依洛尤单抗对 LDL-C 的降幅不同,但白人和非白人患者 LDL-C 至少降低 50%。本研究中,依洛尤单抗联合阿托伐他汀对 ACS 患者治疗 6 个月后,患者 LDL-C 降低幅度接近 60%,相对 FOURIER 研究中 LDL-C 降低幅度 67% 低,其原因可能是本研究治疗时间为 6 个月,而 FOURIER 研究中的治疗时间为 12 个月,与治疗时间有关^[23]。以上研究结果显示,依洛尤单抗联合常规他汀对 ACS 患者的疗效优于单纯他汀强化,与赵岩等^[24]研究结果一致。

炎症反应可通过增强脂质涌入、扩大脂质核心、刺激新血管生成诱发血栓形成,使不稳定斑块破裂,炎症因子在冠状动脉狭窄过程中产生并释放,进一步促进冠状动脉狭窄和进展,形成恶性循环^[25-26]。炎症反应是导致 ACS 发生和进展的原因,炎症性生物标志物是心血管疾病特异性指标,其中 HMGB1 是致炎因子,属高度保守核蛋白,主要存在于哺乳动物细胞中,大多数存在于细胞核,有 219 个氨基酸残基,分子质量 30 kDa,机体损伤后可诱导炎症反应,功能包括调节基因复制、重组、修复,在 ACS 发生、发展中扮演重要角色, HMGB1 可通过与细胞膜受体结合而促进炎症反应介质释放,增加 HMGB1 分泌,增强炎症反应,因此,ACS 患者血清中 HMGB1 呈高表达。江文科等^[27]研究表明,在 ACS 患者中血清 HMGB1 水平较高,其表达水平利于准确诊断 ACS。SAA1 是 SAA 主要前体,由肝细胞产生分泌到血清,炎症反应状态下其浓度会明显升高,促进动脉粥样硬化形成,增加脂质沉积,加速脂核形成,引起内皮细胞结构损伤,加重炎症反应,促进内皮细胞脱落及冠状动脉斑块形成。林先昌等^[28]研究显示,在 ACS 患者中血清 SAA1 水平明显高于正常人群,可作为 ACS 患者病情判断和预后指标。趋化因子是小分子分泌蛋白,受炎症因子诱导产生,能趋化免疫细胞,CCL19 是一种白细胞趋化剂,由活化 T 淋巴细胞、内皮细胞产生,主要趋化树突状细胞,激活 T 细胞参与人体体液免疫,在细胞运输、白细胞活化中起关键作用。树突状细胞可维持动脉内膜稳定,CCL19 可趋化树突状细胞在动脉壁聚集,参与血管不稳定斑块形成,调节 T 细胞和树突状细胞迁移^[29]。本研究结果提示,依洛尤单抗联合阿托伐他汀有助于降低 ACS 患者炎症反应,改善炎症因子水平。阿托伐他汀抑制炎症反应,可通过抑制钙超载,降低炎症因子水平,依洛尤单抗可有效调节血脂水平,减轻炎症反应。Stiekema 等^[30]研究提示,他汀类药物和依洛尤单抗能同时降低 LDL-C 水平和抑制炎症反应,与本研究结果相符。同时本研究结果还提示,依洛尤单抗联合常规他汀治疗 ACS 的安全性更高。研究显示^[31],随着他汀类药物剂量的升高,不良反应、抵抗性、耐受性也随之增加,患者肝功能异常、肌肉疼痛等不良反应发生率会明显升高。Hermel 等^[32]研究提示,依洛尤单抗应用于心血管疾病治疗中有良好的安全性,与本研究结果相符。但本研究样本量较小,研究时间相对较短,结论难免存在偏倚,有望更大样本量进一步深入研究。

综上所述,依洛尤单抗联合常规他汀有助于提高 ACS 患者疗效,降低患者血脂水平,减轻炎症反应,降

低患者血清中 HMGB1、SAA1、CCL19 表达水平,安全性高,值得临床推荐应用。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘天骄、张欣:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王晓菲:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;张田田:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;张俊峰:进行统计学分析

参考文献

- [1] 徐晓婷,张强,杨丽红,等.中性粒细胞与淋巴细胞比值联合全球急性冠状动脉事件注册研究评分与急性冠脉综合征患者预后的相关性分析[J].中国全科医学,2019,22(11):1302-1306. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2018.00.260.
- Xu XT,Zhang Q,Yang LH,et al. Correlation analysis between neutrophil to lymphocyte ratio combined with global acute coronary event registry score and prognosis of patients with acute coronary syndrome[J]. Chin General Med,2019,22(11):1302-1306. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2018.00.260.
- [2] 李拥军,马根山.后他汀时代,低水平 LDL-C 的临床获益与安全性:基于循证医学的思考[J].中华心血管病杂志,2021,49(6):548-553. DOI:10.3760/cma.j.cn112148-20201019-00824.
- Li YJ,Ma GS. Clinical benefits and safety of low level LDL-C in the post-statin era: thinking based on evidence-based medicine[J]. Chin J Cardiol,2021,49(6):548-553. DOI: 10.3760/cma.j.cn112148-20201019-00824.
- [3] 曾雨虹,刘静,刘军,等.超高危 ASCVD 患者的界定标准对住院 ACS 患者降脂治疗需求的影响[J].中华心血管病杂志,2020,48(12):1039-1046. DOI:10.3760/cma.j.cn112148-20200710-00549.
- Zeng YH,Liu J,Liu J,et al. The impact of the criteria for defining the high-risk ASCVD patients on the demand for lipid-lowering treatment of hospitalized ACS patients[J]. Chin J Cardiol,2020,48(12):1039-1046. DOI:10.3760/cma.j.cn112148-20200710-00549.
- [4] 陈文文,李振山,刘妍妍,等. PCSK9 抑制剂依洛尤单抗在降低心血管事件风险中的研究进展[J].中国医院药学杂志,2020,40(3):244-248. DOI:10.13286/j.1001-5213.2020.03.20.
- Chen WW,Li ZS,Liu YY,et al. Research progress of PCSK9 inhibitor ilozumab in reducing the risk of cardiovascular events[J]. Chin Hosp Pharm J,2020,40(3):244-248. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2020.03.20.
- [5] Usmani SZ,Hoering A,Ailawadhi S,et al. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone with or without elotuzumab in patients with untreated, high-risk multiple myeloma (SWOG-1211): primary analysis of a randomised, phase 2 trial[J]. Lancet Haematol,2021,8(1):45-54. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30354-9.
- [6] 高聿,马晓腾,王志坚,等.他汀类药物联合阿利西尤单抗对血脂不达标的冠心病患者冠状动脉斑块结构和稳定性的影响[J].中国医药,2021,16(11):1618-1621. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2021.11.005.
- Gao F,Ma XT,Wang ZJ,et al. The effect of statins combined with Ali-ciumab on the structure and stability of coronary artery plaque in patients with coronary heart disease whose blood lipids are not up to standard[J]. Chin Med,2021,16(11):1618-1621. DOI: 10.3760/

- j.issn.1673-4777.2021.11.005.
- [7] 孟萌,魏佳丽,潘红,等.血清 HMGB1,sTLT-1 水平对经皮冠状动脉介入治疗急性心肌梗死患者预后的影响[J].中国现代医学杂志,2019,29(24):38-43. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.24.007.
- Meng M,Wei JL,Pan H,et al. The effect of serum HMGB1 and sTLT-1 levels on the prognosis of patients with acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention[J]. Chin J Mod Med,2019,29(24):38-43. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.24.007.
- [8] 张绍君,李俊巧,张永刚,等.系统性红斑狼疮患者血清 PS-PLA1、CCL19 水平与疾病活动度及免疫功能的相关性分析[J].疑难病杂志,2020,19(11):1143-1146,1156. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.014.
- Zhang SJ,Li JQ,Zhang YG,et al. Correlation analysis of serum PS-PLA1 and CCL19 levels with disease activity and immune function in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Chin J Diffic and Compl Cas,2020,19(11):1143-1146,1156. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.11.014.
- [9] 张新超,于学忠,陈凤英,等.急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[J].临床急诊杂志,2019,39(4):301-310. DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2019.04.001.
- Zhang XC,Yu XZ,Chen FY,et al. Guidelines for emergency diagnosis and treatment of acute coronary syndrome (2019)[J]. J Clin Emer,2019,39(4):301-310. DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2019.04.001.
- [10] 汤宁成,杨巍,吴海义.瑞舒伐他汀联合替格瑞洛治疗急性冠脉综合征的疗效及对 YKL-40 GMP-140 的作用分析[J].河北医学,2019,25(12):2061-2064. DOI:10.3969/j.issn.1006-6233.2019.12.035.
- Tang NC,Yang W,Wu HY,et al. Analysis of the efficacy of rosuvastatin combined with tegrel in the treatment of acute coronary syndrome and its effect on YKL-40 GMP-140[J]. Hebei Med J,2019,25(12):2061-2064. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6233.2019.12.035.
- [11] Beska B,Wilkinson C,Coakley D,et al. Frailty and quality of life after invasive management for non-ST elevation acute coronary syndrome[J]. Heart,2022,108(3):203-211. DOI: 10.1136/heartjnl-2021-319064.
- [12] 许晓晗,柴萌,程宇婧,等.依洛尤单抗降低中国急性冠状动脉综合征患者低密度脂蛋白胆固醇水平的有效性与安全性研究[J].中国医药,2021,16(4):481-485. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.018.
- Xu XH,Chai M,Cheng YJ,et al. Study on the efficacy and safety of ilozumab in reducing low density lipoprotein cholesterol levels in Chinese patients with acute coronary syndrome[J]. Chin Med,2021,16(4):481-485. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.018.
- [13] 叶韬华,王慧勇,柏慧,等.阿利西尤单抗联用他汀类药物对急性冠脉综合征患者血脂水平的影响[J].中国医药科学,2021,11(10):1-6. DOI:10.3969/j.issn.2095-0616.2021.10.001.
- Ye TH,Wang HY,Bai H,et al. Effect of Aliciumab combined with statins on blood lipid level in patients with acute coronary syndrome[J]. Chin

- Med Sci, 2021, 11 (10) : 1-6. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-0616. 2021. 10. 001.
- [14] 中华医学会心血管病学分会动脉粥样硬化与冠心病学组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 超高危动脉粥样硬化性心血管疾病患者血脂管理中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48 (4) : 280-286. DOI: 10. 3760/cma. j. cn112148-20200121-00036. Atherosclerosis and Coronary Heart Disease Group, Cardiovascular Branch, Chinese Medical Association. Editorial Committee of Chinese Journal of Cardiovascular Diseases Chinese expert consensus on lipid management in patients with ultra-high risk atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Chin J Cardiol, 2020, 48 (4) : 280-286. DOI: 10. 3760/cma. j. cn112148-20200121-00036.
- [15] 王郁馨, 张志远. PCSK9 抑制剂依洛尤单抗注射液治疗他汀类药物不耐受的高脂血症患者临床观察[J]. 天津药学, 2020, 32 (4) : 23-25. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-5687. 2020. 04. 008. Wang YX, Zhang ZY. Clinical observation of PCSK9 inhibitor ilozumab injection in the treatment of hyperlipidemia patients with statin intolerance[J]. Tianjin Pharm, 2020, 32 (4) : 23-25. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-5687. 2020. 04. 008.
- [16] 赵殿儒, 贾媛媛, 马桂英, 等. 不同剂量瑞舒伐他汀对 ACS 患者 LP-PLA2 水平及心功能影响的临床研究[J]. 河北医药, 2019, 41 (6) : 863-866. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-7386. 2019. 06. 015.
- [17] Deedwania P, Murphy SA, Scheen A, et al. Efficacy and safety of PCSK9 inhibition with Evolocumab in reducing cardiovascular events in patients with metabolic syndrome receiving statin therapy: Secondary analysis from the FOURIER randomized clinical trial[J]. JAMA Cardiology, 2021, 6 (2) : 139-147. DOI: 10. 1001/jamcardio. 2020. 3151.
- [18] 何蓉, 南昊宇, 李怀娜. 心通颗粒联合依洛尤单抗辅助治疗慢性心力衰竭合并高脂血症的疗效及对机体炎症介质的影响[J]. 药物评价研究, 2022, 45 (8) : 1648-1654. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-7386. 2019. 06. 015.
- [19] 施方园, 崔翰斌. 依折麦布联合他汀与单纯他汀强化对冠心病高危/极高危患者的调脂疗效和不良反应的荟萃分析[J]. 临床心血管病杂志, 2019, 35 (11) : 983-991. DOI: 10. 13201/j. issn. 1001-1439. 2019. 11. 005.
- [20] Kasichayanula S, Grover A, Emery MG, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Evolocumab, a PCSK9 inhibitor[J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57 (7) : 769-779. DOI: 10. 1007/s40262-017-0620-7.
- [21] 南楠, 李相儒, 左惠娟, 等. 依洛尤单抗在冠心病患者中应用现状及其疗效单中心结果分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13 (1) : 68-73. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-4055. 2021. 01. 16.
- [22] Rodriguez CJ, Daviglus ML, Lopez J, et al. P6192 Effects of evolocumab on LDL-C by race and ethnicity: An analysis of double-blind and open-label extension studies[J]. Eur Heart J, 2019, 40 (1) : 16839. DOI: 10. 1093/eurheartj/eh2746. 0797.
- [23] Murphy SA, Pedersen TR, Gaciong ZA, et al. Effect of the PCSK9 inhibitor Evolocumab on total cardiovascular events in patients with cardiovascular disease: A prespecified analysis from the FOURIER trial[J]. JAMA Cardiol, 2019, 4 (7) : 613-619. DOI: 10. 1001/jamcardio. 2019. 0886.
- [24] 赵岩, 惠慧, 孙仕泽, 等. 依洛尤单抗联合他汀类药物对急性冠状动脉综合征患者降脂效果及预后的影响[J]. 中国医药, 2021, 16 (11) : 1622-1625. DOI: 10. 3760/j. issn. 1673-4777. 2021. 11. 006.
- [25] 张弛, 王丽岳, 任浩进, 等. 不同剂量阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者 HO-1/HbCO 系统、血清 sOX40L 水平影响及其与炎症因子的相关性分析[J]. 疑难病杂志, 2019, 18 (5) : 437-441. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 05. 002. Zhang C, Wang LY, Ren HJ, et al. Effect of different doses of atorvastatin on HO-1/HbCO system and plasma sOX40L level in patients with acute coronary syndrome and its correlation with inflammatory factors[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2019, 18 (5) : 437-441. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2019. 05. 002.
- [26] 王玉霞, 刘英华, 卢海英, 等. 急性冠状动脉综合征患者 PCI 术前血清 ICAM-1、ESM-1 水平与术后冠状动脉慢血流/无复流的相关性[J]. 疑难病杂志, 2022, 21 (2) : 124-129. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 02. 004. Wang YX, Liu YH, Lu HY, et al. Correlation between serum ICAM-1 and ESM-1 levels before PCI and postoperative coronary slow blood flow/no-reflow in patients with acute coronary syndrome[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2022, 21 (2) : 124-129. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2022. 02. 004.
- [27] 江文科, 程卓, 李锦良, 等. 急性冠脉综合征患者血清 HMGB1、cTnI、BNP、hs-CRP 表达及其诊断价值[J]. 海南医学, 2020, 31 (12) : 1530-1533. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-6350. 2020. 12. 011.
- [28] 林先昌, 卓剑, 蔡强文. 血清淀粉样蛋白 A1、脂蛋白结合指数预测急性冠脉综合征患者病情严重程度及预后的价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28 (4) : 651-655. DOI: 10. 11748/bjmy. issn. 1006-1703. 2021. 04. 026.
- [29] Munjal A, Khandia R. Atherosclerosis: Orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020, 120 (6) : 85-122. DOI: 10. 1016/bs. apcsb. 2019. 11. 002.
- [30] Stiekema L, Stroes E, Verweij SL, et al. Persistent arterial wall inflammation in patients with elevated lipoprotein (a) despite strong low-density lipoprotein cholesterol reduction by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibody treatment[J]. Eur Heart J, 2018, 40 (33) : 2775-2781. DOI: 10. 1093/eurheartj/ehy862.
- [31] 王均强, 董少华, 阿丽娜, 等. 依洛尤单抗联合他汀类药物对急性冠脉综合征患者高血脂的疗效与安全性评价[J]. 解放军医学院学报, 2022, 43 (1) : 6-10. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-5227. 2022. 01. 002.
- [32] Hermel M, Pelter M, Jordan T, et al. Highlights of cardiovascular disease prevention studies presented at the 2022 European Society of Cardiology Congress[J]. Curr Atheroscler Rep, 2022, 5 (8) : 1-13. DOI: 10. 1007/s11883-022-01072-0.

(收稿日期: 2022 - 12 - 05)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.006

心血管疾病专题

川崎病患儿血浆 YKL-40、CRP、IL-6 对急性期冠状动脉损伤的诊断价值

闵丽,袁时健,刘亚红,王晋,牛少敏,杨轶男,董湘玉

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA222)

作者单位: 730030 兰州大学第二医院儿科

通信作者: 董湘玉, E-mail: dxy0223@163.com

【摘要】目的 分析川崎病(KD)患儿血浆人软骨糖蛋白-39(YKL-40)、C反应蛋白(CRP)、白介素-6(IL-6)对冠状动脉损伤(CAL)的诊断价值。方法 选取2018年4月1日—2021年12月31日兰州大学第二医院儿科收治KD患儿125例为KD组,根据是否合并CAL再分为CAL亚组53例及NCAL亚组72例,另选择同期性别及年龄相匹配的健康体检儿童125例作为健康对照(HC)组及因消化道感染发热患儿125例作为发热对照(FC)组。收集各组临床资料,检测所有受试儿童血浆YKL-40、CRP、IL-6水平。多因素Logistic回归分析KD患儿发生CAL的危险因素,受试者工作特征曲线(ROC)分析血浆YKL-40、CRP、IL-6诊断KD患儿发生CAL的价值。结果 血浆YKL-40、CRP、IL-6水平比较,KD组>FC组>HC组($F/P=296.352/ <0.001, 35.162/ <0.001, 20.266/ <0.001$)。CAL亚组血浆YKL-40、CRP、IL-6水平高于NCAL亚组($t/P=7.434/ <0.001, 7.967/ <0.001, 7.444/ <0.001$);CAL亚组静注免疫球蛋白(IVIG)治疗前热程及IVIG无应答、IVIG开始时间 ≥ 10 d比例高于NCAL亚组[$t(\chi^2)/P=6.831/ <0.001, 8.304/ 0.004, 3.953/ 0.047$]。多因素Logistic回归分析显示,IVIG无应答、YKL-40高、CRP高、IL-6高是KD患儿发生CAL的危险因素[$OR(95\%CI)=4.627(2.072 \sim 10.336), 1.441(1.128 \sim 1.840), 1.540(1.106 \sim 2.145), 1.343(1.098 \sim 1.644)$]。ROC曲线分析显示,血浆YKL-40、CRP、IL-6及三者联合诊断KD患儿发生CAL的曲线下面积为0.813、0.846、0.821、0.923,三者联合诊断效能高于单独指标诊断($Z/P=2.965/ 0.012, 2.536/ 0.020, 2.308/ 0.025$)。结论 KD患儿血浆YKL-40、CRP、IL-6水平均增高,且与KD患儿并发CAL有关,联合三项指标在KD患儿发生CAL诊断中具有较高价值。

【关键词】 川崎病;急性期冠状动脉损伤;人软骨糖蛋白-39;C反应蛋白;白介素-6;诊断

【中图分类号】 R725.4

【文献标识码】 A

Diagnostic value of plasma YKL-40, CRP, IL-6 in acute coronary artery injury in children with Kawasaki disease

Min Li, Yuan Shijian, Liu Yahong, Wang Jin, Niu Shaomin, Yang Yinan, Dong Xiangyu. Department of Pediatrics, Lanzhou University Second Hospital, Gansu Province, Lanzhou 730030, China

Corresponding author: Dong Xiangyu, E-mail: dxy0223@163.com

Funding program: Natural Science Foundation of Gansu Province (17JR5RA222)

【Abstract】 Objective To analyze the diagnostic value of plasma human cartilage glycoprotein 39 (YKL-40), C-reactive protein (CRP), and interleukin-6 (IL-6) in coronary artery injury (CAL) in children with Kawasaki disease (KD). Methods 125 children with KD admitted to the Department of Pediatrics of Lanzhou University Second Hospital from April 1, 2018 to December 31, 2021 were selected as the KD group. They were further divided into the CAL subgroup of 53 cases and the NCAL subgroup of 72 cases based on whether they were combined with CAL. In addition, 125 healthy children who were matched in gender and age during the same period were selected as the healthy control (HC) group and 125 children with fever due to digestive tract infection as the fever control (FC) group. Collect clinical data of each group, and detect the plasma levels of YKL-40, CRP, and IL-6 in all tested children. Multivariate logistic regression analysis was used to analyze the risk factors for the occurrence of CAL in children with KD. The value of plasma YKL-40, CRP, and IL-6 in the diagnosis of CAL in children with KD was analyzed by subject performance characteristic curve (ROC). Results Comparison of plasma levels of YKL-40, CRP, and IL-6 showed that KD group > FC group > HC group ($F/P=296.352/ <0.001, 35.162/ <0.001, 20.266/ <0.001$). The plasma levels of YKL-40, CRP, and IL-6 in the CAL subgroup were higher than those in the NCAL sub-

group ($t/P=7.434/ <0.001$, $7.967/ <0.001$, $7.444/ <0.001$); The proportion of pretreatment thermal duration, IVIG non response, and IVIG start time ≥ 10 days in CAL subgroup was higher than that in NCAL subgroup ($\chi^2/P=6.831/ <0.001$, $8.304/0.004$, $3.953/0.047$). Multivariate logistic regression analysis showed that non response to IVIG, high YKL-40, high CRP, and high IL-6 were risk factors for developing CAL in children with KD [$OR(95\% CI)=4.627 (2.072 \text{ to } 10.336)$, $1.441 (1.128 \text{ to } 1.840)$, $1.540 (1.106 \text{ to } 2.145)$, and $1.343 (1.098 \text{ to } 1.644)$]. The ROC curve analysis showed that the area under the curve of plasma YKL-40, CRP, IL-6, and their combination in the diagnosis of CAL in children with KD was 0.813, 0.846, 0.821, and 0.923. The combined diagnostic efficacy of the three indicators was higher than that of the single indicator diagnosis ($Z/P=2.965/0.012$, $2.536/0.020$, $2.308/0.025$). **Conclusion** The average increase in plasma YKL-40, CRP, and IL-6 levels in children with KD is related to the occurrence of CAL in children with KD. Combining the three indicators has high value in the diagnosis of CAL in children with KD.

【Key words】 Kawasaki disease; Acute coronary artery injury; Human cartilage glycoprotein-39; C-reactive protein; Interleukin-6; Diagnosis

川崎病(Kawasaki disease, KD)是一种自身免疫性系统性血管炎疾病,常见于5岁以下儿童,在未定期治疗的KD儿童中,冠状动脉病变(coronary artery disease, CAL)发生率为25%~30%^[1]。大剂量静脉注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)和口服阿司匹林治疗后CAL发生率降低,但由于部分患儿对IVIG治疗反应欠佳,在未来疾病进程中可发展为永久性冠状动脉损伤^[2-3]。研究显示, KD发病过程中促炎细胞因子释放,促使血管内皮细胞损伤^[4]。人软骨糖蛋白-39(human cartilage glycoprotein 39, YKL-40)是炎症反应和血管内皮功能障碍的标志物^[5]。C反应蛋白(CRP)是一种急性期炎症反应蛋白,高水平CRP与冠状动脉疾病有关^[6]。白介素-6(IL-6)在炎症反应时合成增加促使炎症级联反应,导致血管炎症反应和动脉粥样硬化^[7]。现分析KD患儿血浆YKL-40、CRP、IL-6水平及其对CAL的诊断价值,以期对临床KD患儿治疗和CAL预防提供参考,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2018年4月1日—2021年12月31日兰州大学第二医院儿科收治KD患儿125例为KD组,再根据是否合并CAL分为CAL亚组53例及NCAL亚组72例。另选取同期医院健康体检儿童125例为健康对照(HC)组,同期医院收治的因消化道感染发热患儿125例作为发热对照(FC)组,均排除既往KD、风湿热等炎症反应性疾病或心肌病、瓣膜性心脏病等心功能损伤性疾病及其他系统疾病患儿,近1个月内均未使用过激素或丙种球蛋白等治疗。本研究已经获得医院伦理委员会批准(2018A-001),受试儿家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①符合美国心脏病协会(AHA)2017年修订的KD相关诊断标准^[8];②初次诊断为KD,处于急性期;③入组前未行KD治疗。

(2)排除标准:①丙种球蛋白耐药患儿;②发病前1个月内应用过激素或其他免疫抑制剂;③合并脓毒症、细菌性脑膜炎、急性腹膜炎、细菌性肺炎、水痘和流感;④合并免疫缺陷或染色体异常等严重免疫性疾病。

1.3 治疗方法 KD患儿均在病程5~10 d内静脉注射免疫球蛋白($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及阿司匹林($30 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)口服,体温降至正常72 h后,阿司匹林减量至 $3 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 口服。

1.4 观测指标与方法

1.4.1 临床资料收集:收集性别、年龄、IVIG治疗前热程、IVIG开始时间、IVIG治疗反应[无应答(标准初始治疗后36 h体温仍高于 38°C 或用药2周内再次发热,并出现至少1项KD临床特征),其他为应答]^[9]、是否使用激素,并取血应用全自动血细胞分析仪(美国贝克曼库尔特公司 UniCel DxH 600)检测白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)和血红蛋白(Hb)。

1.4.2 血浆YKL-40、CRP、IL-6水平检测:于KD患儿病程急性期(IVIG治疗前,病程第1~10天)、FC组和HC组入组当日采集外周静脉血3 ml注入抗凝试管,离心留取血浆 -80°C 保存。采用Multiskan SkyHigh酶标仪(美国赛默飞公司)以酶联免疫吸附试验检测血浆YKL-40(试剂盒购自上海泽叶生物科技有限公司)、IL-6(武汉默沙克生物科技有限公司)水平。A25全自动特种蛋白分析仪(西班牙BioSystems公司)检测血浆CRP水平。

1.4.3 CAL病变分析:经超声心动图和12导联心电图检查,参考日本KD心血管后遗症诊断和管理指南标准^[10];超声心动图提示冠状动脉扩张或冠状动脉瘤形成,心电图提示心肌损伤(心律失常、P-R间期延长、非特异性ST-T改变、QRS低电压等)。

1.5 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较

采用单因素方差分析或独立样本 t 检验;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;多因素 Logistic 回归分析 KD 患儿发生 CAL 的影响因素;受试者工作特征曲线(receiver operator characteristics curve, ROC)分析血浆 YKL-40、CRP、IL-6 诊断 KD 患儿发生 CAL 的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组基线资料比较 KD 组、FC 组、HC 组性别、年龄、身高、体质量等比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 3 组血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平比较 血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平比较, KD 组 > FC 组 > HC 组(P 均 < 0.01),见表 2。

表 2 3 组血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Comparison of Plasma YKL-40, CRP, and IL-6 Levels in Three Groups

组 别	例数	YKL-40($\mu\text{g/L}$)	CRP(ng/L)	IL-6(ng/L)
HC 组	125	8.00 $\pm$ 2.35	6.32 $\pm$ 1.45	8.12 $\pm$ 2.35
FC 组	125	22.30 $\pm$ 4.65	25.66 $\pm$ 6.95	16.83 $\pm$ 7.91
KD 组	125	55.04 $\pm$ 15.02	102.78 $\pm$ 25.47	135.34 $\pm$ 64.90
F 值		296.352	35.162	20.266
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 KD 患儿不同亚组血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平比较 KD 患儿 125 例发生 CAL 病变 53 例,未发生 CAL 病变 72 例。CAL 亚组血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平高于 NCAL 亚组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 3。

表 3 KD 患儿不同亚组血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Comparison of plasma levels of YKL-40, CRP, and IL-6 in different subgroups of children with KD

组 别	例数	YKL-40($\mu\text{g/L}$)	CRP(ng/L)	IL-6(ng/L)
NCAL 亚组	72	49.17 $\pm$ 13.42	79.29 $\pm$ 26.36	104.43 $\pm$ 47.41
CAL 亚组	53	63.01 $\pm$ 7.16	134.69 $\pm$ 45.29	177.32 $\pm$ 62.09
t 值		7.434	7.967	7.444
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 1 KD 组、FC 组、HC 组患儿基线资料比较
Tab.1 Comparison of Baseline Data of Children in KD, FC, and HC Groups

项 目	HC 组($n = 125$)	FC 组($n = 125$)	KD 组($n = 125$)	F/χ^2 值	P 值
男[例(%)]	78(62.40)	79(63.20)	77(61.60)	0.068	0.966
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	2.49 $\pm$ 1.43	2.19 $\pm$ 1.28	2.29 $\pm$ 1.42	0.638	0.421
身高($\bar{x} \pm s$,cm)	89.71 $\pm$ 10.39	90.25 $\pm$ 11.77	89.35 $\pm$ 10.49	0.513	0.695
体质量($\bar{x} \pm s$,kg)	15.09 $\pm$ 3.74	15.42 $\pm$ 3.19	15.32 $\pm$ 3.69	0.352	0.721

2.4 CAL 病变分析 53 例 CAL 病变患儿中包括冠状动脉扩张 32 例,冠状动脉瘤形成 27 例,心律失常 21 例, P-R 间期延长 19 例,非特异性 ST-T 改变 15 例, QRS 低电压 13 例,心率增快 39 例。

2.5 KD 不同亚组患儿临床资料比较 CAL 亚组 IVIG 治疗前热程长于 NCAL 亚组,IVIG 无应答、IVIG 开始时间 ≥ 10 d 比例均高于 NCAL 亚组($P < 0.05$);2 组性别、年龄、身高、体质量、WBC、Hb、PLT、使用激素比例等比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 CAL 亚组与 NCAL 亚组患儿临床资料比较
Tab.4 Comparison of Clinical Data of Children in the CAL Subgroup and the NCAL Subgroup of the

项 目	NCAL 亚组($n = 72$)	CAL 亚组($n = 53$)	t/χ^2 值	P 值
性别[例(%)]				
男	44(61.11)	33(62.26)	0.017	0.896
女	28(38.89)	20(37.74)		
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	2.30 $\pm$ 0.82	2.28 $\pm$ 0.69	0.144	0.886
身高($\bar{x} \pm s$,cm)	88.78 $\pm$ 9.35	90.12 $\pm$ 8.56	0.820	0.414
体质量($\bar{x} \pm s$,kg)	15.40 $\pm$ 3.62	15.21 $\pm$ 4.02	0.277	0.783
WBC($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/\text{L}$)	10.15 $\pm$ 2.41	10.32 $\pm$ 2.35	0.394	0.694
Hb($\bar{x} \pm s$,g/L)	120.17 $\pm$ 11.28	121.35 $\pm$ 10.59	0.593	0.554
PLT($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/\text{L}$)	233.48 $\pm$ 37.41	235.16 $\pm$ 36.56	0.251	0.803
IVIG 治疗前热程($\bar{x} \pm s$,d)	5.12 $\pm$ 1.39	7.21 $\pm$ 2.03	6.831	<0.001
IVIG 治疗反应				
应答	63(87.50)	35(66.04)	8.304	0.004
[例(%)]				
无应答	9(12.50)	18(33.96)		
IVIG 开始时间 ≥ 10 d	7(9.72)	12(22.64)	3.953	0.047
[例(%)]				
<10 d	65(90.28)	41(77.36)		
使用激素				
是	15(20.83)	8(15.09)	0.670	0.413
[例(%)]				
否	57(79.17)	45(84.91)		

2.6 多因素 Logistic 回归分析 KD 患儿发生 CAL 的影响因素 以 YKL-40、CRP、IL-6、IVIG 治疗前热程、IVIG 治疗反应(赋值:0 = 应答,1 = 无应答)、IVIG 开始时间(赋值:0 = <10 d,1 = ≥ 10 d)为自变量,以 KD 患儿是否发生 CAL 为因变量(赋值:0 = 否,1 = 是)进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,IVIG 无应答、YKL-40 高、CRP 高、IL-6 高是 KD 患儿发生 CAL 的危险因素($P < 0.01$),见表 5。

表 5 KD 患儿发生 CAL 的 Logistic 回归模型分析
Tab.5 Logistic Regression Model Analysis of CAL in KD Children with

因 素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR(95% CI)
常数项	9.235	3.852	5.748	0.001	-
IVIG 治疗前热程	0.253	0.236	1.149	0.263	1.288(0.811 ~ 2.045)
IVIG 开始时间 $\geq$ 10 d	0.142	0.132	1.157	0.345	1.153(0.890 ~ 1.493)
IVIG 无应答	1.532	0.410	13.962	<0.001	4.627(2.072 ~ 10.336)
YKL-40 高	0.365	0.125	8.526	<0.001	1.441(1.128 ~ 1.840)
CRP 高	0.432	0.169	6.534	<0.001	1.540(1.106 ~ 2.145)
IL-6 高	0.295	0.103	8.203	<0.001	1.343(1.098 ~ 1.644)

2.7 血浆 YKL-40、CRP、IL-6 诊断 KD 患儿发生 CAL 的价值分析 绘制 ROC 曲线结果显示,血浆 YKL-40、CRP、IL-6 及三者联合诊断 KD 患儿发生 CAL 的曲线下面积(AUC)分别为 0.813、0.846、0.821、0.923,三者联合诊断价值高于单独指标诊断($Z/P=2.965/0.012$ 、 $2.536/0.020$ 、 $2.308/0.025$),见表 6、图 1。

表 6 血浆 YKL-40、CRP、IL-6 诊断 KD 患儿发生 CAL 的 ROC 曲线分析
Tab.6 Analysis of ROC Curves of Plasma YKL-40, CRP, and IL-6 in Children with KD Diagnosed as CAL in

指 标	临界值	AUC(95% CI)	敏感度	特异度	约登指数
YKL-40	53.06 μ g/L	0.813(0.734 ~ 0.877)	0.924	0.639	0.563
CRP	94.67 ng/L	0.846(0.770 ~ 0.904)	0.830	0.722	0.552
IL-6	152.36 ng/L	0.821(0.743 ~ 0.884)	0.717	0.847	0.564
三者联合		0.923(0.861 ~ 0.963)	0.868	0.847	0.715

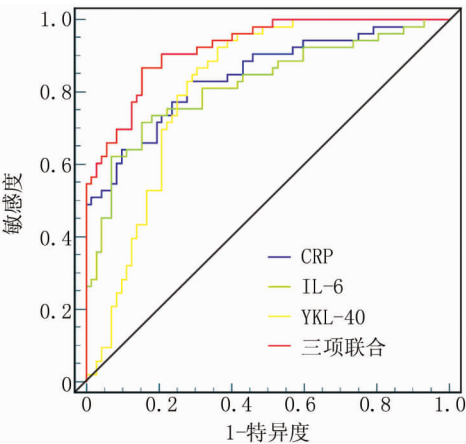


图 1 血浆 YKL-40、CRP、IL-6 诊断 KD 患儿发生 CAL 的 ROC 曲线
Fig.1 ROC curve of plasma YKL-40, CRP, and IL-6 for diagnosis of CAL in children with KD

3 讨 论

KD 是一种急性、自限性炎性反应性疾病,影响中等动脉特别是冠状动脉,可导致永久性冠状动脉结构

损伤。KD 病理基础为动脉全层炎性反应,内膜增厚,粒细胞及单核细胞浸润,内弹性层及内侧膜破裂,血管壁坏死,动脉瘤形成^[11]。KD 发病机制为冠状动脉壁先天和适应性免疫细胞的激活和浸润,活化中性粒细胞,促使其迁移和浸润至病灶部位,并刺激单核细胞产生白介素-1 β ,激活冠状动脉内皮细胞促进急性炎症反应和坏死性动脉炎^[11]。尸检发现 KD 患者 CAL 病灶部位可见坏死性动脉炎,伴中性粒细胞浸润,并逐渐破坏冠状动脉内膜、中膜和部分外膜^[12]。因此探讨与血管炎性反应相关标志物对 KD 发生 CAL 风险预测具有重要价值。

YKL-40 是一种 40 kDa 肝素和几丁质结合炎性糖蛋白,由巨噬细胞、中性粒细胞和血管平滑肌细胞分泌,YKL-40 与几丁质、肝素和透明质酸结合并受细胞外基质变化、细胞因子、生长因子、药物和应激调节,可通过促进趋化性、细胞附着和迁移、组织重构等参与炎症反应、组织修复和重塑、内皮损伤等过程,与哮喘、关节炎、败血症、糖尿病、肝纤维化、动脉粥样硬化和冠状动脉疾病等有关^[13]。YKL-40 水平升高可激活内皮细胞表达血管黏附分子-1 和细胞间黏附分子-1,进一步损伤血管内皮细胞,加速动脉粥样硬化的进展^[14]。研究显示,YKL-40 是心血管疾病的潜在风险标志物,较高的血清 YKL-40 水平与稳定性冠状动脉疾病患者不良心血管结局(急性心肌梗死、不稳定型心绞痛)和死亡风险的增加独立相关,YKL-40 是急性冠状动脉综合征后死亡的有效预测因子^[15-16]。本研究发现,高水平血浆 YKL-40 是 KD 患儿发生 CAL 的危险因素,表明血浆 YKL-40 可能参与 KD 及 CAL 发生过程。分析可能的原因为血浆 YKL-40 可促使局部促炎介质表达,驱使巨细胞和单核细胞迁移和浸润于冠状动脉管壁,诱导促炎细胞因子大量释放,扩大和加剧血管炎性反应,引起坏死性动脉炎、动脉瘤形成及永久性的冠状动脉损害^[17]。

CRP 是目前研究最广泛的炎性标志物,主要由肝脏合成,也可由平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞和脂肪细胞合成,CRP 可激活补体途径,活化循环单核细胞,促使细胞因子(IL-6 和肿瘤坏死因子- α)的产生,诱导局部炎症反应^[18]。CRP 还可由动脉粥样硬化斑块细胞分泌,在动脉粥样硬化的过程中起着直接的调节作用,CRP 通过促使细胞因子释放并积聚于血管壁,诱导内皮功能障碍、平滑肌细胞迁移和细胞外基质重塑等,与心脑血管疾病密切相关^[19]。越来越多研究表明,循环 CRP 水平增高与冠状动脉解剖病变的严重程度及动脉事件(包括心肌梗死、脑卒中、下肢动

脉疾病、心脏骤停)密切相关^[20]。本研究发现,KD 患儿血浆 CRP 水平增高与 CAL 发生有关,CRP 可作为 KD 患儿 CAL 的潜在生物学指标。分析原因为 KD 全身性血管炎性反应刺激下 CRP 合成增加,并随着组织损伤的严重程度加重而增加,CRP 作为具有先天免疫功能的蛋白质,其功能之一是作为模式识别受体,通过参与先天免疫信号传导激活内皮细胞、血小板和白细胞和补系统诱发血管炎性反应,导致化脓性动脉炎及管壁结构破坏,最终引起 CAL 发生^[21-22]。

IL-6 是一种可溶性介质,由 212 个氨基酸组成,基因位于染色体 7p21,在炎症反应、免疫反应和造血等病理生理过程中具有多效作用。在感染和组织损伤中 IL-6 在局部病变中合成,通过血流进入肝脏迅速诱导大量急性期蛋白生成,刺激急性期反应,促进宿主防御,当 IL-6 过度合成时则诱导和扩大炎症级联反应,导致局部或全部组织损伤。IL-6 还可促进 CD4⁺ T 细胞特异性分化为辅助性 T 细胞 17,并抑制调节性 T 细胞分化,破坏免疫耐受,导致促炎/抗炎机制失衡,引发过度炎症反应^[23]。研究显示,IL-6 直接影响血管内皮细胞,产生多种类型细胞因子和趋化因子并激活凝血级联反应,导致内皮功能障碍、凝血机制异常、血管壁结构破坏、异常增生或渗漏等,IL-6 具有促动脉粥样硬化作用,与稳定性冠状动脉疾病、急性冠状动脉综合征、心力衰竭等心血管疾病有关^[24-25]。本研究发现,血浆 IL-6 水平增高与 KD 及 CAL 发生有关,推测 IL-6 参与 KD 进展为 CAL 的机制为:IL-6 表达增加激活磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 和细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路,刺激血管内皮细胞增殖,另外 IL-6 信号通路通过诱导 CXC 趋化因子配体 8 分泌,促使中性粒细胞样细胞迁移和募集于血管壁^[26],导致血管炎性损伤和 CAL 的发生。

ROC 曲线分析结果显示,联合血浆 YKL-40、CRP、IL-6 诊断 KD 发生 CAL 的效能显著提高,表明同时检测血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平有助于评估 KD 患儿发生 CAL 风险。回归分析显示,IVIG 治疗反应性无应答是 CAL 的危险因素,表明 IVIG 治疗无应答将增加 CAL 的发生率,临床对 IVIG 治疗反应差的患儿应及时调整治疗方案,以降低 CAL 的发生风险。

综上,KD 患儿血浆 YKL-40、CRP、IL-6 水平均增高,高水平 YKL-40、CRP、IL-6 与 KD 患儿并发 CAL 有关,IVIG 无应答、YKL-40 高、CRP 高、IL-6 高是 KD 患儿发生 CAL 的危险因素。三者联合在 KD 患儿 CAL 诊断中具有较高的价值,可作为 KD 患儿发生 CAL 的标志物。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

闵丽、袁时健:实施研究过程,数据收集,分析整理,设计论文框架,论文撰写;刘亚红、王晋:设计研究方案、研究流程;牛少敏:进行文献调研与整理;杨轶男、董湘玉:提出研究方向、研究思路,论文终审

参考文献

- [1] Buonsenso D, Cristaldi S, Reale A, et al. Very early development and recognition of coronary involvement in a febrile infant with typical signs of Kawasaki disease[J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2018, 10(1): e2018037. DOI: 10.4084/MJHID.2018.037.
- [2] Qian B, Huang H, Cheng M, et al. Mechanism of HMGB1-RAGE in Kawasaki disease with coronary artery injury[J]. *Eur J Med Res*, 2020, 25(1): 8. DOI: 10.1186/s40001-020-00406-5.
- [3] Zhang Y, Wang Y, Zhang L, et al. Reduced platelet miR-223 induction in Kawasaki disease leads to severe coronary artery pathology through a miR-223/PDGFR β vascular smooth muscle cell axis[J]. *Circ Res*, 2020, 127(7): 855-873. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316951.
- [4] Noval Rivas M, Arditi M. Kawasaki disease: Pathophysiology and insights from mouse models[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(7): 391-405. DOI: 10.1038/s41584-020-0426-0.
- [5] Xu T, Zhang K, Zhong C, et al. Plasma human cartilage glycoprotein-39 is associated with the prognosis of acute ischemic stroke[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(18): e026263. DOI: 10.1161/JAHA.122.026263.
- [6] Zhu M, Lin J, Wang C, et al. The relationship among angiotensinogen genes polymorphisms and hs-CRP and coronary artery disease[J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(5): e22881. DOI: 10.1002/jcla.22881.
- [7] Wainstein MV, Mossman M, Araujo GN, et al. Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2017, 9: 67. DOI: 10.1186/s13098-017-0266-5.
- [8] McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A scientific statement for health professionals from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2017, 135(17): e927-e999. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000484.
- [9] Ayusawa M, Sonobe T, Uemura S, et al. Revision of diagnostic guidelines for Kawasaki disease (the 5th revised edition)[J]. *Pediatr Int*, 2005, 47(2): 232-234. DOI: 10.1111/j.1442-200x.2005.02033.x.
- [10] JCS Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease (JCS 2008)——digest version[J]. *Circ J*, 2010, 74(9): 1989-2020. DOI: 10.1253/circj.10-74-0903.
- [11] 范雪, 徐明国. KD 发病机制及治疗研究进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 2021, 36(5): 339-344. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3806.2019.11.29.
- [12] Fan X, Xu MG. Research progress in pathogenesis and treatment of KD[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2012, 19(2): 137-136. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3806.2019.11.29.

- processes characterize Kawasaki disease: A light and transmission electron microscopic study [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e38998. DOI:10.1371/journal.pone.0038998.
- [13] Chen L, Zheng J, Xue Q, et al. YKL-40 promotes the progress of atherosclerosis independent of lipid metabolism in apolipoprotein E-/- mice fed a high-fat diet [J]. *Heart Vessels*, 2019, 34 (11): 1874-1881. DOI: 10.1007/s00380-019-01434-w.
- [14] Sciborski K, Kuliczowski W, Karolko B, et al. Plasma YKL-40 levels correlate with the severity of coronary atherosclerosis assessed with the SYNTAX score [J]. *Pol Arch Intern Med*, 2018, 128 (11): 644-648. DOI: 10.20452/pamw.4345.
- [15] Schroder J, Jakobsen JC, Winkel P, et al. Prognosis and reclassification by YKL-40 in stable coronary artery disease [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9 (5): e014634. DOI:10.1161/JAHA.119.014634.
- [16] Sciborski K, Gierlotka M, Protasiewicz M, et al. YKL-40 as a predictor of mortality after acute coronary syndrome [J]. *Pol Arch Intern Med*, 2020, 130 (4): 343-345. DOI:10.20452/pamw.15282.
- [17] Zhao T, Su Z, Li Y, et al. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 201. DOI:10.1038/s41392-020-00303-7.
- [18] Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 754. DOI:10.3389/fimmu.2018.00754.
- [19] Zhang W, Speiser JL, Ye F, et al. High-sensitivity C-reactive protein modifies the cardiovascular risk of lipoprotein (a): Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 78 (11): 1083-1094. DOI:10.1016/j.jacc.2021.07.016.
- [20] Peng X, Peng D, Hu Y, et al. Correlation of heart rate and blood pressure variability as well as hs-CRP with the burden of stable coronary artery disease [J]. *Minerva Cardioangiol*, 2020, 68 (5): 376-382. DOI:10.23736/S0026-4725.20.05153-1.
- [21] An HS, Kim GB, Song MK, et al. The occurrence of coronary artery lesions in Kawasaki disease based on C-reactive protein levels: A retrospective cohort study [J]. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2021, 19 (1): 78. DOI:10.1186/s12969-021-00566-6.
- [22] Sercelik A, Tanriverdi O, Askin L, et al. Association of C-reactive protein to albumin ratio in patients with isolated coronary artery ectasia [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2021, 116 (1): 48-54. DOI: 10.36660/abc.20190476.
- [23] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) immunotherapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (8): a028456. DOI:10.1101/cshperspect.a028456.
- [24] Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53 (7): 1116-1123. DOI:10.1038/s12276-021-00649-0.
- [25] Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2021, 128 (11): 1728-1746. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.121.319077.
- [26] Montgomery A, Tam F, Gursche C, et al. Overlapping and distinct biological effects of IL-6 classic and trans-signaling in vascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320 (4): C554-C565. DOI:10.1152/ajpcell.00323.2020.

(收稿日期:2022-12-15)

(上接 349 页)

- [25] Shi X, Qiu B, Shen H, et al. Inverse relationship between plasma tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and carotid intima-media thickness among patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis [J]. *Cardiorenal Med*, 2020, 10 (3): 137-144. DOI:10.1159/000503811.
- [26] Jarr KU, Eschricht S, Burkly LC, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis aggravates left ventricular dysfunction after myocardial infarction in mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 23 (1): 131950. DOI: 10.1155/2014/131950.
- [27] 陈铀,王开杰,罗豫川,等.中性粒细胞/淋巴细胞比值对新型冠状病毒肺炎重型患者心肌损伤的预测价值[J].*中华心血管病杂志*, 2020, 48 (7): 572-579. DOI: 10.3760/cma.j.cn112148-20200422-00336.
- Chen Y, Wang KJ, Luo YC, et al. Prediction value of neutrophil/lymphocyte ratio for myocardial injury in severe patients with novel coronavirus pneumonia [J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2020, 48 (7): 572-579. DOI:10.3760/cma.j.cn112148-20200422-00336.
- [28] 殷云杰,蒋建东,徐亮,等.中性粒细胞与淋巴细胞比值对老年稳定型心绞痛病人择期PCI围术期心肌损伤的预测价值[J].*实用老年医学*, 2021, 35 (9): 943-947. DOI: 10.3969/j.issn.1003-9198.2021.09.013.
- Yin YJ, Jiang JD, Xu L, et al. Predictive value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for perioperative myocardial injury of per-cutaneous coronary intervention in elderly patients with stable angina pectoris [J]. *Applied Geriatrics*, 2021, 35 (9): 943-947. DOI: 10.3969/j.issn.1003-9198.2021.09.013.
- [29] Wang YK, Tang JN, Han L, et al. Elevated FURIN levels in predicting mortality and cardiovascular events in patients with acute myocardial infarction [J]. *Metabolism*, 2020, 111: 154323. DOI: 10.1016/j.metabol.2020.154323.
- [30] Liu ZW, Ma Q, Liu J, et al. The association between plasma furin and cardiovascular events after acute myocardial infarction [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21 (1): 468. DOI:10.1186/s12872-021-02029-y.
- [31] Mrak D, Zierfuss B, Höbaus C, et al. Evaluation of sCD163 and sTWEAK in patients with stable peripheral arterial disease and association with disease severity as well as long-term mortality [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 317: 41-46. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.11.026.
- [32] Chung J, Bae J, Kwon Y, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio in patients undergoing noncardiac surgery after coronary stent implantation [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2020, 34 (6): 1516-1525. DOI:10.1053/j.jvca.2019.10.009.

(收稿日期:2022-12-26)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.007

肿瘤防治专题

KMT2D 在前列腺癌患者中的表达及其与临床病理特征和预后的关系

李鸿斌, 贺宝忠, 侯琳, 冯东, 樊茂宇

基金项目: 山西省重点研发计划项目(201903D321157)

作者单位: 037000 山西省大同市第五人民医院/山西大同大学第一临床医学院泌尿外科

通信作者: 贺宝忠, E-mail: HBZ2213@sohu.com

【摘要】目的 探讨组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2D(KMT2D)在前列腺癌患者中的表达,以及其与临床病理特征和预后的关系。方法 选取 2015 年 7 月—2017 年 7 月山西省大同市第五人民医院泌尿外科行前列腺癌根治术治疗的患者 126 例为观察组,并根据随访 3 年预后情况分为预后良好亚组($n=88$)、预后不良亚组($n=38$),另外选择同期医院健康体检志愿者 120 例作为健康对照组。收集受试者临床资料,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测受试者血清 KMT2D 表达水平, Cox 回归分析影响前列腺癌患者预后的因素,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析血清 KMT2D 对前列腺癌不良预后的预测价值。结果 观察组血清 KMT2D 水平高于健康对照组($t/P=8.504/<0.001$);预后不良亚组血清 KMT2D 水平高于预后良好亚组($t/P=6.601/<0.001$); Gleason 评分 >7 分、有微血管侵犯、TNM III 期、有淋巴结转移的前列腺癌患者血清 KMT2D 相对表达量分别高于 Gleason 评分 ≤ 7 分、无微血管侵犯、TNM I ~ II 期、无淋巴结转移的患者,差异均有统计学意义($t/P=3.958/<0.001$ 、 $2.292/0.024$ 、 $3.022/0.003$ 、 $5.982/<0.001$); KMT2D 低表达患者 3 年生存率显著高于 KMT2D 高表达患者($\chi^2/P=10.112/0.001$); Cox 回归分析结果显示, KMT2D 高表达、Gleason 评分 >7 分、TNM 分期为 III 期、有淋巴结转移是前列腺癌患者预后不良的危险因素 [$OR(95\% CI)=1.245(1.019 \sim 1.521)$ 、 $1.063(1.010 \sim 1.119)$ 、 $1.152(1.053 \sim 1.261)$ 、 $1.474(1.127 \sim 1.928)$]。ROC 曲线分析显示,血清 KMT2D 预测前列腺癌患者预后不良的曲线下面积(AUC)为 0.814,敏感度为 0.680,特异度为 0.908,约登指数为 0.588。结论 KMT2D 在前列腺癌患者血清中呈高表达,对于患者预后不良具有较好的预测价值,且是预后不良的危险因素。

【关键词】 前列腺癌;组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2D;预后;相关性

【中图分类号】 R737.52

【文献标识码】 A

Expression of KMT2D in patients with prostate cancer and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis Li Hongbin, He Baozhong, Hou Lin, Feng Dong, Fan Maoyu. Department of the Fifth People's Hospital of Datong, Shanxi Province, Datong 037000, China

Corresponding author: He Baozhong, E-mail: HBZ2213@sohu.com

Funding program: Key R&D Plan Project of Shanxi Province (201903D321157)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of histone lysine methyltransferase 2D (KMT2D) in patients with prostate cancer and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. Methods A total of 126 patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy in the Urological Department of the Fifth People's Hospital of Datong City, Shanxi Province, from July 2015 to July 2017 were selected as the observation group, and were divided into a subgroup with good prognosis ($n=88$) and a subgroup with poor prognosis ($n=38$) based on the 3-year follow-up. In addition, 120 health examination volunteers from the same hospital were selected as the health control group. Clinical data of subjects were collected, and serum KMT2D expression levels were measured using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Cox regression analysis was used to analyze factors that affect the prognosis of prostate cancer patients. The predictive value of serum KMT2D for poor prognosis of prostate cancer was analyzed using subject performance characteristic curve (ROC). Results The serum KMT2D level in the observation group was higher than that in the healthy control group ($t/P=8.504/<0.001$); The serum KMT2D level in the poor prognosis subgroup was higher than that in the good prognosis subgroup ($t/P=6.601/<0.001$); The relative expression of KMT2D in prostate cancer patients with Gleason

score > 7, microvascular invasion, TNM stage III, and lymph node metastasis was significantly higher than those with Gleason score ≤ 7 , microvascular invasion, TNM stage I-II, and lymph node metastasis, respectively ($t/P=3.958/ <0.001$, 2.292/0.024, 3.022/0.003, 5.982/ <0.001); The 3-year survival rate of patients with low expression of KMT2D is significantly higher than that of patients with high expression of KMT2D ($\chi^2/P=10.112/0.001$); Cox regression analysis showed that high expression of KMT2D, Gleason score > 7, TNM stage III, and lymph node metastasis were risk factors for poor prognosis in prostate cancer patients [OR (95% CI) = 1.245 (1.019 – 1.521), 1.063 (1.010 – 1.119), 1.152 (1.053 – 1.261), 1.474 (1.127 – 1.928)]. ROC curve analysis showed that the area under the curve (AUC) of serum KMT2D for predicting poor prognosis in prostate cancer patients was 0.814, the sensitivity was 0.680, the specificity was 0.908, and the Jordan index was 0.588. **Conclusion** KMT2D is highly expressed in the serum of prostate cancer patients, which has a good predictive value for poor prognosis and is a risk factor for poor prognosis.

【Key words】 Prostate cancer; Histone-lysine N-methyltransferase 2D; Clinicopathological characteristics; Prognosis; Correlation

前列腺癌是目前临床上常见且严重危害老年男性的重要疾病^[1-2]。随着医学科技的不断发展,前列腺癌的诊出率不断上升,且逐渐趋于年轻化。目前对于前列腺癌的筛查手段较少,主要通过直肠指诊和前列腺特异性抗原(PSA)检测,然而前者敏感度较低,后者特异度较差,因此探索具有较高敏感度和特异度指标对于前列腺癌的诊断和预后评估意义重大^[3-4]。组蛋白赖氨酸甲基转移酶 2D(KMT2D)是一种存在于哺乳动物的调节因子,参与肿瘤的发生和发展^[5]。Xiong 等^[6]研究发现,KMT2D 在胃癌组织中过表达,低水平的 KMT2D 可有效抑制癌细胞增殖。本研究通过检测 KMT2D 在前列腺癌中的表达,以及其与临床病理参数和预后的关系,旨在为前列腺癌的早期诊断和预后评估寻找新的生物靶标因子,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2015 年 7 月—2017 年 7 月山西省大同市第五人民医院泌尿外科行前列腺癌根治术的患者 126 例为观察组,年龄 36 ~ 74 (58.45 $\pm$ 10.67) 岁,体质指数(BMI) (23.67 $\pm$ 1.97) kg/m²; 病程 1 ~ 6 (3.51 $\pm$ 0.84) 年; 家族遗传史 23 例; 合并症: 糖尿病 16 例, 高血压 20 例; 低危前列腺癌(Gleason 评分 ≤ 7 分) 45 例, 高危前列腺癌(Gleason 评分 > 7 分) 81 例^[7]。另外选择同期医院健康体检志愿者 120 例作为健康对照组, 年龄 32 ~ 76 (60.89 $\pm$ 8.35) 岁, BMI (22.54 $\pm$ 1.96) kg/m²。2 组年龄、BMI、病程、家族遗传史、合并症等资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准(15-00539), 受试者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准: ①符合 2014 版《中国泌尿外科疾病诊断治疗指南》中前列腺癌诊断

标准^[7]; ②首次进行前列腺癌根治手术; ③临床资料完整。(2) 排除标准: ①合并其他恶性肿瘤者; ②有严重肝、肾疾病者; ③有严重免疫缺陷者; ④临床资料不全者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清 KMT2D 水平检测: 患者入院后次日、健康体检者体检当日采集清晨空腹肘静脉血 3 ml, 离心留取血清置于 -80℃ 冰箱中保存备用。使用 TRIzol 试剂(购自上海生工科技有限公司)提取受试者血清总 RNA, 后进行反转录(MLV 反转录试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司)。取反转录产物进行 qRT-PCR 反应, qRT-PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司(型号: CFX384), 试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司。qRT-PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 64℃ 延伸 35 s, 共循环 40 次。引物由上海吉凯基因技术有限公司合成, KMT2D 正向引物 5'-ACCATGTGAAGAACAGGAAGAG-3', 反向引物 5'-TCACCCTGGCTCAGATTAGA-3'; β -actin 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。以 β -actin 为内源对照, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 KMT2D 的表达水平。

1.3.2 随访情况: 主要以电话及门诊复查的方式对所有前列腺癌患者进行为期 3 年的随访, 随访截止时间 2020 年 7 月, 患者随访率为 100%。生存时间为术后至患者死亡时间或最终随访截止时间。以前列腺癌患者出现转移、复发或死亡情况为终点事件, 未出现终点事件为预后良好亚组, 出现终点事件为预后不良亚组。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 t 检验; 计数资料以频数或率(%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 采用 Cox 回归分析前列腺癌患者预后

不良的危险因素;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析血清 KMT2D 在前列腺癌患者预后不良中的预测价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清 KMT2D 表达水平比较 观察组血清 KMT2D 表达水平为(1.26 ± 0.24),显著高于健康对照组的(1.01 ± 0.22),差异具有统计学意义($t/P=8.504/ <0.001$)。

2.2 2 亚组血清 KMT2D 表达水平比较 预后不良亚组患者血清 KMT2D 表达水平为(1.44 ± 0.32),高于预后良好亚组的(1.14 ± 0.19),差异具有统计学意义($t/P=6.601/ <0.001$)。

2.3 KMT2D 表达水平与前列腺癌患者临床/病理特征的关系 不同年龄、肿瘤直径的前列腺癌患者血清 KMT2D 相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Gleason 评分 >7 分、有微血管侵犯、TNM Ⅲ期、有淋巴结转移的前列腺癌患者血清 KMT2D 相对表达量分别高于 Gleason 评分 ≤7 分、无微血管侵犯、TNM I ~ Ⅱ 期、无淋巴结转移的前列腺癌患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 血清 KMT2D 表达水平与前列腺癌患者临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship between serum KMT2D expression level and clinicopathological characteristics in patients with prostate cancer

项 目	例数	KMT2D	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄	≥58 岁	56	1.28 ± 0.24	0.974 0.332
	<58 岁	70	1.24 ± 0.22	
Gleason 评分	>7 分	81	1.32 ± 0.27	3.958 <0.001
	≤7 分	45	1.15 ± 0.19	
微血管侵犯	有	73	1.30 ± 0.25	2.292 0.024
	无	53	1.20 ± 0.23	
肿瘤直径	<3 cm	57	1.22 ± 0.23	1.622 0.107
	≥3 cm	69	1.29 ± 0.25	
TNM 分期	I / Ⅱ 期	55	1.20 ± 0.21	3.022 0.003
	Ⅲ 期	71	1.33 ± 0.26	
淋巴结转移	无	47	1.09 ± 0.17	5.982 <0.001
	有	79	1.36 ± 0.28	

2.4 血清 KMT2D 与前列腺癌患者预后的关系 经 3 年随访,126 例患者生存 88 例(69.84%),死亡 38 例(30.16%)。将前列腺癌患者血清 KMT2D 均值 1.26 作为高、低表达的分界值,KMT2D 低表达前列腺癌患者 3 年生存率为 81.08% (60/74),显著高于 KMT2D 高表达患者的 53.85% (28/52),差异有统计学意义($\chi^2=10.112,P=0.001$),见图 1。

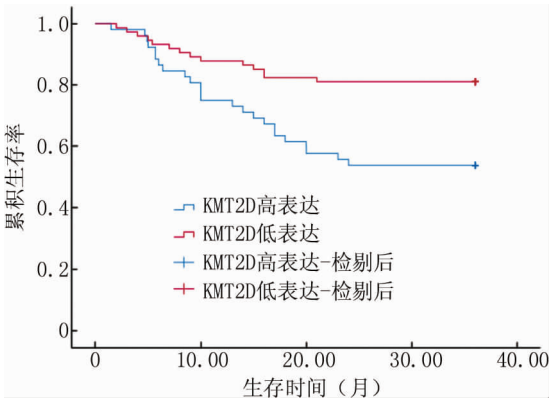


图 1 血清 KMT2D 表达与前列腺癌患者预后的关系

Fig.1 Relationship between serum KMT2D expression and prognosis in patients with prostate cancer

2.5 Cox 回归分析前列腺癌患者预后不良的影响因素 以前列腺癌患者预后为因变量(预后不良 = 1,预后良好 = 0),以 KMT2D(高表达 = 1,低表达 = 0),Gleason 评分(>7 分 = 1,≤7 分 = 0),微血管侵犯(有 = 1,无 = 0),TNM 分期(Ⅲ期 = 1,I ~ Ⅱ 期 = 0),淋巴结转移(有 = 1,无 = 0)为自变量进行 Cox 回归分析,结果显示,KMT2D 高表达、Gleason 评分 >7 分、TNM 分期为 Ⅲ 期、有淋巴结转移是前列腺癌患者预后不良的危险因素($P<0.05$),见表 2。

表 2 Cox 回归分析前列腺癌患者预后不良的影响因素

Tab.2 Cox Regression Analysis of Factors Affecting the Poor Prognosis of Prostate Cancer Patients

变 量	β 值	SE 值	Wald 值	<i>P</i> 值	OR(95% CI)
KMT2D 高表达	0.219	0.102	4.615	0.032	1.245(1.019 ~ 1.521)
Gleason 评分 >7 分	0.061	0.026	3.662	0.019	1.063(1.010 ~ 1.119)
微血管侵犯	0.108	0.163	0.439	0.508	1.114(0.809 ~ 1.533)
TNM 分期 Ⅲ 期	0.141	0.046	9.462	0.002	1.152(1.053 ~ 1.261)
淋巴结转移	0.388	0.137	8.000	0.005	1.474(1.127 ~ 1.928)

2.6 血清 KMT2D 预测前列腺癌患者预后不良的价值 绘制 ROC 曲线显示,血清 KMT2D 诊断前列腺癌患者预后不良的曲线下面积(AUC)为 0.814(95% CI 0.730 ~ 0.899),最佳临界值为 1.338,敏感度为 0.680,特异度为 0.908,约登指数为 0.588,见图 2。

3 讨 论

前列腺癌是一种在男性泌尿生殖系统较为常见的恶性肿瘤疾病,近年来我国男性前列腺癌发病率逐年升高,据有关报道称,截至 2019 年我国前列腺癌的发 病率仅次于肺癌,位居男性恶性肿瘤的第二位^[8-9]。前列腺癌的发生和发展过程较为复杂,通常有多种因

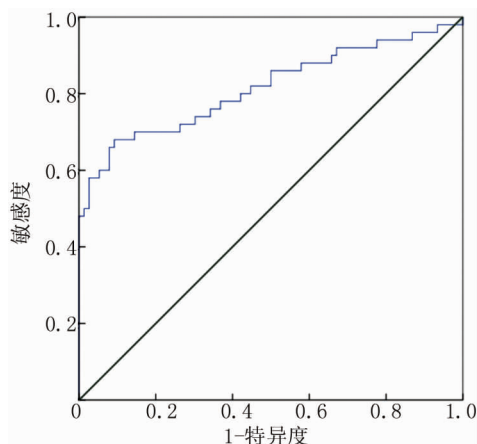


图2 ROC 曲线分析血清 KMT2D 对前列腺癌患者预后不良的预测价值

Fig. 2 ROC curve analysis of the predictive value of serum KMT2D for poor prognosis in patients with prostate cancer

素和多基因的参与,术后复发是造成患者死亡的主要原因之一^[10]。

Lv 等^[11]通过一系列研究探讨了 KMT2D 在前列腺癌 DNA 损伤中的作用及 KMT2D 在表观遗传调控中的潜在机制。调低 KMT2D 可通过干扰抗氧化基因表达和增加细胞内活性氧水平,使细胞对 DNA 损伤敏感,从而导致细胞凋亡和衰老。KMT2D 的缺失降低了增强子活性标记 H3K4me1 和 H3K27ac 的丰度,从而阻断了细胞对氧化应激反应的关键介质 FOXO3 的 DNA 结合,抑制了抗氧化基因的转录。此外,前列腺癌细胞中 KMT2D 的缺失也增加了它们对基因毒性抗癌药物和多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)抑制剂的敏感性,表明低水平的 KMT2D 可能介导前列腺癌对特定治疗的反应。这些发现进一步强调 KMT2D 在前列腺癌进展中的重要作用,能够抑制前列腺癌的发展进程。

吕世栋^[12]对前列腺癌临床病例样本进行免疫组化染色,结果发现,与良性前列腺增生组织样本比较,肿瘤组织中 KMT2D 水平显著升高,生存分析发现 KMT2D 高表达组患者预后不良的发生率较高,认为 KMT2D 在前列腺癌中高表达,与患者的不良预后及肿瘤的高侵袭性具有一定相关性。进一步更深入地探索 KMT2D 沉默抑制前列腺癌进展的分子机制,采用转录组测序技术联合分析,结果表明 KMT2D 沉默后细胞整体 H3K4me1 水平下降。综合分析,在前列腺癌中, KMT2D 沉默会影响 LIFR 和 KLF4 基因增强子活性,抑制基因表达,进而抑制 PI3K/AKT 通路,使得肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭活性下降,最终抑制肿瘤进展。

本研究发现, KMT2D 在前列腺癌患者血清中呈高表达,预后不良亚组血清 KMT2D 水平高于预后良好亚组,与以往研究结果相似,提示 KMT2D 低表达与前列腺癌细胞增殖和迁移能力的减弱及癌组织恶性程度降低有关。原因可能是 KMT2D 通过调控和激活 PI3K/AKT 通路,促进了肿瘤细胞的生长和转移,但其具体作用机制目前尚不十分清楚。

有报道称临床分期为Ⅲ期的患者肿瘤蔓延快,治疗难度大,其术后易出现复发转移的风险^[13]。Gleason 评分是目前临床上应用较广的前列腺癌组织分级方法,与前列腺癌的生物行为学和预后具有很高的相关性, Gleason 评分 > 7 分被鉴定为高危前列腺癌,患者在术后也容易出现复发转移的风险^[14]。本研究中 Gleason 评分 > 7 分患者的 KMT2D 相对表达量高于 Gleason 评分 ≤ 7 分患者,提示 KMT2D 高表达与前列腺癌患者的组织分级密切相关。KMT2D 低表达患者 3 年生存率显著高于高表达患者,进一步 Cox 回归分析,结果显示血清 KMT2D 高表达是前列腺癌患者预后不良的危险因素。经 ROC 曲线分析,血清 KMT2D 对前列腺癌患者预后具有较高的预测价值,且具有较高的特异度。提示血清 KMT2D 高表达与患者预后不良关系密切,有望作为评估前列腺癌患者预后的生物性指标,对改善患者预后意义重大。

综上所述, KMT2D 在前列腺癌患者血清中表达上调,其与临床病理参数及患者预后不良密切相关,可作为预测前列腺癌患者预后的有效生物靶标。本研究不足之处在于所研究样本例数较少,血清 KMT2D 在前列腺癌中的作用机制复杂,因此需在之后的研究中扩大研究样本数量,进一步探讨血清 KMT2D 在前列腺癌中的作用机制,为后续开发以 KMT2D 作为前列腺癌治疗靶点的药物提供理论依据。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李鸿斌:设计研究方案,实施研究过程;贺宝忠、冯东:实施研究过程,资料搜集整理;侯琳:论文审核,论文修改;樊茂宇:进行统计学分析,论文修改

参考文献

- [1] Carlsson SV, Vickers AJ. Screening for prostate cancer[J]. Med Clin North Am, 2020, 104 (6): 1051-1062. DOI: 10.1016/j.mcna.2020.08.007.
- [2] Groeben C, Wirth MP. Prostate cancer: Basics on clinical appearance, diagnostics and treatment[J]. Med Monatsschr Pharm, 2017, 40(5): 192-201.
- [3] 冯国亮, 张建伟, 徐泉泉, 等. IGF-IR 与前列腺癌发生发展及预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 327-331. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2020.03.017. (下转 382 页)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 008

肿瘤防治专题

FBXL2 和 Dkk-1 在结直肠癌组织中的表达及临床意义

李晓宁, 李小龙, 宋瑞, 张惠卿

基金项目: 河北省医学科学研究课题(20191111); 保定市社发类项目(18ZF262)

作者单位: 071000 河北省保定市第一中心医院普通外科二科(李晓宁), 普通外科一科(李小龙、宋瑞), 普通外科三科(张惠卿)

通信作者: 张惠卿, E-mail: zhang13931386542@163.com

【摘要】目的 研究结直肠癌(CRC)组织中 F-盒富含亮氨酸的重复蛋白 2(FBXL2)、Wnt 信号通路抑制剂 1(Dkk-1)的表达及临床意义。方法 选取 2017 年 10 月—2019 年 5 月保定市第一中心医院普通外科诊治 CRC 患者 75 例作为研究对象。应用荧光定量 PCR 及免疫组化检测 CRC 癌组织和癌旁组织中 FBXL2、Dkk-1 mRNA 及蛋白表达水平。比较不同临床病理特征 CRC 患者癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达差异。Kaplan-Meier 生存分析(Log-rank 检验)FBXL2、Dkk-1 蛋白表达与 CRC 患者生存预后的关系。多因素 COX 回归分析影响 CRC 患者生存预后的危险因素。结果 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 mRNA 表达水平低于癌旁组织($t=25.053, 34.053, P$ 均 <0.001)。CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达阳性率低于癌旁组织($\chi^2=58.134, 51.042, P$ 均 <0.001)。CRC 癌组织中 FBXL2 与 Dkk-1 蛋白表达呈显著正相关($r_s=0.714, P<0.001$)。TNM 分期 I ~ II 期、淋巴结转移阴性 CRC 患者癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达阳性率高于 TNM 分期 III 期、淋巴结转移阳性患者, 差异均有统计学意义($\chi^2/P=7.588/0.006, 5.220/0.022$)。FBXL2 阴性表达组患者 3 年累积生存率明显低于阳性表达组患者($\chi^2=5.991, P=0.014$); Dkk-1 阴性表达组患者 3 年累积生存率明显低于阳性表达组患者($\chi^2=8.058, P=0.005$)。肿瘤分期 III 期、淋巴结转移阳性、FBXL2 阴性表达、Dkk-1 阴性表达是影响 CRC 患者预后的独立危险因素[$HR(95\% CI)=1.613(1.223 \sim 2.126), 1.917(1.314 \sim 2.799), 1.837(1.229 \sim 2.745), 1.738(1.246 \sim 2.426), P$ 均 <0.001]。结论 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 表达降低, 两者表达与 CRC 肿瘤分期及淋巴结转移有关, 是评估 CRC 患者生存预后新的肿瘤标志物。

【关键词】 结直肠癌; F-盒富含亮氨酸的重复蛋白 2; Wnt 信号通路抑制剂 1; 临床预后

【中图分类号】 R735.3⁺5; R735.3⁺7 【文献标识码】 A

Expression and clinical significance of FBXL2 and Dkk-1 in colorectal cancer Li Xiaoning, Li Xiaolong*, Song Rui, Zhang Huiqing. * The Second Department of Surgery, Baoding First Central Hospital, Hebei Province, Baoding 071000, China
Corresponding author: Zhang Huiqing, E-mail: zhang13931386542@163.com

Funding program: Hebei Medical Science Research Project (20191111); Baoding Social Development Projects (18ZF262)

【Abstract】 **Objective** To study the expression and clinical significance of F-box leucine-rich repeat protein 2 (FBXL2) and Wnt signal pathway inhibitor 1 (Dkk-1) in colorectal cancer (CRC). **Methods** From October 2017 to May 2019, 75 patients with CRC diagnosed and treated by general surgery in Baoding First Central Hospital were selected as the study subjects. The expression levels of FBXL2, Dkk-1 mRNA and protein in CRC carcinoma and adjacent tissues were detected by fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry. To compare the differences of FBXL2 and Dkk-1 protein expression in cancer tissues of CRC patients with different clinicopathological characteristics. Kaplan-Meier survival analysis (Log-rank test) The relationship between the expression of FBXL2 and Dkk-1 protein and the survival and prognosis of CRC patients. Multivariate COX regression analysis was used to analyze the risk factors affecting the survival and prognosis of CRC patients. **Results** The expression level of FBXL2 and Dkk-1 mRNA in CRC cancer tissue was lower than that in adjacent tissues ($t=25.053, 34.053, P<0.001$). The positive rate of FBXL2 and Dkk-1 protein expression in CRC cancer tissue is lower than that in adjacent tissues ($\chi^2=58.134, 51.042, P<0.001$). There was a significant positive correlation between FBXL2 and Dkk-1 protein expression in CRC cancer tissue ($r_s=0.714, P<0.001$). The positive rates of FBXL2 and Dkk-1 protein expression in cancer tissues of patients with stage I to stage II of TNM stage and negative lymph node metastasis were higher than those of patients with stage III of TNM stage and positive lymph node metastasis. The difference was statistically

significant ($\chi^2/P=7.588/0.006, 5.220/0.022$). The 3-year cumulative survival rate of patients with negative FBXL2 expression was significantly lower than that of patients with positive FBXL2 expression ($\chi^2=5.991, P=0.014$). The 3-year cumulative survival rate of DKK-1 negative expression group was significantly lower than that of positive expression group ($\chi^2=8.058, P=0.005$). Tumor stage III, positive lymph node metastasis, negative expression of FBXL2 and negative expression of Dkk-1 were independent risk factors affecting the prognosis of CRC patients [$HR(95\% CI)=1.613(1.223-2.126), 1.917(1.314-2.799), 1.837(1.229-2.745), 1.738(1.246-2.426), P<0.001$]. **Conclusion** The expression of FBXL2 and Dkk-1 in CRC cancer tissue is decreased. The expression of FBXL2 and Dkk-1 is related to the tumor stage and lymph node metastasis of CRC, and is a new tumor marker to evaluate the survival and prognosis of CRC patients.

【Key words】 Colorectal cancer; F-box leucine rich repeat protein 2; Wnt signal pathway inhibitor 1; Clinical prognosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤,全球范围内每年新发病例达 200 万,死亡病例达 90 万例,严重威胁人类健康^[1]。目前临床上, CRC 的治疗以手术、放化疗及靶向治疗为主,特别是新的免疫治疗药物的应用改善了部分患者的临床预后,但对于晚期 CRC 患者,临床生存获益有限^[2]。深入研究 CRC 的机制,寻找新的 CRC 肿瘤标志物,具有重要意义。F-盒富含亮氨酸的重复蛋白 2(F-box and leucine rich repeat protein 2, FBXL2)编码基因位于 3p22.3,编码蛋白属于 F 盒蛋白家族成员,参与构成泛素蛋白连接酶复合体,在蛋白泛素化修饰中起重要作用^[3]。研究表明,FBXL2 在非小细胞肺癌、胃癌等恶性肿瘤中异常表达下调,并通过激活 Wnt 信号通路,促进肿瘤细胞的恶性增殖及转移^[4-5]。Wnt 信号通路抑制剂 1(dickkopf 1, Dkk-1)基因位于 10q21.1,属于 dickkopf 蛋白家族成员,结构上包含 2 个半胱氨酸的结构域,参与机体正常胚胎发育、骨形成等生理过程。研究表明,Dkk-1 在前列腺癌等恶性肿瘤中异常下调,并激活 Wnt 通路促进癌细胞系的增殖、侵袭和生长^[6-7]。本研究通过观察 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 的表达,探讨两者的临床意义,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 10 月—2019 年 5 月保定市第一中心医院普通外科诊治 CRC 患者 75 例作为研究对象。其中,男 41 例,女 34 例,年龄 30~78 (62.5±5.6)岁;肿瘤位置:结肠癌 43 例,直肠癌 32 例;伴有淋巴结转移 20 例;肿瘤直径:≤3 cm 45 例, >3 cm 30 例;肿瘤 TNM 分期:I~II 期 52 例,III 期 23 例;肿瘤分化:高中分化 50 例,低分化 25 例;合并吸烟史 34 例,饮酒史 41 例;既往心脑血管疾病 7 例;CRC 家族史 2 例。本研究经医院伦理委员会审核通过(2017-0214),患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①经病理组织学

检查明确诊断为 CRC;②初次诊治,既往无放化疗等肿瘤治疗;③临床病理和随访资料完整。(2)排除标准:①合并其他恶性肿瘤;②合并感染性疾病,自身免疫性疾病等;③合并严重的心肺功能障碍。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 荧光定量 PCR 检测组织中 FBXL2、Dkk-1 mRNA 表达: Trizol 法提取癌组织及癌旁组织中总 RNA,将总 RNA 反转录为 cDNA 后,进行荧光定量 PCR 反应。引物序列由华大公司设计合成。FBXL2 上游引物:5'-TGGAACATCTTAGCCCTGGAT-3',下游引物:5'-CCACCACTCGACCCTCTACAT-3'; Dkk-1 上游引物:5'-TAGAGGGTCGAGTGGTGGAAA-3',下游引物:5'-TCAAGGAGGAATCCCCAACAC-3'; FBXL2 和 Dkk-1 均以 GAPDH 为内参,上游引物:5'-ATGAGCTTGTGAGCCTCAACT-3',下游引物:5'-CAGCCCTGCATATCTGCAC-3'。PCR 反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,70℃ 30 s,共 40 个循环。反应体系:SYBR Green Master Premix 10 μl,引物 1 μl, cDNA 1 μl 和双蒸水 8 μl。FBXL2、Dkk-1 mRNA 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.3.2 免疫组化法检测 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达:将癌组织和癌旁正常组织用 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋切片,进行免疫组化染色。FBXL2、Dkk-1 兔单克隆抗体一抗稀释比均为 1:400,购自美国 Abcam 公司。DAB 显色,苏木素染核后梯度乙醇脱水,中性树脂封片镜检,镜下进行免疫组化染色评分。

以染色面积评分与染色强度评分乘积表示,染色面积评分:<5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分;染色强度评分:淡黄色为 1 分,黄或深黄色为 2 分,褐色为 3 分。免疫组化染色评分结果 <2 分为阴性,≥2 分判定为阳性。

1.3.3 随访情况:所有研究对象自术后开始定期随访,以门诊复查或电话方式进行随访,术后第 1 年每 3

个月随访 1 次,术后第 2、3 年每 6 个月随访 1 次,随访内容为患者生存情况,随访截至 2022 年 6 月或患者死亡。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 22.0 软件包进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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,组间比较采用独立样本 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 秩相关分析;Kaplan-Meier 生存分析(Log-rank 检验)FBXL2、Dkk-1 蛋白表达对 CRC 患者生存预后的影响;单因素及多因素 COX 回归分析影响 CRC 患者预后的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

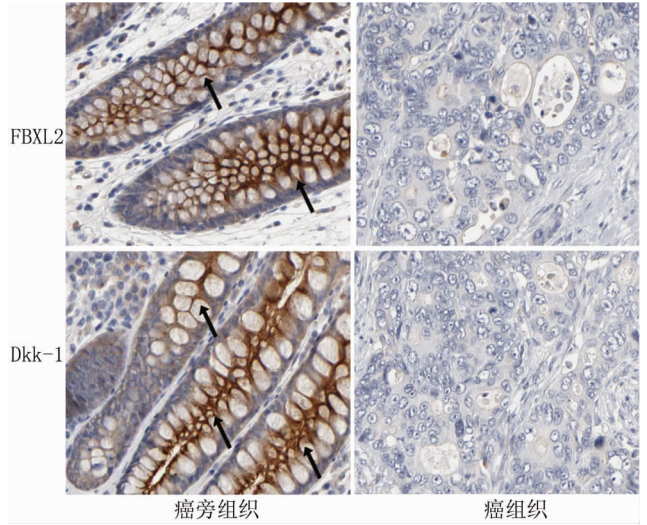
2.1 CRC 癌组织与癌旁组织中 FBXL2、Dkk-1 mRNA 及蛋白表达比较 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 mRNA 的表达分别为 (2.24 ± 0.34) 、 (2.59 ± 0.41) ,显著低于癌旁组织的 (4.16 ± 0.57) 、 (5.48 ± 0.61) ,差异均具有统计学意义($t = 25.053、34.053, P$ 均 < 0.001)。

CRC 癌旁组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白棕黄色阳性染色主要位于腺泡细胞的细胞浆和细胞膜。CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达阳性率分别为 33.33% (25/75)、36.00% (27/75),低于癌旁组织的 93.33% (70/75)、92.00% (69/75),差异均具有统计学意义($\chi^2 = 58.134、51.042, P$ 均 < 0.001),见图 1。

2.2 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达的相关性

Spearman 秩相关分析结果显示,CRC 癌组织中 FBXL2 与 Dkk-1 蛋白表达呈显著正相关($r_s = 0.714, P < 0.001$)。

2.3 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达在不同临床/病理参数中比较 TNM 分期 I ~ II 期、淋巴结转移阴性 CRC 患者癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达阳性率高于 TNM 分期 III 期、淋巴结转移阳性患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),不同性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤分化患者癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白阳性率比较,差异均无明显统计学意义($P > 0.05$)。



注:箭头指示为棕黄色阳性染色,主要定位于癌旁组织中腺泡细胞的细胞浆和细胞膜。

图 1 CRC 癌组织与癌旁组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达比较 (免疫组化染色, ×200)

Fig. 1 Comparison of FBXL2 and Dkk-1 protein expression in CRC cancer tissue and adjacent tissues (immunohistochemical staining, × 200)

表 1 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达在不同临床/病理特征中比较 [例(%)]

Tab. 1 Comparison of FBXL2 and Dkk-1 protein expression in different clinical/pathological features in CRC cancer tissue								
项 目		例数	FBXL2	χ^2 值	P 值	Dkk-1	χ^2 值	P 值
性别	男	41	12 (29.27)	0.673	0.412	14 (34.15)	0.135	0.713
	女	34	13 (38.24)			13 (38.24)		
年龄	≤60 岁	35	15 (42.86)	2.679	0.102	16 (45.71)	2.688	0.101
	>60 岁	40	10 (25.00)			11 (27.50)		
肿瘤大小	≤3 cm	45	17 (37.78)	0.563	0.453	17 (37.78)	0.154	0.694
	>3 cm	30	8 (26.67)			10 (33.33)		
肿瘤位置	结肠癌	43	14 (32.56)	0.518	0.472	13 (30.23)	1.455	0.228
	直肠癌	32	13 (40.63)			14 (43.75)		
肿瘤分化	高中分化	50	18 (36.00)	0.480	0.488	19 (38.00)	0.260	0.610
	低分化	25	7 (28.00)			8 (32.00)		
肿瘤 TNM 分期	I ~ II 期	52	22 (42.31)	6.145	0.013	24 (46.15)	7.588	0.006
	III 期	23	3 (13.04)			3 (13.04)		
淋巴结转移	阳性	20	2 (10.00)	6.682	0.010	3 (15.00)	5.220	0.022
	阴性	55	23 (41.82)			24 (43.64)		

注:FBXL2. F-盒富含亮氨酸的重复蛋白 2;Dkk-1. Wnt 信号通路抑制剂 1。

2.4 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达与生存预后的关系 75 例结直肠癌患者随访过程中,失访 1 例,死亡 25 例。FBXL2 阴性表达组和阳性表达组患者平均生存时间分别为(30.83 ± 3.25)月、(33.27 ± 3.17)月。Dkk-1 阴性表达组和阳性表达组患者的平均生存时间分别为(28.57 ± 3.34)月、(34.63 ± 3.29)月。Kaplan-Meier 生存曲线(Log-rank 检验)分析结果显示,FBXL2 阴性表达组患者 3 年累积生存率明显低于阳性表达组患者(Log-rank $\chi^2 = 5.991, P = 0.014$)。Dkk-1 阴性表达组患者 3 年累积生存率明显低于阳性表达组患者(Log-rank $\chi^2 = 8.058, P = 0.005$),见图 2。

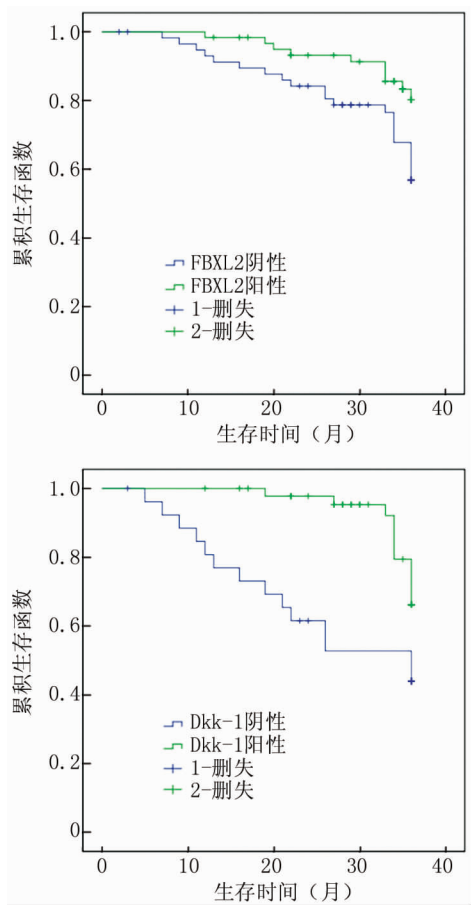


图2 CRC 癌组织中 FBXL2、Dkk-1 蛋白表达与生存预后的关系

Fig. 2 Relationship between FBXL2, Dkk-1 protein expression and survival and prognosis in CRC cancer tissue

2.5 多因素 COX 回归分析影响 CRC 患者生存预后的因素 以 CRC 患者的生存预后为因变量(1 = 死亡, 0 = 存活, t = 生存时间),以上述结果中差异有统计学意义的指标为自变量,多因素 COX 回归分析结果显示,肿瘤 TNM 分期Ⅲ期、淋巴结转移、FBXL2 阴性表

达、Dkk-1 阴性表达是影响 CRC 患者预后的独立危险因素($P < 0.01$),见表 2。

表2 影响 CRC 患者预后的多因素 COX 回归分析
Tab. 2 Multifactor Cox regression analysis of prognosis of CRC patients

因素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	HR 值	95% CI
TNM 分期Ⅲ期	0.478	0.141	11.493	<0.001	1.613	1.223 ~ 2.126
淋巴结转移	0.651	0.193	11.377	<0.001	1.917	1.314 ~ 2.799
FBXL2 阴性表达	0.608	0.205	8.796	<0.001	1.837	1.229 ~ 2.745
Dkk-1 阴性表达	0.553	0.170	10.581	<0.001	1.738	1.246 ~ 2.426

3 讨论

CRC 是我国常见恶性肿瘤,全国每年结直肠癌新发病例数约为 38.76 万,死亡人数约为 18.71 万,严重威胁我国人民健康^[8]。由于早期 CRC 临床症状和体征不典型,难以早期发现,一旦发生肿瘤进展转移,患者的远期生存预后显著降低^[9]。深入研究 CRC 的疾病发生发展机制,寻找能够预测患者临床预后及为临床提供潜在治疗靶点的肿瘤标志物,具有重要的临床意义。

FBXL2 蛋白属于 F 盒蛋白家族成员,具有特征性 F 盒结构域,其作为 SCFs 泛素蛋白连接酶复合体的亚单位之一,能够与富含亮氨酸的重复序列的蛋白相互作用,参与蛋白的泛素化调控。研究表明,FBXL2 在非小细胞肺癌等恶性肿瘤中表达下调,导致表皮生长因子受体的过度激活,促进肿瘤的恶性进展^[4, 10]。Pan 等^[11]在结直肠癌肿瘤细胞系 SW620 和 HCT116 中发现 FBXL2 表达下调,这与本研究中 CRC 癌组织 FBXL2 表达下调结果一致,但本研究在组织水平进一步证实 CRC 中 FBXL2 表达下调,表明 FBXL2 的表达下调可能参与 CRC 的肿瘤发生。FBXL2 表达下调的原因可能与蛋白翻译后修饰异常有关。Ueda 等^[12]研究表明,胃癌中 FBXL2 蛋白存在 O-连接-N-乙酰葡萄糖胺糖基化修饰位点,修饰后 FBXL2 蛋白稳定性降低,导致下游转录因子插头框 M1 的表达升高,促进肿瘤增殖。本研究中,CRC 中 FBXL2 表达与肿瘤分期及淋巴结转移有关,提示 FBXL2 的表达降低参与促进 CRC 的肿瘤进展。其原因与 FBXL2 的表达降低促进 CRC 肿瘤的增殖和侵袭转移能力有关。有学者发现,CRC 肿瘤细胞中 FBXL2 的表达下调导致细胞核中 β -连环蛋白表达水平显著上调, β -连环蛋白可激活下游细胞周期素 D1 和 N-钙黏素等的表达,细胞周期素 D1 能够促进 G1 期向 S 期转换,促进肿瘤细胞过度增殖,而 N-钙黏素的表达能增强肿瘤细胞的侵袭和淋巴转移能

力,共同促进 CRC 的肿瘤进展^[11,13]。因此,CRC 中 FBXL2 的表达降低促进肿瘤的发生发展,可能是新的预后相关肿瘤标志物。本研究通过生存分析证实,CRC 癌组织中 FBXL2 阴性表达患者生存预后较差,是影响 CRC 患者不良预后的独立因素,表明检测 FBXL2 表达有助于评估 CRC 患者的生存预后。分析其原因,一方面是 FBXL2 表达较低的 CRC 患者肿瘤恶性程度高,术后肿瘤复发转移风险较大。另一方面是 FBXL2 表达较低的 CRC 肿瘤细胞对化疗等术后辅助治疗的敏感性较差。Chen 等^[14]报道,FBXL2 的表达下调导致雄激素受体经泛素蛋白酶途径降解减少,雄激素受体的激活能够增强肿瘤细胞对化疗药物替莫唑胺的耐药性,导致患者不良预后。因此,FBXL2 作为一种肿瘤抑制因子,其表达降低导致 CRC 患者肿瘤进展及不良预后。

Dkk-1 属于 Dickkopf 家族成员,结构上富含半胱氨酸蛋白,是一种可溶性 Wnt 信号传导抑制分子。近年来发现,Dkk-1 在肺癌、前列腺癌等恶性肿瘤中表达下调,导致 Wnt 通路的过度激活,增强肿瘤的侵袭和转移能力,促进肿瘤进展^[7,15]。本研究中,CRC 癌组织中 Dkk-1 表达下调,与 Dahlmann 等^[16]利用人类肿瘤基因组图谱数据库中 CRC 数据集分析结果一致,提示 Dkk-1 的表达下调可能参与 CRC 的肿瘤发生。CRC 中 Dkk-1 表达下调与表观遗传学调控异常有关。Kim 等^[17]研究表明,肿瘤中多梳蛋白染色体盒同源物 7 表达升高,其通过与 p300 乙酰基转移酶协同作用增强 Dkk-1 启动子组蛋白乙酰化修饰,抑制 Dkk-1 的表达,激活 Wnt 信号通路,促进肿瘤增殖及转移。此外,本研究 CRC 中 Dkk-1 的表达与肿瘤 TNM 分期及淋巴结转移有关,提示 Dkk-1 表达下调参与促进 CRC 的肿瘤进展。分析其机制,一方面是 Dkk-1 表达下调通过激活 Wnt/ β -连环蛋白通路,促进 CRC 肿瘤细胞的上皮间质转化,增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力,促进肿瘤的淋巴结转移^[18]。另一方面,Dkk-1 作为一种分泌型蛋白,其表达下调能够抑制肿瘤微环境中效应 T 细胞的肿瘤杀伤功能,促进肿瘤细胞免疫逃逸,导致肿瘤的恶性进展^[19]。因此,推测 CRC 中 Dkk-1 表达降低可能有助于评估患者的临床预后。本研究证实,Dkk-1 阴性表达的患者生存预后较差,是影响 CRC 患者生存预后的独立危险因素,表明检测 CRC 癌组织中 Dkk-1 的表达有助于评估 CRC 患者的生存预后。其原因与 Dkk-1 的表达降低可增加 CRC 化疗耐药性有关。有研究表明,Dkk-1 的表达降低通过促进肿瘤干细胞标志物醛脱氢酶 1A1 的表达,增加结直肠癌化疗耐药

性,是预测 CRC 患者化疗敏感性的重要生物标志物。因此,CRC 中 Dkk-1 作为一种肿瘤抑制因子,其表达下调参与促进 CRC 的肿瘤进展,导致 CRC 患者不良预后。

本研究中,CRC 癌组织中 FBXL2 与 Dkk-1 表达呈显著正相关。其原因可能是两者均参与调节 Wnt/ β -连环蛋白通路的调节。研究发现,FBXL2 通过泛素化导致 Smad 泛素化调节因子 1 降解,抑制 Wnt/ β -连环蛋白信号通路^[20],而 Dkk-1 也是该通路的主要抑制因子。因此,CRC 中 FBXL2、Dkk-1 表达下调可通过协同激活 Wnt/ β -连环蛋白信号通路,促进 CRC 肿瘤进展。但目前 FBXL2 与 Dkk-1 在 CRC 中的具体作用机制有待深入探索。

综上所述,CRC 中 FBXL2、Dkk-1 表达降低,两者表达与肿瘤 TNM 分期和淋巴结转移相关,共同促进 CRC 肿瘤的发生发展。CRC 中 FBXL2、Dkk-1 阴性表达的 CRC 患者生存预后较差,是影响 CRC 患者不良预后的独立危险因素,亦是评估 CRC 预后新的肿瘤标志物。但本研究也存在一定的不足之处,样本量有限,未能对不同临床特征的 CRC 患者进行分层分析,有待今后扩大样本量深入研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李 晓 宁:提出研究方向、研究思路,设计研究方案、研究流程,实施研究过程,数据收集、分析整理,设计论文框架,论文撰写;李 小 龙:提出研究思路,分析试验数据、资料搜集整理;宋 瑞:资料搜集整理、分析试验数据、修改论文;张 惠 卿:设计论文框架、论文终审

参考文献

- [1] Baidoun F, Elshiy K, Elkeraie Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: Recent trends and impact on outcomes [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(9): 998-1009. DOI: 10.2174/1389450121999201117115717.
- [2] 张忠涛, 杨盈赤. 结直肠癌外科临床研究进展及展望 [J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(1): 65-69. DOI: 10.19538/j.cjps.issn 1005-2208. 2020. 01. 12.
- [3] Zhang ZT, Yang YC. Clinical research progress and prospect of colorectal cancer surgery [J]. *Chinese Journal of Practical Surgery*, 2020, 40(1): 65-69. DOI: 10.19538/j.cjps.issn 1005-2208. 2020. 01. 12.
- [4] Ren J, Sun M, Zhou H, et al. FUNDC1 interacts with FBXL2 to govern mitochondrial integrity and cardiac function through an IP3R3-dependent manner in obesity [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(38): 1457-1468. DOI: 10.1126/sciadv. abc8561.
- [5] Niu M, Xu J, Liu Y, et al. FBXL2 counteracts Grp94 to destabilize EGFR and inhibit EGFR-driven NSCLC growth [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5919-5928. DOI: 10.1038/s41467-021-26222-x.
- [6] Li Q, Tang H, Hu F, et al. Circular RNA SMARCA5 inhibits gastric cancer progression through targeting the miR-346/FBXL2 axis [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(32): 18277-18284. DOI: 10.1039/c9ra02230a.

- [6] Sadeghi S, Poorebrahim M, Rahimi H, et al. In silico studying of the whole protein structure and dynamics of Dickkopf family members showed that N-terminal domain of Dickkopf 2 in contrary to other Dickkopfs facilitates its interaction with low density lipoprotein receptor related protein 5/6 [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2019, 37 (10) : 2564-2580. DOI: 10. 1080/07391102. 2018. 1491891.
- [7] Supsavhad W, Hassan BB, Simmons JK, et al. Effect of Dickkopf-1 (Dkk-1) and SP600125, a JNK inhibitor, on Wnt signaling in canine prostate cancer growth and bone metastases[J]. *Vet Sci*, 2021, 8(8) : 459-467. DOI: 10. 3390/vetsci8080153.
- [8] 吴春晓, 顾凯, 龚杨明, 等. 2015 年中国结直肠癌发病和死亡情况分析[J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30 (4) : 241-245. DOI: 10. 19401/j. cnki. 1007-3639. 2020. 04. 001.
- [9] 姜志超, 孙永琨, 张雯, 等. 瑞戈非尼治疗晚期结直肠癌患者真实世界数据分析[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100 (26) : 2018-2022. DOI: 10. 3760/cma. j. cn112137-20200424-01304.
- Jiang ZC, Sun YK, Zhang W, et al. Real world data analysis of patients with advanced colorectal cancer treated with regafinil[J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 100 (26) : 2018-2022. DOI: 10. 3760/cma. j. cn112137-20200424-01304.
- [10] Kuchay S, Giorgi C, Simoneschi D, et al. PTEN counteracts FBXL2 to promote IP3R3- and Ca²⁺-mediated apoptosis limiting tumour growth[J]. *Nature*, 2017, 546 (7659) : 554-558. DOI: 10. 1038/nature22965.
- [11] Pan S, Wu W, Ren F, et al. MiR-346-5p promotes colorectal cancer cell proliferation in vitro and in vivo by targeting FBXL2 and activating the β -catenin signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 244 (5) : 1173-1180. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2020. 117300.
- [12] Ueda Y, Moriaki K, Takeuchi T, et al. O-GlcNAcylation-mediated degradation of FBXL2 stabilizes FOXM1 to induce cancer progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521 (3) : 632-638. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2019. 10. 164.
- [13] Mason B, Laman H. The FBXL family of F-box proteins: variations on a theme[J]. *Open Biol*, 2020, 10 (11) : 2003-2019. DOI: 10. 1098/rsob. 200319.
- [14] Chen TC, Chuang JY, Ko CY, et al. AR ubiquitination induced by the curcumin analog suppresses growth of temozolomide-resistant glioblastoma through disrupting GPX4-Mediated redox homeostasis[J]. *Redox Biol*, 2020, 30 (5) : 1014-1023. DOI: 10. 1016/j. redox. 2019. 101413.
- [15] Gan DX, Wang YB, He MY, et al. Lung cancer cells-controlled Dkk-1 production in brain metastatic cascade drive microglia to acquire a pro-tumorigenic phenotype[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8 (2) : 5914-5925. DOI: 10. 3389/fcell. 2020. 591405.
- [16] Dahlmann M, Monks A, Harris ED, et al. Combination of Wnt/ β -catenin targets S100A4 and DKK1 improves prognosis of human colorectal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 14 (1) : 37. DOI: 10. 3390/cancers14010037.
- [17] Kim HY, Park JH, Won HY, et al. CBX7 inhibits breast tumorigenicity through DKK-1-mediated suppression of the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *FASEB J*, 2015, 29 (1) : 300-313. DOI: 10. 1096/fj. 14-253997.
- [18] Wang W, He Y, Rui J, et al. miR-410 acts as an oncogene in colorectal cancer cells by targeting dickkopf-related protein 1 via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17 (1) : 807-814. DOI: 10. 3892/ol. 2018. 9710.
- [19] Guo S, Xiao P, Li B, et al. Co-immunizing with PD-L1 induces CD8⁺ DCs-mediated anti-tumor immunity in multiple myeloma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84 (7) : 1065-1076. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2020. 106516.
- [20] Liu Y, Yue M, Li Z. FOSL1 promotes tumorigenesis in colorectal carcinoma by mediating the FBXL2/Wnt/ β -catenin axis via Smurf1[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165 (90) : 1054-1065. DOI: 10. 1016/j. phrs. 2020. 105405.

(收稿日期: 2022 - 11 - 02)

(上接 376 页)

- [4] Aydin AM, Haberal B, Artykov M, et al. Clinicopathological predictors of positive 68Ga-PSMA-11 PET/CT in PSA-only recurrence of localized prostate cancer following definitive therapy[J]. *Ann Nucl Med*, 2019, 33 (5) : 326-332. DOI: 10. 1007/s12149-019-01340-1.
- [5] Yan P, Wang Y, Meng X, et al. Whole exome sequencing of ulcerative colitis-associated colorectal cancer based on novel somatic mutations identified in Chinese patients[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25 (8) : 1293-1301. DOI: 10. 1093/ibd/izz020.
- [6] Xiong W, Deng Z, Tang Y, et al. Downregulation of KMT2D suppresses proliferation and induces apoptosis of gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504 (1) : 129-136. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2018. 08. 143.
- [7] 那彦群, 叶章群, 孙颖浩, 等. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 62-65.
- [8] 冯小兰, 黄喜健. 前列腺癌组织前列腺特异性抗原、雄激素受体、嗜铬粒蛋白 A 表达与 Gleason 分级的相关性[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2022, 6 (8) : 98-102.
- [9] 陈宏达, 郑荣寿, 王乐, 等. 2019 年中国肿瘤流行病学研究进展[J]. *中华疾病控制杂志*, 2020, 24 (4) : 373-379. DOI: 10. 16462/j. cnki. zhjbkz. 2020. 04. 001.
- [10] 刘云, 甘为, 张正龙, 等. miR-182 在前列腺癌组织中的表达及其对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18 (9) : 1674-1678. DOI: 10. 13241/j. cnki. pmb. 2018. 09. 015.
- [11] Lv S, Wen H, Shan X, et al. Loss of KMT2D induces prostate cancer ROS-mediated DNA damage by suppressing the enhancer activity and DNA binding of antioxidant transcription factor FOXO3[J]. *Epi-genetics*, 2019, 14 (12) : 1194-1208. DOI: 10. 1080/15592294. 2019. 1634985.
- [12] 吕世栋. 组蛋白甲基化转移酶 KMT2D 缺失介导前列腺癌氧化 DNA 损伤的作用和机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [13] Kim TW, Lee YS, Yun NH, et al. MicroRNA-17-5p regulates EMT by targeting vimentin in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123 (7) : 1123-1130. DOI: 10. 1038/s41416-020-0940-5.
- [14] Cosma G, Acampora G, Brown D, et al. Prediction of pathological stage in patients with prostate cancer: A neuro-fuzzy model[J]. *PLoS One*, 2016, 11 (6) : e0155856. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0155856.

(收稿日期: 2022 - 12 - 15)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 009

肿瘤防治专题

结直肠癌患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 Wnt/ β -catenin 信号通路和预后的关系分析

胡立宏, 潘雪峰, 关佳恒, 张倩, 郑国宝

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210613)

作者单位: 471031 洛阳, 中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科

通信作者: 郑国宝, E-mail: zhengguobao123@126.com

【摘要】目的 研究结直肠癌(CRC)患者血清微小 RNA(miR)-21-5p、miR-377-3p 表达及与 Wnt/ β -连环蛋白(catenin)通路及预后的关系。方法 选取 2017 年 1 月—2018 年 1 月中国人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科收治的 CRC 患者 92 例作为 CRC 组, 医院同期健康体检者 60 例作为健康对照组。检测血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量及 Wnt/ β -catenin 通路指标 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、细胞周期素 D1(Cyclin D1)mRNA 表达量。Pearson 相关分析 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达的相关性。比较不同临床病理特征 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达差异。Kaplan-Meier 曲线及 Logrank 检验分析不同血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达 CRC 患者预后的差异。多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素。结果 与健康对照组比较, CRC 组患者血清 miR-21-5p、Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达量显著升高, miR-377-3p 表达量显著降低($t/P = 29.202 / <0.001$, $52.006 / <0.001$, $45.973 / <0.001$, $39.196 / <0.001$, $23.119 / <0.001$, $38.120 / <0.001$)。血清 miR-21-5p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈正相关($r/P = 0.404 / <0.001$, $0.410 / 0.002$, $0.529 / <0.001$, $0.378 / <0.001$), miR-377-3p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈负相关($r/P = -0.347 / 0.007$, $-0.408 / <0.001$, $-0.450 / <0.001$, $-0.419 / <0.001$)。TNM 分期 III ~ IV 期和伴淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达明显高于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 而血清 miR-377-3p 表达明显低于 TNM 分期 I ~ II 期和无淋巴结转移患者, 差异具有统计学意义($t/P = 19.741 / <0.001$, $18.534 / <0.001$, $11.799 / <0.001$, $17.639 / <0.001$)。血清 miR-21-5p 高表达患者 3 年生存率低于低表达患者($\chi^2/P = 17.700 / <0.001$), miR-377-3p 低表达患者 3 年生存率低于高表达患者($\chi^2/P = 21.380 / <0.001$)。多因素 Cox 回归分析显示, 肿瘤 TNM 分期 III ~ IV 期、伴淋巴结转移、miR-21-5p 升高是 CRC 患者预后的独立危险因素[$OR(95\% CI) = 1.875(1.322 \sim 2.662)$ 、 $1.662(1.163 \sim 2.374)$ 、 $1.847(1.366 \sim 2.500)$], miR-377-3p 升高是 CRC 患者预后的独立保护因素[$OR(95\% CI) = 0.518(0.363 \sim 0.739)$]。结论 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达升高, miR-377-3p 表达降低, 两者可通过调控 Wnt/ β -catenin 通路促进 CRC 的肿瘤进展, 可作为辅助评估 CRC 患者预后的肿瘤标志物。

【关键词】 结直肠癌; 微小 RNA-21-5p; 微小 RNA-377-3p; Wnt/ β -catenin 信号通路; 预后【中图分类号】 R735.3⁺5; R735.3⁺7

【文献标识码】 A

Expression of serum miR-21-5p, miR-377-3p in patients with colorectal cancer and the relationship between Wnt/ β -catenin signal pathway and prognosis Hu Lihong, Pan Xuefeng, Guan Jiaheng, Zhang Qian, Zheng Guobao. Department of Oncology, The 989 Hospital of the Joint Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Henan Province, Luoyang 471031, China

Corresponding author: Zheng Guobao, E-mail: zhengguobao123@126.com

Funding program: Henan Medical Science and Technology Research Program(LHGJ20210613)

【Abstract】 Objective To study the expression of serum microRNA(miR)-21-5p, miR-377-3p in patients with colorectal cancer(CRC) and their correlation with Wnt/ β -catenin pathway and prognosis. Methods From January 2017 to January 2018, 92 patients with CRC admitted to the Oncology Department of the 989th Hospital of the Joint Service Support Force of the Chinese People's Liberation Army were selected as the CRC group, and 60 patients undergoing physical examination in the hospital during the same period were selected as the health control group. Detection of serum miR-21-5p, miR-377-3p expression and Wnt/ β -Catenin pathway indicators Wnt3a β -MRNA expression levels of catenin, c-myc, and cyclin

D1. Pearson correlation analysis miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt3a β -Correlation between expression of Catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA. To compare the differences in the expression of miR-21-5p and miR-377-3p in serum of CRC patients with different clinical and pathological characteristics. Kaplan Meier curve and Logrank test were used to analyze the difference in prognosis of patients with CRC with different serum miR-21-5p and miR-377-3p expressions. Multivariate Cox regression analysis was used to analyze the prognostic factors of patients with CRC. **Results** Compared with the healthy control group, the expression levels of serum miR-21-5p, Wnt3a, β -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA were increased, while the expression level of miR-377-3p was decreased in the CRC group ($t/P = 29.202 / < 0.001$, $52.006 / < 0.001$, $45.973 / < 0.001$, $39.196 / < 0.001$, $23.119 / < 0.001$, $38.120 / < 0.001$). Serum miR-21-5p was positively correlated with the expression of Wnt3a, β -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA ($r/P = 0.404 / < 0.001$, $0.410 / 0.002$, $0.529 / < 0.001$, $0.378 / < 0.001$), while miR-377-3p was negatively correlated with the expression of Wnt3a, β -catenin, c-myc, and Cyclin D1 mRNA ($r/P = -0.347 / 0.007$, $-0.408 / < 0.001$, $-0.450 / < 0.001$, $-0.419 / < 0.001$). The serum miR-21-5p expression level in CRC patients with TNM stage III-IV and lymph node metastasis was significantly higher than that in patients with TNM stage I-II and without lymph node metastasis, while the serum miR-377-3p expression level was significantly lower ($t/P = 19.741 / < 0.001$, $18.534 / < 0.001$, $11.799 / < 0.001$, $17.639 / < 0.001$). The 3-year survival rate of patients with high serum miR-21-5p expression was lower than that of patients with low expression ($\chi^2/P = 17.700 / < 0.001$), while the 3-year survival rate of patients with low miR-377-3p expression was lower than that of patients with high expression ($\chi^2/P = 21.380 / < 0.001$). Multivariate Cox regression analysis showed that tumor TNM stage III-IV, lymph node metastasis, and elevated miR-21-5p were independent risk factors for CRC prognosis [$OR(95\% CI) = 1.875 (1.322 - 2.662)$, $1.662 (1.163 - 2.374)$, $1.847 (1.366 - 2.500)$], while elevated miR-377-3p was an independent protective factor [$OR(95\% CI) = 0.518 (0.363 - 0.739)$]. **Conclusion** In patients with CRC, the expression of miR-21-5p in serum increases and the expression of miR-377-3p decreases, both can be regulated by Wnt/ β -Catenin pathway promotes tumor progression in CRC and can be used as a tumor marker to assist in evaluating the prognosis of patients with CRC.

【Key words】 Colorectal cancer; miR-21-5p; miR-377-3p; Wnt/ β -catenin pathway; Prognosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤,全球每年 CRC 新发病例达 180 万,死亡例数达 86 万^[1]。CRC 的治疗以手术治疗、放化疗为主,特别是新辅助化疗能使肿瘤降期降级,提高肿瘤切除率^[2]。但仍有许多患者存在化疗耐药或抵抗的问题^[3]。故寻找能够评估 CRC 预后的肿瘤标志物具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miR) 是长度介于 22 ~ 25 nt 的 RNA 分子,参与细胞分裂、代谢及物质运输等生理过程,其表达失调参与恶性肿瘤的发生与发展^[4]。miR-21-5p 是一种具有肿瘤促进作用的 miRNA,其能够在转录后水平调控 Wnt/ β -连环蛋白(catenin)通路,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[5]。miR-377-3p 是具有肿瘤抑制作用的 miRNA,其表达下调能增加 Cullin-1 mRNA 的稳定性,激活 Wnt/ β -catenin 通路,促进肺癌肿瘤增殖、侵袭和转移^[6]。Wnt/ β -catenin 通路的过度激活是 CRC 发生发展的重要机制, β -catenin 活化入核后能够诱导下游靶基因如 c-myc, 细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 等的表达,促进 CRC 的恶性增殖和转移^[7]。本研究通过检测 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达,研究两者与 Wnt/ β -catenin 通路及预后的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2017 年 1 月—2018 年 1 月中国

人民解放军联勤保障部队第九八九医院肿瘤科收治的 CRC 患者 92 例作为 CRC 组。CRC 组患者均无明显诱因,其中男 52 例,女 40 例,年龄 36 ~ 78 (57.54 ± 8.78) 岁;合并基础疾病:高血压 14 例,糖尿病 7 例;CRC 家族史 2 例;肿瘤最大径:<2 cm 25 例,2 ~ 5 cm 32 例,>5 cm 35 例;肿瘤位置:结肠 60 例(升结肠及横结肠 31 例,降结肠及乙状结肠 29 例),直肠 32 例(上段 10 例,下段 22 例);肿瘤 TNM 分期:I ~ II 期患者 34 例,III ~ IV 期 58 例;肿瘤分化程度:高分化 25 例,中分化 34 例,低分化 33 例;伴淋巴结转移 58 例。医院同期健康体检者 60 例作为健康对照组:男 36 例,女 24 例,年龄 35 ~ 77 (55.94 ± 7.87) 岁。2 组受试者性别、年龄比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。本研究经医院医学伦理委员会批准通过(LQ989HS-20160911C),受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准:①经 HE 染色及免疫组化染色等组织病理学检查确诊为 CRC;②患者均为初次诊治,住院前无肿瘤治疗史;③患者体能状态良好,卡氏(Karnofsky, KPS)评分 > 70 分,无严重的肝肾等脏器功能衰竭。(2) 排除标准:①合并其他器官肿瘤;②合并败血症、肺炎等感染性疾病,类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病;③临床病理及随访资料不完整;④入组前接受放化疗。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量及外周血 Wnt/ β -catenin 通路检测:健康对照组体检时及 CRC 组入院后留取空腹肘静脉血 5 ml,平均分为 2 份,每份 2.5 ml,一份室温条件下应用台式高速离心机(购自德国艾本德公司,型号 5810)离心留取上清液即血清,采用 Trizol 法提取血清总 RNA,保存于 -80°C 冰箱,用于 miR-21-5p、miR-377-3p 检测。另一份全血标本应用 EDTA 抗凝,按照 EasySep 人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离试剂盒(购自北京诺为生物技术有限公司)说明书提取 PBMC,采用 Trizol 法提取 PBMC 中总 RNA(一步法逆转录试剂盒),用于 Wnt/ β -catenin 通路检测。微量分光光度计(购自美国赛默飞公司,型号 Narodrop2000)检测所有样本总 RNA 纯度,OD260/OD280 比值介于 1.8~2.1。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后应用荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(购自美国 ABI 公司,型号: ABI7500)进行荧光定量 PCR 反应($2\times$ SYBR Green PCR Master mix 试剂盒购自北京索莱宝科技公司)。总反应体系 $20\text{ }\mu\text{l}$,包括 $2\times$ SYBR Green10 μl ,逆转录产物 2 μl ,双蒸水 6 μl ,正反向引物各 1 μl 。miR-21-5p、miR-377-3p 反应条件: 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 70°C 延伸 30 s,共 35 次循环。Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 30 s,共 40 次循环。miR-21-5p、miR-377-3p 以 U6 为内参,Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 以 GAPDH 为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 miR-21-5p、miR-377-3p、Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 的表达量。引物序列见表 1。根据血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达量的中位数 2.03、0.92 为临界值,分为 miR-21-5p 高表达($n=44$)和低表达($n=48$),miR-377-3p 高表达($n=47$)和低表达($n=45$)。

1.3.2 治疗方法及随访: CRC 患者的临床治疗参考“中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)”^[8]进行,包括手术治疗和化疗。手术治疗:对于 T1N0M0 分期 CRC 予以局部切除,T2~4N0M0 的 CRC 患者予以根治性切除联合区域淋巴结清扫。自术后 8 周内开始,Ⅱ期伴有高危因素、Ⅲ期 CRC 患者接受术后辅助化疗,采用XELOX 3 周方案,具体方案为:第 1 天:奥沙利铂(艾恒,江苏恒瑞医药股份有限公司), $130\text{ mg}/\text{m}^2$,静脉滴注,维持 2 h 以上;第 1~14 天:卡培他滨片(希罗达,上海罗氏制药有限公司), $1\,000\text{ mg}/\text{m}^2$,口服,每天 2 次。单次治疗疗程为 3 周,完成 8 个疗程。Ⅳ期 CRC 患者化疗方案同上。患者自明确病理诊断后开始随访,随访以电话和门诊复查为主。连续随访 3 年,术后第 1 年每 3 个月随访 1 次,术后第 2、3 年每半年随访 1 次。随访内容为患者血清肿瘤标志物、胸腹盆腔 CT 及电子肠镜等检查,并记录生存时间,即自病理确诊日至末次随访日或患者死亡日。随访截止至随访时间结束(2021 年 1 月 31 日)或患者死亡。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。符合正态性分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验(或校正 t 检验),多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较用独立样本 χ^2 检验。采用 Pearson 相关分析血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达的相关性;Kaplan-Meier 生存曲线及 Logrank 检验分析不同血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达 CRC 患者预后的差异。单因素及多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血清 miR-21-5p、miR-377-3p 及 Wnt/ β -catenin 通路指标比较 与健康对照组比较,CRC 组血清 miR-21-5p、Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 的表达

表 1 各项指标的引物序列
Tab. 1 Primer Sequence

引 物	上游引物	下游引物
miR-21-5p	5'-CGATGTGGGAAGTGGGTACTA-3'	5'-ATCATTTCCATGACGGCCTGT-3'
miR-377-3p	5'-CCATTGCTCAGCTCAAAGTGG-3'	5'-GGGACGAGTAATTCCTTCCCCT-3'
Wnt3a	5'-AGCTACCCGATCTGCTGGTGC-3'	5'-CAAACCTCGATGTCCTCGCTAC-3'
β -catenin	5'-AAGCCAAGGACTGTCTGAACG-3'	5'-GGGACGAGTAATTCCTTCCCCT-3'
c-myc	5'-ATGGCCCCATTACAAAGCCG-3'	5'-TTTCTGGAGTAGCAGCTCCTAA-3'
Cyclin D1	5'-ATGGCGCAGTCTATTAACATCAC-3'	5'-CAGTGGGACGAGTAATTCCTTTCC-3'
U6	5'-GCTGGACCAGATGTATGTCCC-3'	5'-ATCATTTCCATGACGGCCTGT-3'
GAPDH	5'-AATAGAGCTGCTTCGCCTAGA-3'	5'-GAGGTGTTTACTACTGAGCAAG-3'

量升高,miR-377-3p 表达量降低,差异具有统计学意义(P 均 <0.01),见表 2。

2.2 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt/ β -catenin 通路的相关性 CRC 患者血清 miR-21-5p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈正相关(P 均 <0.01)。血清 miR-377-3p 与 Wnt3a、 β -catenin、c-myc、Cyclin D1 mRNA 表达呈负相关(P 均 <0.01),见表 3。

表 3 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 与 Wnt/ β -catenin 通路的相关性

Tab.3 Serum miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt/ β -Correlation of Catenin Pathway

参 数	miR-21-5p		miR-377-3p	
	r 值	P 值	r 值	P 值
Wnt3a	0.404	<0.001	-0.347	0.007
β -catenin	0.410	0.002	-0.408	<0.001
c-myc	0.529	<0.001	-0.450	<0.001
Cyclin D1	0.378	<0.001	-0.419	<0.001

2.3 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与临

床病理特征的关系 TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期和伴淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达明显高于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期和无淋巴结转移患者,而血清 miR-377-3p 表达明显低于 TNM 分期Ⅰ~Ⅱ期和无淋巴结转移患者,差异具有统计学意义(P 均 <0.01)。不同性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置及分化程度 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05),见表 4。

2.4 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 CRC 临床预后的关系 CRC 患者随访 3 年无失访,死亡 29 例,3 年总生存率为 68.48% (63/92)。按各表达分组汇总其生存资料以建立 Kaplan-meier 生存曲线(图 1),并进行生存率比较(Logrank 检验)。患者 3 年总生存率 miR-21-5p 低表达及 miR-377-3p 高表达分别高于 miR-21-5p 高表达及 miR-377-3p 低表达患者,差异具有统计学意义(P 均 <0.01)。见表 5。

2.5 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素 以 CRC 患者预后为因变量(1 = 死亡,0 = 存活,t = 生存时间),以上述结果中 $P <0.05$ 指标 TNM 分期(Ⅲ~Ⅳ

表 2 健康对照组与 CRC 组血清 miR-21-5p、miR-377-3p 及 Wnt/ β -catenin 通路指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Serum miR-21-5p, miR-377-3p, and Wnt in the healthy control group and CRC group/ β -Comparison of Catenin pathway indicators

组 别	例数	miR-21-5p	miR-337-3p	Wnt3a mRNA	β -catenin mRNA	c-myc mRNA	Cyclin D1 mRNA
健康对照组	60	1.10 $\pm$ 0.21	2.14 $\pm$ 0.20	0.77 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.11	0.58 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.14
CRC 组	92	2.06 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.18	3.26 $\pm$ 0.42	2.63 $\pm$ 0.39	2.12 $\pm$ 0.36	2.01 $\pm$ 0.55
t 值		29.202	38.120	52.006	45.973	39.196	23.119
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 CRC 患者血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与临床病理特征的关系

Tab.4 Relationship between the expression of miR-21-5p, miR-377-3p and clinical pathological characteristics in serum of CRC patients

项 目	例数	miR-21-5p	t/F 值	P 值	miR-377-3p	t/F 值	P 值
性别	男	52	2.03 $\pm$ 0.17	1.813	0.073	0.97 $\pm$ 0.16	1.369
	女	40	2.10 $\pm$ 0.20			0.92 $\pm$ 0.19	0.174
年龄(岁)	≥ 60	49	2.04 $\pm$ 0.17	1.009	0.316	0.98 $\pm$ 0.16	1.597
	>60	43	2.08 $\pm$ 0.21			0.92 $\pm$ 0.20	0.114
肿瘤直径(cm)	<2	25	2.02 $\pm$ 0.17	1.017	0.366	0.98 $\pm$ 0.18	0.561
	2~5	32	2.07 $\pm$ 0.16			0.94 $\pm$ 0.16	0.573
	>5	35	2.08 $\pm$ 0.22			0.93 $\pm$ 0.21	
肿瘤位置	升结肠和横结肠	31	2.02 $\pm$ 0.19	0.969	0.411	0.95 $\pm$ 0.14	1.084
	降结肠和乙状结肠	29	2.06 $\pm$ 0.18			0.99 $\pm$ 0.16	1.084
	直肠上段	10	2.08 $\pm$ 0.23			0.89 $\pm$ 0.24	
	直肠下段	22	2.11 $\pm$ 0.24			0.92 $\pm$ 0.23	
分化程度	高分化	25	1.98 $\pm$ 0.22	2.666	0.075	0.98 $\pm$ 0.16	1.214
	中分化	34	2.08 $\pm$ 0.20			0.96 $\pm$ 0.18	0.302
	低分化	33	2.11 $\pm$ 0.25			0.91 $\pm$ 0.20	
TNM 分期	Ⅰ~Ⅱ期	34	1.62 $\pm$ 0.13	19.741	<0.001	1.25 $\pm$ 0.15	11.799
	Ⅲ~Ⅳ期	58	2.32 $\pm$ 0.21			0.77 $\pm$ 0.24	<0.001
淋巴结转移	有	58	2.37 $\pm$ 0.17	18.534	<0.001	0.75 $\pm$ 0.13	17.639
	无	34	1.53 $\pm$ 0.23			1.29 $\pm$ 0.16	<0.001

表 5 血清 miR-21-5p、miR-377-3p 表达与 CRC 临床预后的关系

Tab. 5 Relationship between the expression of miR-21-5p and miR-377-3p in serum and the clinical prognosis of CRC

指 标	例数	3 年生存[例(%)]	χ^2 值	P 值
miR-21-5p 高表达	44	24(54.55)	17.700	<0.001
低表达	48	39(81.25)		
miR-377-3p 高表达	47	41(87.23)	21.380	<0.001
低表达	45	22(48.89)		

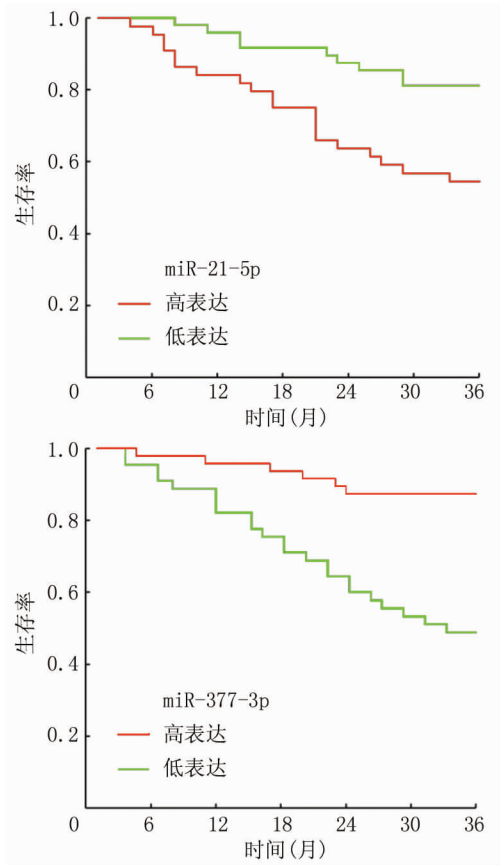


图 1 Kaplan-Meier 曲线分析血清 miR-21-5p、miR-377-3p 对 CRC 患者预后的影响

Fig. 1 Analysis of the Effect of Serum miR-21-5p and miR-377-3p on the Prognosis of CRC Patients by Using the Kaplan Meier Curve

期 vs I ~ II 期)、淋巴结转移(有 vs. 无)、miR-21-5p、miR-377-3p 为自变量进行多因素 Cox 回归分析,结果显示,肿瘤 TNM 分期 III ~ IV 期、伴淋巴结转移、miR-21-5p 升高是影响 CRC 患者预后的独立危险因素,miR-377-3p 升高是影响 CRC 患者预后的独立保护因素(P 均 <0.01),见表 6。

3 讨 论

目前临床上对 CRC 患者预后评估主要根据 TNM 分期、病理分级等指标,但由于肿瘤的异质性,即使相

表 6 多因素 Cox 回归分析 CRC 患者预后的影响因素

Tab. 6 Multivariate Cox Regression Analysis of Factors Influencing the Prognosis of CRC Patients

因 素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
TNM III ~ IV 期	0.629	0.179	12.407	<0.001	1.875	1.322 ~ 2.662
淋巴结转移	0.508	0.182	7.796	0.005	1.662	1.163 ~ 2.374
miR-21-5p 高	0.614	0.154	15.835	<0.001	1.847	1.366 ~ 2.500
miR-377-3p 高	-0.658	0.181	13.179	<0.001	0.518	0.363 ~ 0.739

同肿瘤分期分级的 CRC 患者临床预后差异较大^[8]。血清肿瘤标志物是肿瘤组织在肿瘤发生发展过程中相关基因异常表达的肿瘤抗原或生物活性物质,可以在血清等体液中检出。目前临床上常用的 CRC 血清肿瘤标志物包括癌胚抗原、糖类抗原 19-9 等,但均存在诊断的敏感度和特异度不高的局限,对 CRC 临床预后评估价值有限^[9-11]。有研究发现,CRC 患者中存在大量 miRNA 异常表达上调或下调的现象,并通过影响肿瘤细胞中磷脂酰肌醇-3 激酶/AKT 通路,Wnt/ β -catenin 通路的信号传导,参与 CRC 疾病的发生发展^[12-13]。miRNA 能够被分泌到血清中并被检测到,是理想的血清肿瘤标志物。因此,寻找 CRC 中能影响肿瘤进展及预后的关键 miRNA 及其相应的分子机制,对有针对性制定临床治疗方案和改善预后具有重要意义。

miR-21-5p 编码基因位于 17q23.1,由 RNA 聚合酶 II 转录并剪切成熟,参与构成 RNA 诱导的沉默复合物的形成。近年来发现,miR-21-5p 作为单链 RNA 分子,能够在转录后调控原癌基因和抑癌基因的表达,参与胰腺癌等恶性肿瘤的发生、发展^[14],是新的肿瘤标志物。本研究中,CRC 患者血清中 miR-21-5p 表达上调,这与既往学者报道结果一致^[15],提示 miR-21-5p 可能作为一种肿瘤促进因子,参与促进 CRC 的肿瘤发生发展。CRC 中 miR-21-5p 的表达升高可能与表观遗传学修饰有关。研究发现,肿瘤发生时 miR-21-5p 的 3' 末端的 2'-羟基位点发生甲基化修饰,导致 miR-21-5p 稳定性增加,miR-21-5p 的表达上调通过进一步抑制程序性细胞死亡因子 4 的表达,促进肿瘤的过度增殖^[16]。He 等^[17]报道,CRC 癌组织中 miR-21-5p 的表达上调,这与本研究中 CRC 患者血清 miR-21-5p 表达上调一致。笔者分析,CRC 癌组织中 miR-21-5p 的表达升高能够通过外泌体等途径释放到细胞外,从而在血清中被检测到,可能是一种新的 CRC 肿瘤标志物。本研究中合并淋巴结转移 CRC 患者血清 miR-21-5p 水平较高,推测其原因是 miR-21-5p 参与促进 CRC 淋巴转移的发生。实验研究证实,CRC 肿瘤细胞分泌产生的 miR-21-5p 能够与抑制脐静脉血管内皮及淋巴管

上皮细胞中 Krev 相互作用蛋白 1 的表达,促进血管内皮生长因子的表达,诱导肿瘤血管及淋巴管生成并增加管壁通透性,促进 CRC 肿瘤细胞的血行及淋巴转移^[17]。本研究中,Wnt/ β -catenin 通路各基因表达升高,这与既往研究报道一致^[18],提示 CRC 中存在 Wnt/ β -catenin 通路激活的现象。本研究发现,miR-21-5p 与 Wnt/ β -catenin 通路基因表达呈显著正相关,提示 CRC 中 miR-21-5p 可通过激活 Wnt/ β -catenin 通路,促进 CRC 的肿瘤进展。分析其原因,miR-21-5p 的表达上调能够抑制 Wnt/ β -catenin 通路中的负调控因子磷酸酯酶与张力蛋白同源物的表达,继而激活 Wnt/ β -catenin 通路中 Wnt3a、 β -catenin 的表达,促进肿瘤细胞的侵袭和迁移^[19]。c-myc、Cyclin D1 作为 Wnt/ β -catenin 通路的重要下游效应因子,c-myc 能够抑制 CRC 肿瘤细胞分化及细胞凋亡,而 Cyclin D1 参与促进肿瘤细胞 G1/S 期进行,均导致 CRC 肿瘤过度增殖^[20]。本研究中,miR-21-5p 表达与 CRC 患者的不良生存预后相关,提示 miR-21-5p 表达升高导致 CRC 患者不良生存预后。推测其原因,可能是 miR-21-5p 的表达升高参与 CRC 肿瘤耐药性的形成。有学者报道,miR-21-5p 过表达的 CRC 肿瘤细胞通过下调蛋白酶体途径基因的表达,增强对拓扑异构酶抑制剂阿霉素和依托泊苷等化疗药物的耐药性形成,导致患者不良预后^[21]。

miR-377-3p 编码基因位于 14q32.31。近年来发现,miR-377-3p 作为一种肿瘤抑制因子,在胃癌等恶性肿瘤中表达下调,是新的肿瘤相关标志物^[22]。本研究中,CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低,与 Liu 等^[23]在 CRC 癌组织中 miR-377-3p 表达降低报道一致,提示 miR-377-3p 表达降低参与 CRC 发生。推测其原因,miR-377-3p 表达降低与长链非编码 RNA 的调控有关。研究发现,长链非编码 RNA SNHG1 能够作为分子支架,结合并抑制 miR-377-3p 的表达及功能,激活 miR-377-3p 的直接下游靶点 AKT2,促进肿瘤细胞无限增殖^[24]。此外,本研究中合并淋巴结转移的 CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低,表明 miR-377-3p 表达降低促进 CRC 肿瘤淋巴结转移。此外,本研究中 III ~ IV 期 CRC 患者血清 miR-377-3p 表达降低更为明显,表明血清 miR-377-3p 越低,CRC 的肿瘤恶性程度越高。有学者发现,卵巢癌中 miR-377-3p 的表达下调导致其直接作用靶点基质金属蛋白酶 16 表达上调,基质金属蛋白酶 16 通过降解肿瘤细胞外基质,促进肿瘤细胞侵袭和淋巴结转移^[25]。本研究中,miR-377-3p 的表达与 Wnt/ β -catenin 通路基因表达呈显著负相关,提示 CRC 患者 miR-377-3p 表达下调可通过激活 Wnt/ β -

catenin 通路,促进 CRC 的恶性进展。既往研究证实,CRC 患者肿瘤细胞中 miR-377-3p 的表达降低能导致其下游靶点 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白 (XIAP) mRNA 稳定性增加,XIAP 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的正调节因子,能够激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,上调下游靶基因如 c-myc、Cyclin D1 等的表达,促进 CRC 肿瘤增殖和转移^[26]。因此,推测 miR-377-3p 降低参与促进 CRC 肿瘤进展,可能影响患者的生存预后。本研究证实,血清 miR-377-3p 表达降低与 CRC 患者的不良预后相关。推测其原因,可能是由于 miR-377-3p 作为一种抑癌基因,其表达降低通过激活 Jaks 相关激酶 2 的表达,增强癌细胞对顺铂等化疗药物的耐药性,进而促进肿瘤的增殖和转移^[27]。因此,CRC 患者血清 miR-377-3p 的表达降低通过促进 CRC 肿瘤的恶性进展及耐药性形成,导致患者不良预后。

综上所述,CRC 患者血清 miR-21-5p 表达升高,miR-377-3p 表达降低,两者表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移有关。CRC 中 miR-21-5p 表达升高,miR-377-3p 降低可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路,促进 CRC 的肿瘤进展。血清 miR-21-5p 升高,miR-377-3p 降低是影响 CRC 患者不良生存预后的独立危险因素,是 CRC 预后评估的潜在血清肿瘤标志物。但本研究尚存在一定的不足之处,本研究样本量有限,今后需设计多中心大样本临床试验进一步研究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

胡立宏:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写与修改;潘雪峰:实施研究过程,资料搜集整理;关佳恒、张倩:进行数据处理及统计学分析;郑国宝:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] 刘睿,吕雨桐,姜翠红,等.艾迪注射液联合 XELOX 方案对晚期结直肠癌患者 Th1/Th2 免疫平衡和血清肿瘤标志物的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22 (5): 872-875, 885. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.015.
- Liu R, Lyu YT, Jiang CH, et al. Effect of Aidi injection combined with XELOX regimen on Th1/Th2 immune balance and serum tumor markers in patients with advanced colorectal cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2022, 22 (5): 872-875, 885. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.05.015.
- [3] Cercek A, Dos Santos Fernandes G, Roxburgh CS, et al. Mismatch repair-deficient rectal cancer and resistance to neoadjuvant chemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26 (13): 3271-3279. DOI: 10.

- 1158/1078-0432.
- [4] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662. DOI: 10.1242/dmm.047662.
- [5] Liu F, Li T, Zhan X. Silencing circular RNAPTPN12 promoted the growth of keloid fibroblasts by activating Wnt signaling pathway via targeting microRNA-21-5p[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 3503-3515. DOI:10.1080/21655979.2022.2029108.
- [6] Liang K, Liao L, Liu Q, et al. microRNA-377-3p inhibits osteosarcoma progression by targeting CUL1 and regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(11): 2350-2357. DOI:10.1007/s12094-021-02633-6.
- [7] Bian J, Dannappel M, Wan C, et al. Transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2125. DOI:10.3390/cells9092125.
- [8] 国家卫生计生委医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(10): 961-973. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2015.10.001. State Health and Family Planning Commission, Oncology Branch of the Chinese Medical Association. Chinese colorectal cancer diagnosis and treatment standard (2015 version) [J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2015, 18(10): 961-973. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2015.10.001.
- [9] 李程, 闫柯, 霍斌亮, 等. 结直肠癌不同病理特征患者化疗前后循环肿瘤 DNA 水平变化及预后预测的列线图模型构建[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(6): 566-570, 581. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.06.003. Li C, Yan K, Huo BL, et al. Construction of a nomogram model for changes in circulating tumor DNA levels before and after chemotherapy in patients with colorectal cancer with different pathological characteristics and prognosis prediction[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(6): 566-570, 581. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.06.003.
- [10] 高艳红, 李华, 赵金来, 等. 多基因表达与结直肠癌患者病理特征对预后的风险模型构建分析[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(9): 938-943. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.09.010. Gao YH, Li H, Zhao JL, et al. Analysis of risk model construction of polygene expression and pathological characteristics of patients with colorectal cancer for prognosis[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(9): 938-943. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.09.010.
- [11] Zhu HQ, Wang DY, Xu LS, et al. Diagnostic value of an enhanced MRI combined with serum CEA, CA19-9, CA125 and CA72-4 in the liver metastasis of colorectal cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20(1): 401-409. DOI:10.1186/s12957-022-02874-x.
- [12] 王璐, 孙小虎, 白静慧, 等. miR-584 下调 CCN2 对结直肠癌 SW1116 细胞增殖、侵袭的影响及机制研究[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(1): 17-23. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.004. Wang L, Sun XH, Bai JH, et al. Effect of miR-584 down regulating CCN2 on proliferation and invasion of colorectal cancer SW1116 cells and its mechanism[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(1): 17-23. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.004.
- [13] Wang W, Zhang J, Fan Y, et al. MiR-1306-5p predicts favorable prognosis and inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(14): 1491-1501. DOI:10.1080/15384101.2022.2054245.
- [14] Mortoglou M, Miralles F, Arisan ED, et al. microRNA-21 regulates stemness in pancreatic ductal adenocarcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1275. DOI:10.3390/ijms23031275.
- [15] Kudelova E, Holubekova V, Grendar M, et al. Circulating miRNA expression over the course of colorectal cancer treatment[J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(1): 18. DOI:10.3892/ol.2021.13136.
- [16] Liang H, Jiao Z, Rong W, et al. 3'-Terminal 2'-O-methylation of lung cancer miR-21-5p enhances its stability and association with Argonaute 2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(13): 7027-7040. DOI: 10.1093/nar/gkaa504.
- [17] He Q, Ye A, Ye W, et al. Cancer-secreted exosomal miR-21-5p induces angiogenesis and vascular permeability by targeting KRIT1[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 576. DOI:10.1038/s41419-021-03803-8.
- [18] Beni FA, Kazemi M, Dianat-Moghadam H, et al. MicroRNAs regulating Wnt signaling pathway in colorectal cancer: Biological implications and clinical potentials[J]. *Funct Integr Genomics*, 2022, 22(6): 1073-1088. DOI:10.1007/s10142-022-00908-x.
- [19] Chen J, Zhou C, Li J, et al. miR-21-5p confers doxorubicin resistance in gastric cancer cells by targeting PTEN and TIMP3[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1855-1866. DOI:10.3892/ijmm.2018.3405.
- [20] Wang J, Cai H, Liu Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 703-718. DOI: 10.1142/S0192415X20500354.
- [21] Chen JC, Hsieh YY, Lo HL, et al. In vitro and in silico mechanistic insights into miR-21-5p-mediated topoisomerase drug resistance in human colorectal cancer cells[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 467. DOI:10.3390/biom9090467.
- [22] Shi C, Liu T, Chi J, et al. LINC00339 promotes gastric cancer progression by elevating DCPIA expression via inhibiting miR-377-3p[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23667-23674. DOI:10.1002/jcp.28934.
- [23] Liu WY, Yang Z, Sun Q, et al. miR-377-3p drives malignancy characteristics via upregulating GSK-3 β expression and activating NF- κ B pathway in hCRC cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2124-2134. DOI:10.1002/jcb.26374.
- [24] Xie M, Zhang Z, Cui Y. Long noncoding RNA SNHG1 contributes to the promotion of prostate cancer cells through regulating miR-377-3p/AKT2 axis[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(2): 109-119. DOI:10.1089/cbr.2019.3177.
- [25] Wang H, Qi C, Wan D. MicroRNA-377-3p targeting MMP-16 inhibits ovarian cancer cell growth, invasion, and interstitial transition[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(2): 124. DOI:10.21037/atm-20-8027.
- [26] Huang L, Liu Z, Hu J, et al. MiR-377-3p suppresses colorectal cancer through negative regulation on Wnt/ β -catenin signaling by targeting XIAP and ZEB2[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104774. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104774.
- [27] Zang R, Qiu X, Song Y, et al. Exosomes mediated transfer of Circ_0000337 contributes to cisplatin (CDDP) resistance of esophageal cancer by regulating JAK2 via miR-377-3p[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(7): 673237. DOI:10.3389/fcell.2021.673237.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.010

肿瘤防治专题

宫颈液基细胞学 p16 及其联合高危 HPV 检测在宫颈癌和癌前病变筛查中的诊断价值

赵芳, 马德勇, 王婷婷, 张岩, 董颖, 赵健

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2020AAA0105200)

作者单位: 100035 北京积水潭医院妇产科(赵芳); 100034 北京大学第一医院妇产科(马德勇、张岩、赵健), 病理科(董颖); 100191 北京大学医学部(王婷婷)

通信作者: 赵健, E-mail: jianzhao@pku.edu.cn

【摘要】目的 评价宫颈液基细胞学检测 p16 及其联合高危人乳头状瘤病毒(HR-HPV)检测在宫颈癌和癌前病变筛查中的诊断价值。方法 选取 2018 年 1 月—2019 年 8 月在北京大学第一医院妇产科就诊并接受液基细胞学 p16、液基细胞学检查(LBP)、高危 HPV 检测的女性 900 例分析筛查结果,阳性患者转诊阴道镜活检。根据活检病理结果,评估不同筛查策略对宫颈高级别病变的识别效能。结果 p16 表达阳性率随细胞学严重程度和宫颈病变程度的加重而升高。p16 识别高级别病变的敏感度和阴性预测值最高,分别为 0.969、0.995;LBP 敏感度最低(0.853),但特异度最高(0.859);HR-HPV 阳性预测值和准确率最低,分别为 0.328、0.700,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HPV + LBP、p16 + HPV 2 种联合筛查模式敏感度分别为 0.969、0.992。特异度分别为 0.634、0.643,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 单独 p16、p16 + HPV 均可以高效识别宫颈高级别病变。p16 方便易操作,有助于简化筛查策略,具有更好的推广和实际临床应用价值。

【关键词】 宫颈高级别病变;宫颈癌;生物标志物;液基细胞学检测;p16;高危型人乳头状瘤病毒

【中图分类号】 R737.33 【文献标识码】 A

Diagnostic value of cervical liquid-based cytology p16 and its combination with high-risk HPV detection in screening cervical cancer and precancerous lesions Zhao Fang*, Ma Deyong, Wang Tingting, Zhang Yan, Dong Ying, Zhao Jian.

* Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Corresponding author: Zhao Jian, E-mail: jianzhao@pku.edu.cn

Funding program: National Key Research and Development Plan Funded Project (2020AAA0105200)

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of cervical liquid-based cytology detection p16 and its combination with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) detection in screening cervical cancer and precancerous lesions. Methods Select 900 women who received liquid-based cytology p16, liquid-based cytology (LBP) and high-risk HPV test in the Department of Obstetrics and Gynecology of Peking University First Hospital from January 2018 to August 2019 to analyze the screening results. Positive patients were referred to colposcopy biopsy. According to the pathological results of biopsy, evaluate the recognition efficiency of different screening strategies for high-level cervical lesions. Results The positive rate of p16 expression increased with the severity of cytology and the severity of cervical lesions. P16 has the highest sensitivity and negative predictive value for identifying high-level lesions, 0.969 and 0.995 respectively. LBP has the lowest sensitivity (0.853), but the highest specificity (0.859). HR-HPV positive predictive value and accuracy rate were the lowest, 0.328 and 0.700 respectively, with statistically significant difference ($P < 0.05$). The sensitivity of HPV + LBP and p16 + HPV combined screening modes was 0.960 and 0.992 respectively. The specificity was 0.634 and 0.643 respectively, with no significant difference ($P > 0.05$). Conclusion p16 and p16 + HPV alone can effectively identify high-level cervical lesions. p16 is convenient and easy to operate, helps to simplify the screening strategy, and has better promotion and practical clinical application value.

【Key words】 High-grade cervical lesions; Cervical cancer; Biomarkers; Liquid based cytology test; p16; HR-HPV

宫颈癌是由持续高危型人乳头状瘤病毒(HR- HPV)感染在内的多因素促成的疾病,尽管可以通过

疫苗接种、筛查和治疗癌前病变预防大部分宫颈癌,但该疾病仍然严重威胁中低收入国家的女性健康^[1-2]。我国积极响应世界卫生组织提出全球消除宫颈癌号召,在全国范围开展部署宫颈癌综合防治策略,尤其对 70% 的年龄 35 ~ 45 岁女性采取优化、精准、高效的筛查手段,最少的投入筛查出尽可能多的目标患者是降低宫颈癌病死率的关键^[3]。目前,基于液基细胞学检查(LBP)的缺点,如标本制做质量、细胞学病理医师的能力不足导致重复性差,漏诊率高,世界范围内宫颈癌的初筛正在从细胞学检测转变为 HR-HPV 检测。尽管 HR-HPV 检测有优异的阴性预测价值^[4],但特异度差,HR-HPV 在人群的感染率高,且不能区别一过性感染和持续感染,也不能客观反映疾病的严重程度,而导致过多转诊阴道镜检查 and 过度治疗^[5]。因此临床迫切需要可以反映 HR-HPV 致病性且特异度更高的生物学标志物的出现。

在细胞周期调控起关键作用的 p16(肿瘤抑制蛋白 p16INK4a),可延缓细胞自 G1 期进入 S 期进程,在 HR-HPV 感染的转化细胞中与 E7 结合进而抑癌能力失活,p16 过度表达,成为肿瘤转化指标。近年来 p16 作为宫颈癌和癌前病变生物学标志物,因其具有较高的敏感度和特异度而备受关注^[6]。

本研究应用新型液基细胞 p16 免疫细胞化学检测方法,对大样本的宫颈癌筛查液基细胞学检查剩余标本进行 p16 染色检测,比较液基细胞免疫组织化学 p16 与 HR-HPV、细胞学检查对癌前病变和宫颈癌的诊断效能,以及对对应现阶段以 HR-HPV 为筛查主导策略,评价不同联合筛查策略的效能,报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究人群 选取 2018 年 1 月—2019 年 8 月在北京大学第一医院妇产科就诊的 900 例女性,纳入标准:要求进行宫颈癌筛查的门诊就诊,年龄 21 ~ 69 岁。排除标准:除外妊娠、哺乳期,宫颈病变或宫颈癌手术史、放化疗史、宫颈手术史(包括子宫次全切术后);除外严重感染性外阴、阴道疾病或严重内外科疾病患者。本研究获得医院伦理委员会批准(20180104)。所有受试者均能够且自愿完成筛查所有流程,并签署知情同意书。妇科检查前,向筛查者进行有关人口特征等一般情况、妇产科相关疾病病史简短问卷调查,随后由妇科医师进行妇科检查并分别采集 2 份宫颈脱落细胞样本。第一份细胞刷收集,进行宫颈脱落液基细胞学检查和液基细胞学 p16 检测,第二份样本进行 HR-HPV 检测。

1.2 液基细胞学检查 采用美国的 SurePath 液基细

胞学系统(BD Diagnostics, Tripath, Burlington, NC)设备完成制染程序,玻片由经验丰富的细胞学医师进行阅片,按照 2014 年新修订的 TBS 标准进行判读^[7]。细胞学结果为不明确意义的非典型鳞状细胞(ASC-US⁺)及以上病变被认定为异常,或本研究中 LBP 阳性。异常的细胞学玻片由经验丰富的细胞学医师进行复验。

1.3 液基细胞 p16 检测 采用全自动免疫细胞染色机(JY-6000)和配套的 p16 抗体检测试剂盒(广州江元医疗科技有限公司生产)对 LBP 样本剩余的保存液制备第二张玻片并免疫染色。光学显微镜下,p16 阳性定义为:1 个或以上宫颈上皮细胞胞浆和细胞核呈棕黄色或细胞浆棕黄色。未见棕黄色着色为阴性。所有标本均由同一名经验丰富的细胞学诊断医师阅片诊断。

1.4 HR-HPV 检测 采用 HHM-2 型医用核酸分子快速杂交仪和 HPV 分型检测试剂盒(中国潮州凯普生物技术有限公司生产),应用 HybriMax 技术对所有样本进行 15 种常见的高危型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68)和 6 种低危型 HPV 检测。15 种高危型中的 1 个或多个型别检测结果阳性则为 HR-HPV 检测阳性。15 种 HR-HPV 均为阴性判读为阴性。

1.5 阴道镜检查及活检、组织病理学检查 阴道镜转诊指征:(1) LBP 阴性,但 HPV16 和/或 18 型阳性;(2) LBP 为 ASC-US 且 HR-HPV 阳性;(3) LBP 检测结果 ASC-US⁺;(4) 妇科检查时肉眼观察宫颈异常形态,如不对称或异常增生均转诊阴道镜。由经验丰富的阴道镜医师进行阴道镜检查,并根据阴道镜检查所见取活检:(1) 阴道镜检查满意在发现异常处至少 2 点活检;(2) 阴道镜结果不满意或者阴道镜结果满意但有 HPV 16、18 型感染或细胞学超过非典型鳞状细胞的高度病变,则在 3、6、9、12 点处进行多点活检;(3) 未发现明确病变,但可见部分区域血液循环丰富,则在血运丰富的区域活检,必要时包括宫颈管内膜诊刮(ECC)或内膜诊刮。

由 2 位专门的高年资病理医师对常规 HE 染色的切片判读阅片。每例标本均行 p16 和 Ki67 免疫组化染色(Roche 上海生产的抗 p16 鼠单克隆抗体;Dako 抗 Ki67 鼠单克隆抗体)。依照 2014 年第四版 WHO 女性生殖器肿瘤分类标准诊断术语进行判读^[8],组织学结果分为阴性、CIN I、CIN II、CIN III 和宫颈癌。

1.6 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件,采用描述性统计分析一般情况,计数资料用频数或率(%)描

述,采用 χ^2 检验或 Mantel-Haenszel 法评估不同变量的关系;比较不同检测筛查策略识别高级别病变效能,统计敏感度和特异度、阴性和阳性预测值、准确率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究人群的基本特征 符合纳入标准的女性共 900 例,年龄为 21 ~ 69 (40.57 ± 10.77) 岁。p16 阳性率为 23.56% (212/900),略低于以细胞学诊断为 ASC-US⁺ 为阈值的细胞学异常率 24.22% (218/900)。在不同细胞学检查结果中,p16 的阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 423.052, P < 0.001$),从正常(normal)到 ASC-US、低度原位腺癌(LSIL)、高度原位腺癌(HSIL),随着细胞学诊断级别的上升,p16 的阳性率呈上升趋势。细胞学正常者中,p16 阳性率为 8.94%,LSIL 患者为 50.00%,而 HSIL 患者为 98.55%,见表 1。在不同组织病理学结果中,p16 的阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 571.598, P < 0.001$),随着宫颈病变程度的加重,p16 的阳性率呈增高趋势。900 例受试

者中,正常者 p16 阳性率为 14.62% (31/667) LSIL 患者为 26.42% (56/104),CIN II 患者为 98.11 (52/53) 和 CIN III 患者为 95.77% (68/71),5 例癌症患者为 100%,p16 从组织学病理 LSIL 到癌变呈现增加的相似趋势,见表 2。

表 1 900 例受试者不同液基细胞学 p16 的阳性情况
Tab.1 The positive status of p16 in different liquid-based cytology of 900 examinees

LBP	例数	p16 阳性	
		例数	%
normal	682	61	8.94
ASC-US	74	29	39.19
LSIL	34	17	50.00
ASC-H	35	33	94.29
HSIL	69	68	98.55
AGC-NOS/FN	6	4	66.67
合计	900	212	23.56

注:normal. 正常组织;ASC-US. 意义不明确的非典型鳞状上皮细胞;LSIL. 低级别鳞状上皮内病变;ASC-H. 不除外高级别鳞状上皮内病变;HSIL. 高级别上皮内病变;AGC-NOS/FN. 非典型腺细胞/未分类。

表 2 900 例受试者 LBP、HR-HPV、p16 结果的组织病理学分布 [例(%)]
Tab.2 Histopathological distribution of LBP, HR-HPV, p16 results in 900 patients

筛查方法		例数	组织病理学结果				
			正常	LSIL(CIN I、炎性反应等)	CIN II	CIN III	癌
LBP	normal	682	605(88.71)	58(8.50)	10(1.47)	7(1.03)	2(0.29)
	ASC-US	74	42(56.76)	20(27.03)	4(5.41)	8(10.81)	0
	LSIL	34	15(44.12)	8(23.52)	7(20.59)	4(11.76)	0
	ASC-H	35	3(8.57)	8(22.86)	10(28.57)	13(37.14)	1(2.86)
	HSIL	69	2(2.90)	6(8.70)	21(30.43)	39(56.52)	1(1.45)
	AGC-NOS/FN	6	0	4(66.67)	1(16.67)	0(0.00)	1(16.67)
HR-HPV	阳性	356	168(47.19)	71(19.94)	47(13.20)	68(19.10)	2(0.56)
	阴性	544	499(91.73)	33(6.07)	6(1.10)	3(0.55)	3(0.55)
p16	阳性	212	31(14.62)	56(26.42)	52(24.53)	68(32.08)	5(2.36)
	阴性	688	636(92.44)	48(6.98)	1(0.15)	3(0.44)	0
合计		900	667(74.11)	104(11.56)	53(5.89)	71(7.89)	5(0.56)

注:LSIL. 低度上皮内瘤变;CIN I. 宫颈上皮内瘤变 I 级;CIN II. 宫颈上皮内瘤变 II 级;CIN III. 宫颈上皮内瘤变 III 级。LBP 与组织病理学比较,Mantel-Haenszel $\chi^2 = 474.124, P < 0.001$;p16 与组织病理学比较, $\chi^2 = 571.598, P < 0.001$;HPV 与组织病理学比较, $\chi^2 = 244.210, P < 0.001$ 。

表 3 各种检测方法单独筛查效能比较
Tab.3 Comparison of individual screening effectiveness of various detection methods

检测方法		临床诊断(例)*		敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
		HSIL ⁺	HSIL ⁻				
p16	阳性	125	87	0.969	0.887	0.590	0.994
	阴性	4	684				
LBP	阳性	110	108	0.853	0.860	0.505	0.972
	阴性	19	663				
HR-HPV	阳性	117	239	0.907	0.690	0.329	0.978
	阴性	12	532				

注:* 诊断中的阳性,指组织病理学为 HSIL⁺ (包括 HSIL、AIS、SCC、CADC 及其他恶性病变)病例;阴性指包括未取活检(阴道镜检查为未见异常和未见可疑异常情况),或组织病理学为慢性宫颈炎和 LSIL、息肉及各种良性增生病变的病例。

2.2 p16、HPV、LBP 三种筛查方法单独筛查效能比较
对检测宫颈 HSIL⁺ 病变, p16 的敏感度和阴性预测值最高, 分别为 0. 969 和 0. 994; LBP 敏感度最低(0. 853), 但特异度次高(0. 860), 低于 p16 的特异度; HR-HPV 阳性预测值和准确率最低, 分别为 0. 329 和 0. 700, 见表 3。

2.3 HPV + LBP、HPV + p16 两种筛查方案效能比较
HPV + LBP、HPV + p16 两种联合筛查模式, 敏感度分别为 0. 969、0. 992, 特异度分别为 0. 634、0. 643。HPV + LBP、HPV + p16 筛查方案对 HSIL⁺ 的筛查敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值比较, 差异无统计学意义(*P* 均 > 0. 05), 见表 4。

3 讨论

p16 作为多肿瘤抑制基因与宫颈癌的发生、发展及预后密切相关^[9], p16 是通过降调蛋白激酶活性, 直接参与调控细胞周期, 抑制细胞增殖分裂, 进而达到抑癌作用。细胞未感染状态时, p16 发挥抗增殖抑癌作用而不被免疫组化方法检测到, 但被持续高危 HPV 病毒基因整合转化的鳞状上皮细胞内, 病毒释放 E6、E7 蛋白与宿主抑癌的 p53、pRb 蛋白结合使其失活, 细胞增殖、新生血管进而癌变, 此时可以检测到 p16 高度表达。因此, p16 作为持续 HPV 感染转化的生物学标志物, 在细胞形态学发生异常之前检测出病变细胞, 实现早期诊断。研究表明, p16 在宫颈癌和高级别宫颈癌前病变中高表达, 而在炎症反应和低级别病变中呈低表达^[10], 并且 p16 表达随着宫颈病变的严重程度而升高。p16 蛋白检测已被普遍应用于宫颈活检组织病理学中, 作为提高 CIN 诊断准确性的辅助手段。尤其在仅凭形态学诊断判读困难或疑惑的病例, 通常将 p16 作为区分标准, p16 阴性样本归为 LSIL, p16 阳性样本归为 HSIL^[11]。研究表明, p16 具有非常优良的 HPV 阳性患者的分流价值, 并且 p16 蛋白的高表达代表了病毒活动整合活性, 反映细胞恶变增殖的能力, 预示恶性肿瘤的侵袭性, p16 阳性可用来警示疾病进展高风险, 指导高级别病变的预后^[12-13]。本研究发现 900 例

女性中, 细胞学正常者中 p16 阳性 61 例(8. 94%), LSIL 者中 p16 阳性 17 例(50. 00%), HSIL 者中 p16 阳性 68 例(98. 55%), 可见随着细胞学诊断级别的上升, p16 的阳性率呈一致性的增高趋势。

p16、LBP 和 HR-HPV 对高级别病变的阴性预测值都超过 95%。与 HR-HPV 比较, 本研究中 p16 检测对宫颈 HSIL⁺ 病变的敏感度和阴性预测值(分别为 0. 969 和 0. 994)均优于 HR-HPV(0. 907 和 0. 978), 而 p16 的特异度为 0. 887, 远高于 HR-HPV 检测的 0. 690, 与文献报道一致^[14]。本研究的 p16 与 LBP 检测相比, p16 的特异度(0. 887)甚至略优于现行常见筛查方法中 LBP 的特异度(0. 860), 与 Song 等^[15]的研究相似, 但敏感度 0. 969 远超 LBP 的 0. 853。

本研究发现, HR-HPV 检测对宫颈 HSIL⁺ 病变的阳性预测值仅为 0. 328, 是 3 种单独筛查效能中最低的, 且具有不能识别持续 HPV 感染, 受 HPV 分型方式的影响, 临床操作分流复杂等缺点, 单独用于宫颈癌筛查有明显的局限性。几乎所有 HPV 阳性的宫颈癌和高级别病变出现 p16 阳性表达^[16], 因此鉴于本研究数据, p16 的特异度和敏感度均优于 HR-HPV 和 LBP, 且 p16 与宫颈疾病高度正相关, 作为筛查高级别病变的有效监测指标是行之有效的^[17-18]。但目前由于 p16 检测尚未普及, 评估 p16 作为筛查指标的文献较少, 研究结果也有一定差异, 尚待进一步大数据研究结果证实明确。

与传统的 HPV + LBP 比较, HPV + p16 筛查方案效能差异无统计学意义(*P* > 0. 05), 尽管 p16 具有理想的敏感度和特异度, 但有些标本因萎缩、化生的鳞状细胞、LSIL 也会表达 p16 导致特异度达不到 0. 900^[19]。随着宫颈癌联合筛查模式的不断更新探索, 更多的有 p16 参与的筛查模式应用于宫颈癌的筛查, 另有多项研究也证实无论单独使用 p16 还是 p16 与 HPV 联合使用, 都提高了检出高级病变的检出率, 可用于在宫颈癌筛查中分流管理 HR-HPV 阳性的女性^[20-22]。

本研究中 HPV + LBP、HPV + p16 2 种联合筛查模

表 4 两种联合筛查方案对 HSIL⁺ 病变的筛查能力比较
Tab. 4 Comparison of screening capabilities of two combined screening schemes for HSIL + lesions

筛查方案		组织病理学结果		敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
		HSIL ⁺	HSIL ⁻				
HPV + LBP 检测 (<i>n</i> = 900)	阳性	125	282	0. 969	0. 634	0. 307	0. 992
	阴性	4	489				
HPV + p16 检测 (<i>n</i> = 900)	阳性	128	275	0. 992	0. 643	0. 318	0. 998
	阴性	1	496				
χ^2 值				0. 816	0. 101	0. 061	0. 820
<i>P</i> 值				0. 366	0. 750	0. 805	0. 365

式对 HSIL 的筛查能力比较,敏感度分别为 0.969 和 0.992,特异度分别为 0.634 和 0.643,尽管相比较差异无统计学意义,但没有 LBP 参与的联合筛查方案 HPV + p16 的特异度和敏感度依然高于 LBP + HPV。LBP 作为初筛手段,无创、快捷、特异度高,在宫颈癌早期筛查中发挥了重要的作用。但由于取材因素差异、制片染色过程质控不足及阅片医师主观性和经验水平差异,出现重复性差、敏感度低 [0.729 (0.707 ~ 0.750)]^[23]、漏诊和误诊率高等问题。尤其漏诊容易发生在腺癌和鳞状细胞学诊断在 HSIL 以下者^[24],而 p16 取自 LBP 剩余标本,由同一病理医师阅片,使用技术革新的 JY-6000 全自动检测系统,免疫细胞化学染色方法,制片背景清晰,干扰少、对比度高,对 p16 结果判读基于简单的颜色判断,不依赖病理医师,相比 LBP 更为数字化、客观,弥补了 LBP 的不足,有替代 LBP 可能性。与组织学 p16 的检测相比较,组织学 p16 标本需要有创的阴道镜下活检,不能作为筛查手段。

总之,评价一个生物学筛查指标是否高效,重要的因素就是能否提供最大限度的检出例数,精准明确的目标人群,从而减少不必要的干预或治疗,减少医疗资源浪费。至今没有一种筛查方法或者联合筛查方案能做到不漏诊和“零”风险,任何筛查方法和联合方案的选择都是基于风险与获益之间的平衡。p16 表达与 HR-HPV 致癌基因作用直接相关,有很好的宫颈癌前病变和宫颈癌的预测能力,并且与疾病严重程度呈正相关,且具有上述的诸多优势,无论是操作流程还是结果判读的便捷性方面,还是识别高级别病变能力方面,均显示了更好的效能,因此具有更好的推广和实际临床应用价值,尤其在医疗资源有限的偏远地区更具需求。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

赵芳:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;马德勇、董颖、赵健:提出研究思路,论文审核;王婷婷:整理数据,统计学分析;张岩:资料收集整理,文献研究整理,论文修改

参考文献

- [1] Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: A global health crisis [J]. *Cancer*, 2017, 123 (13): 2404-2412. DOI: 10.1002/cncr.30667.
- [2] Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8 (2): e191-e203. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30482-6.
- [3] WHO. Comprehensive cervical cancer prevention and control: A healthier future for girls and women [J]. Geneva Switzerland WHO, 2013, 28(3): 271-272.
- [4] 张玉敏,张师前.持续性高危型人乳头瘤病毒感染的处理 [J]. 中

国实用妇科和产科杂志, 2020, 30(7): 588-592. DOI: 10.19538/j.fk2020070104.

- [5] Nijhuis ER, Nathalie RP, Wisman GBA, et al. An overview of innovative techniques to improve cervical cancer screening [J]. *Cell Oncol*, 2006, 28 (5-6): 233-246. DOI: 10.1155/2006/273547.
- [6] Tabrizi SN, Tan SE, von Knebel Doeberitz C, et al. Evaluation of P16INK4a immunostaining for the detection of high-grade changes in cervical cytology [J]. *Pathology*, 2015, 47 (4): 314-319. DOI: 10.1097/PAT.0000000000000249.
- [7] Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for reporting cervical cytology: A historical perspective [J]. *Acta Cytol*, 2017, 61 (4-5): 359-372. DOI: 10.1159/000477556.
- [8] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, et al. WHO Classification of tumours of Female Reproductive Organs [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014: 170-171.
- [9] Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, et al. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 42 (1): 53. DOI: 10.1186/1916-0216-42-53.
- [10] Duangkaew P, Tapaneeayakorn S, Apiwat C, et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on dual signal amplification processes for p16 (INK4a) cervical cancer detection in clinical samples [J]. *Bioelectron*, 2015, 74 (3): 673-679. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.004.
- [11] Darragh TM, Colgan TJ, Thomas CJ, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136 (10): 1266-1297. DOI: 10.5858/arpa.LGT200570.
- [12] Rokita W, Skawhlski D, Zmelonek-Znamirska A, et al. Results of pap smears and immunoocytochemical detection of the p16 and Ki67 proteins in women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical Cancer [J]. *Ginekologia Polska*, 2012, 83 (11): 822-826.
- [13] Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, et al. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2 + /CIN3 + in triage of women with minor abnormal cytology [J]. *Cancer Cytopathol*, 2019, 127 (3): 169-180. DOI: 10.1002/ency.22103.
- [14] Denton K, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16INK4a Cytology versus HPV Testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASC-US and LSIL pap cytology results [J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 134 (1): 12-21. DOI: 10.1309/AJCP3CD9YKYFJDQL.
- [15] Song F, Du H, Xiao A, et al. Evaluating the performance of P16INK4a immunocytochemistry in cervical cancer screening [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 9067-9075. DOI: 10.2147/CMAR.S273079.
- [16] Ishikawa M, Fuji T, Saito M, et al. Over expression of P16 as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 (1): 347-353. DOI: 10.1111/j.1525-1438.2006.00355.x. (下转 401 页)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 011

肿瘤防治专题

乳腺癌组织中 UEV1A、UBE2N 表达与上皮间质转化的关系及临床预后价值

吴欣妍, 林小龙, 王健宝, 黄心瑜, 唐仁梅

基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目(18A200073)

作者单位: 571400 海南省琼海市人民医院/海南省东部区域医疗中心乳腺甲状腺外科

通信作者: 王健宝, E-mail: 406243640@qq.com

【摘要】目的 分析乳腺癌组织中泛素结合酶变体 1A (UEV1A)、泛素连接酶 E2N (UBE2N) 的表达与上皮间质转化(EMT)基因表达的相关性及临床预后意义。方法 选取 2016 年 2 月—2017 年 2 月琼海市人民医院/海南省东部区域医疗中心乳腺甲状腺外科诊治的乳腺癌患者 124 例为研究对象。采用实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌组织和癌旁组织中 UEV1A、UBE2N 及 EMT 通路基因 E-钙黏蛋白 (E-cad)、N-钙黏蛋白 (N-cad)、波形蛋白 (Vim)、Snail mRNA 的表达;免疫组化法检测组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白水平。比较不同临床病理特征乳腺癌患者癌组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白水平差异。采用 Pearson 相关分析和 Spearman 秩相关分析乳腺癌组织中 UEV1A、UBE2N mRNA 与 EMT 相关基因表达的相关性,以及癌组织 UEV1A 与 UBE2N 蛋白水平的相关性。Kaplan-Meier 生存分析 UEV1A、UBE2N 蛋白水平对乳腺癌患者生存预后的影响。多因素 Cox 回归分析影响乳腺癌患者生存预后的因素。结果 乳腺癌组织 UEV1A、UBE2N 及 N-cad、Vim、Snail mRNA 表达高于癌旁组织, E-cad mRNA 表达低于癌旁组织 ($t/P = 28.803 / <0.001, 48.654 / <0.001, 54.411 / <0.001, 46.213 / <0.001, 27.273 / <0.001, 22.228 / <0.001$)。癌组织中 UEV1A、UBE2N mRNA 表达与 N-cad、Vim、Snail mRNA 呈正相关 (UEV1A: $r = 0.694, 0.702, 0.806, P$ 均 <0.001 ; UBE2N: $r = 0.717, 0.756, 0.803, P$ 均 <0.001), 与 E-cad 呈负相关 ($r = -0.741, -0.756, P$ 均 <0.001)。乳腺癌组织 UEV1A、UBE2N 蛋白表达阳性率高于癌旁组织 ($\chi^2/P = 68.896 / <0.001, 64.851 / <0.001$); 癌组织中 UEV1A 与 UBE2N 蛋白表达呈显著正相关 ($r/P = 0.785 / <0.001$)。肿瘤 T2 ~ T4 期、有淋巴结转移乳腺癌患者癌组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白表达阳性率分别高于 T1 期、无淋巴结转移患者 (UEV1A: $\chi^2/P = 29.803 / <0.001, 4.015 / 0.045$; UBE2N: $\chi^2/P = 7.038 / 0.008, 8.572 / 0.003$)。UEV1A 阳性表达患者 5 年总体生存率低于阴性表达患者 ($\chi^2/P = 5.085 / 0.024$), UBE2N 阳性表达患者 5 年总体生存率低于阴性表达患者 ($\chi^2/P = 8.391 / 0.004$)。肿瘤 T2 ~ T4 期、合并淋巴结转移、UEV1A 阳性、UBE2N 阳性是影响乳腺癌患者生存预后的独立危险因素 [$OR(95\% CI) = 1.777 (1.299 \sim 2.432), 1.613 (1.193 \sim 2.181), 1.838 (1.302 \sim 2.596), 1.735 (1.224 \sim 2.459), P$ 均 <0.001]。结论 乳腺癌组织 UEV1A、UBE2N 表达升高,二者与肿瘤分期及淋巴结转移有关,是影响乳腺癌患者预后的独立危险因素。

【关键词】 乳腺癌;泛素结合酶变体 1A;泛素连接酶 E2N;上皮间质转化;预后

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Relationship between expression of UEV1A, UBE2N and epithelial mesenchymal transformation in breast cancer and its clinical prognostic value Wu Xinyan, Lin Xiaolong, Wang Jianbao, Huang Xinyu, Tang Renmei. Department of Breast and Thyroid Surgery, Qionghai People's Hospital/Hainan Eastern Regional Medical Center, Hainan Province, Qionghai 571400, China

Corresponding author: Wang Jianbao, E-mail: 406243640@qq.com

Funding program: Hainan Health and Family Planning Industry Scientific Research Project (18A200073)

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between the expression of ubiquitin binding enzyme variant 1A (UEV1A), ubiquitin ligase E2N (UBE2N) and the expression of epithelial mesenchymal transformation (EMT) gene in breast cancer and its clinical prognostic significance. Methods One hundred and twenty-four breast cancer patients diagnosed and treated by Qionghai People's Hospital/Hainan Eastern Regional Medical Center from February 2016 to February 2017 were selected as the study subjects. The expressions of UEV1A, UBE2N and EMT pathway genes E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), vim and Snail mRNA in breast cancer tissues and adjacent tissues were detected by real-time fluorescent

quantitative PCR; Immunohistochemical method was used to detect the levels of UEV1A and UBE2N proteins in tissues. To compare the difference of UEV1A and UBE2N protein levels in breast cancer patients with different clinicopathological characteristics. Pearson correlation analysis and Spearman rank correlation analysis were used to analyze the correlation between UEV1A, UBE2N mRNA and EMT related gene expression in breast cancer tissues, as well as the correlation between UEV1A and UBE2N protein levels in cancer tissues. Kaplan Meier survival analysis: The impact of UEV1A and UBE2N protein levels on the survival and prognosis of breast cancer patients. Multivariate Cox regression analysis of factors affecting the survival and prognosis of breast cancer patients. **Results** UEV1A, UBE2N, N-cad, Vim, and Snail mRNA expression in breast cancer tissues were higher than those in adjacent noncancerous tissues, while E-cad mRNA expression was lower than that in adjacent noncancerous tissues ($t/P=28.803/<0.001$, $48.654/<0.001$, $54.411/<0.001$, $46.213/<0.001$, $27.273/<0.001$, $22.228/<0.001$). UEV1A and UBE2N mRNA expression were positively correlated with N-cad, Vim, and Snail mRNA expression in cancer tissues (UEV1A: $r=0.694, 0.702, 0.806, P<0.001$ for all; UBE2N: $r=0.717, 0.756, 0.803, P<0.001$ for all), and negatively correlated with E-cad mRNA expression ($r=-0.741, -0.756, P<0.001$ for both). The positive expression rate of UEV1A and UBE2N proteins in breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent noncancerous tissues ($\chi^2/P=68.896/<0.001$, $64.851/<0.001$); there was a significant positive correlation between UEV1A and UBE2N protein expression in cancer tissues ($r/P=0.785/<0.001$). The positive expression rate of UEV1A and UBE2N proteins in breast cancer tissues was higher in patients with T2-4 stage and lymph node metastasis than in those with T1 stage and without lymph node metastasis (UEV1A: $\chi^2/P=29.803/<0.001$, $4.015/0.045$; UBE2N: $\chi^2/P=7.038/0.008$, $8.572/0.003$). Breast cancer patients with positive UEV1A expression had a lower 5-year overall survival rate than those with negative expression ($\chi^2/P=5.085/0.024$), and those with positive UBE2N expression had a lower 5-year overall survival rate than those with negative expression ($\chi^2/P=8.391/0.004$). T2-4 stage, lymph node metastasis, positive UEV1A expression, and positive UBE2N expression were independent risk factors affecting the survival prognosis of breast cancer patients [$OR(95\%CI)=1.777(1.299-2.432)$, $1.613(1.193-2.181)$, $1.838(1.302-2.596)$, $1.735(1.224-2.459), P<0.001$ for all]. **Conclusion** The expression of UEV1A and UBE2N in breast cancer tissue is increased, which are related to tumor stage and lymph node metastasis, and are independent risk factors affecting the prognosis of breast cancer patients.

【Key words】 Breast cancer; Ubiquitin binding enzyme variant 1A; Ubiquitin ligase E2N; Epithelial mesenchymal transformation; Prognosis

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤,全球每年新发 226 万例^[1]。晚期患者由于肿瘤转移、耐药等因素,导致不良预后^[2]。泛素结合酶变体 1A (ubiquitin-conjugating enzyme variant 1A, UEV1A) 参与调节细胞周期、细胞分化等过程^[3]。Wu 等^[4]报道,乳腺癌中 UEV1A 的过表达能激活 AKT 通路,促进肿瘤增殖。泛素连接酶 E2N (ubiquitin conjugating enzyme E2N, UBE2N) 是一种 E2 泛素结合酶,参与 DNA 损伤修复、内质网应激等过程^[5]。研究表明,UBE2N 能够激活机体致癌先天免疫信号通路,促进急性髓系白血病的进展^[6]。乳腺癌与上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 有关,细胞丧失上皮性表型,向间质性表型转化,肿瘤细胞的侵袭和转移能力增强^[7]。现检测乳腺癌中 UEV1A、UBE2N 的表达与 EMT 的相关性及其对临床预后的意义,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2016 年 2 月—2017 年 2 月琼海市人民医院/海南省东部区域医疗中心乳腺甲状腺外科诊治的乳腺癌患者 124 例为研究对象。患者均为女

性,年龄 33 ~ 75 (58.4 ± 6.1) 岁;组织学分级:1 级 ~ 2 级 78 例,3 级 46 例;肿瘤直径: ≤ 3 cm 70 例, > 3 cm 54 例;肿瘤 T 分期:T1 期 38 例,T2 ~ T4 期 86 例;雌激素受体 (ER) 阳性 85 例,孕激素受体 (PR) 阳性 88 例,人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 阳性 27 例;分子分型:Luminal A 型 47 例,Luminal B 型 40 例,HER-2 型 20 例,三阴型 17 例。本研究经医院伦理委员会批准 (20151108),患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准:①所有患者均接受乳腺癌改良根治术或乳腺癌保乳根治术治疗,经术后病理检查确诊为乳腺浸润性导管癌;②初次诊断和治疗,术前无新辅助放化疗治疗史;③临床及随访资料完整。(2) 排除标准:①妊娠、哺乳期女性;②合并其他部位恶性肿瘤;③合并急性乳腺炎、乳腺脓肿等感染性疾病。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 荧光定量 PCR 检测 UEV1A、UBE2N 及 EMT 通路基因 mRNA 表达:术中留取患者乳腺癌和癌旁组

织约 40 mg,液氮中研磨,离心留取上清。采用 Trizol 法提取组织中总 RNA,微量分光光度计(Nano-drop1000,美国赛默飞公司)检测总 RNA 纯度,OD260/OD280 比值 1.8~2.1。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行荧光定量 PCR 反应。PrimeScript RT Reagent 试剂盒购自日本 Takara 公司。SYBR GREEN Master Mix 试剂盒购自北京索莱宝公司。ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。引物由华大公司设计合成。总反应体系 20 μl,包括 2×SYBR Green 10 μl,逆转录产物 2 μl,双蒸水 6 μl,正反向引物各 1 μl。反应条件:95℃ 预变性 5 min、95℃ 变性 30 s、40℃ 退火 40 s、70℃ 延伸 30 s,变性退火延伸共 35 次循环。以 GAPDH 为内参,采用相对定量 2^{-ΔΔCT}法计算 UEV1A、UBE2N 及 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-cad)、波形蛋白(Vimentin, Vim)、Snail mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.2 免疫组化检测 UEV1A、UBE2N 蛋白表达:术中留取乳腺癌和癌旁组织约 100 mg,常规 10% 中性甲醛固定 12 h,石蜡包埋切片,UEV1A、UBE2N 一抗稀释比均为 1:1 000,按照常规免疫组化染色步骤染色。UEV1A 兔多克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司。UBE2N 兔抗人单克隆抗体购自 Abcam 公司。中性树脂封片显微镜(日本 OLYMBUS, BX53 显微镜, ×200)下观察染色情况,并进行免疫组化染色评分=染色强度×染色面积,染色强度:0 分为无染色,1 分为浅黄色,2 分为棕褐色;染色面积:0 分为 <25%,1 分为 25%~50%,2 分为 >50%,免疫组化染色评分 <2 分

为阴性,≥2 分为阳性。

1.3.3 随访情况:所有研究对象自确诊日起开始以门诊或电话方式进行定期随访,第 1 年每 3 个月随访 1 次,第 2 年开始每半年随访 1 次,随访截至 2022 年 3 月 1 日。随访内容为患者生存情况及生存时间。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用配对 *t* 检验,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;各指标间相关性分析采用 Pearson 相关分析及 Spearman 秩相关分析;Kaplan-Meier(Log-rank 检验)生存分析 UEV1A、UBE2N 蛋白表达对乳腺癌患者生存预后的影响;多因素 Cox 回归分析影响乳腺癌患者预后的因素。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌与癌旁组织 UEV1A、UBE2N 及 EMT 相关基因 mRNA 表达比较 乳腺癌组织 UEV1A、UBE2N 及 N-cad、Vim、Snail mRNA 表达高于癌旁组织,E-cad mRNA 表达低于癌旁组织,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),见表 2。

2.2 癌组织中 UEV1A、UBE2N 与 EMT 相关基因 mRNA 表达的相关性 乳腺癌组织中 UEV1A mRNA 表达与 N-cad、Vim、Snail mRNA 表达呈正相关(*r* = 0.694、0.702、0.806, *P* 均 < 0.001),与 E-cad 呈明显负相关(*r* = -0.741, *P* < 0.001)。癌组织中 UBE2N mRNA 表达与 N-cad、Vim、Snail mRNA 表达呈正相关(*r* = 0.717、0.756、0.803, *P* 均 < 0.001),与 E-cad 呈负相关(*r* = -0.756, *P* < 0.001)。

表 1 UEV1A、UBE2N 及 EMT 通路基因引物序列
Tab.1 UEV1A, UBE2N, and EMT pathway gene primer sequences

引物	上游引物	下游引物
UEV1A	5'-GCCCTAGACGAAC TGGGTC-3'	5'-GGCTGCAACTGCCTAATGAG-3'
UBE2N	5'-CGAACTGGACACACATACAGTG-3'	5'-CTGAGGATCTCTGCTTGTTGTTG-3'
E-cad	5'-TGTGACAAGGAATATCTGAGCC-3'	5'-TGAGCCCTCAGATTTGACCTG-3'
N-cad	5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3'	5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3'
Vim	5'-ACTGCAACAAGGAATACCTCAG-3'	5'-GCACTGGTACTTCTTGACATCTG-3'
Snail	5'-ACTGCGACAAGGAGTACACC-3'	5'-GACTGCGTTTGCAGATGGG-3'
GAPDH	5'-TGTGACAAGGAATATCTGAGCC-3'	5'-TGAGCCCTCAGATTTGACCTG-3'

表 2 乳腺癌与癌旁组织 UEV1A、UBE2N 及 EMT 相关基因 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of mRNA expression of UEV1A, UBE2N and EMT related genes between breast cancer and adjacent tissues							
组别	<i>n</i>	UEV1A	UBE2N	E-cad	N-cad	Vim	Snail
癌旁组织	124	1.14 ± 0.34	0.93 ± 0.29	2.16 ± 0.68	0.65 ± 0.11	0.58 ± 0.09	0.62 ± 0.14
癌组织	124	3.27 ± 0.75	4.16 ± 0.68	0.77 ± 0.15	2.63 ± 0.39	2.12 ± 0.36	2.01 ± 0.55
<i>t</i> 值		28.803	48.654	22.228	54.411	46.213	27.273
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 乳腺癌组织与癌旁组织 UEV1A、UBE2N 蛋白表达比较 乳腺癌组织中, UEV1A、UBE2N 蛋白阳性染色位于细胞质和细胞膜,部分位于细胞核。乳腺癌组织 UEV1A 蛋白表达阳性率为 62. 10% (77/124), 高于癌旁组织的 11. 29% (14/124) ($\chi^2 = 68. 896, P < 0. 001$); 乳腺癌组织 UBE2N 蛋白表达阳性率为 64. 52% (80/124), 高于癌旁组织的 14. 52% (18/124) ($\chi^2 = 64. 851, P < 0. 001$)。见图 1。Spearman 秩相关分析结果显示, 癌组织中 UEV1A 与 UBE2N 蛋白表达呈显著正相关($r = 0. 785, P < 0. 001$)。

2.4 UEV1A、UBE2N 蛋白表达在不同临床病理特征乳腺癌患者中比较 肿瘤 T2 ~ T4 期、有淋巴结转移乳腺癌患者癌组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白表达阳性率高于 T1 期、无淋巴结转移, 差异有统计学意义(P 均 $< 0. 05$), 不同年龄、肿瘤直径、组织学分级、ER、PR、HER-2 及分子分型乳腺癌组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白表达阳性率比较, 差异均无统计学意义($P > 0. 05$), 见表 3。

2.5 UEV1A、UBE2N 蛋白表达与乳腺癌患者生存预后的关系 124 例乳腺癌患者, 随访 4 ~ 60 个月, 随访期间无失访, 死亡 29 例, 5 年总体生存率为 76. 61% (95/124)。UEV1A 阳性表达患者 5 年总体生存率为 70. 13% (54/77), 低于阴性表达患者的 87. 23% (41/47), 差异有统计学意义($\chi^2 = 5. 085, P = 0. 024$); UBE2N 阳性表达患者为 68. 75% (55/80), 低于阴性

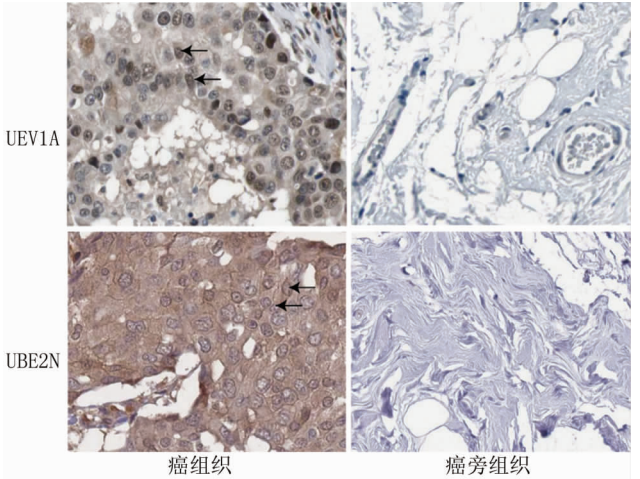


图 1 乳腺癌及癌旁组织中 UEV1A、UBE2N 蛋白表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

Fig. 1 UEV1A, UBE2N protein expression in breast cancer and adjacent tissues (immunohistochemical staining, $\times 200$)

表达患者的 90. 91% (40/44), 差异有统计学意义($\chi^2 = 8. 391, P = 0. 004$)。见图 2。

2.6 影响乳腺癌患者生存预后的多因素 Cox 回归分析 以乳腺癌患者随访期间是否发生死亡为因变量, 以上述结果中 $P < 0. 05$ 项目为自变量, 纳入多因素 Cox 回归分析, 结果显示, 肿瘤 T2 ~ T4 期、合并淋巴结转移、UEV1A 阳性、UBE2N 阳性是影响乳腺癌患者生存预后的独立危险因素($P < 0. 01$), 见表 4。

表 3 UEV1A、UBE2N 蛋白表达在乳腺癌不同临床病理特征中比较 [例(%)]

Tab. 3 Comparison of UEV1A and UBE2N protein expression in different clinicopathological characteristics of breast cancer								
项 目		例数	UEV1A 阳性	χ^2 值	P 值	UBE2N 阳性	χ^2 值	P 值
年龄	<60 岁	72	41 (56. 94)	1. 936	0. 164	43 (59. 72)	1. 724	0. 189
	≥ 60 岁	52	36 (69. 23)			37 (71. 15)		
T 分期	T1 期	38	10 (26. 32)	29. 803	<0. 001	18 (47. 37)	7. 038	0. 008
	T2 ~ T4 期	86	67 (77. 91)			62 (72. 09)		
肿瘤直径	≥ 3 cm	70	40 (57. 14)	1. 676	0. 195	47 (67. 14)	0. 484	0. 486
	<3 cm	54	37 (68. 52)			33 (61. 11)		
组织学分级	3 级	46	32 (69. 57)	1. 733	0. 188	33 (71. 74)	1. 667	0. 197
	1 ~ 2 级	78	45 (57. 69)			47 (60. 26)		
淋巴结转移	有	67	47 (70. 15)	4. 015	0. 045	51 (76. 12)	8. 572	0. 003
	无	57	30 (52. 63)			29 (50. 88)		
ER	阳性	85	55 (64. 71)	0. 782	0. 377	54 (63. 53)	0. 115	0. 735
	阴性	39	22 (56. 41)			26 (66. 67)		
PR	阳性	88	56 (63. 64)	0. 305	0. 581	57 (64. 77)	0. 009	0. 926
	阴性	36	21 (58. 33)			23 (63. 89)		
HER-2	阳性	27	13 (48. 15)	2. 853	0. 091	17 (62. 96)	0. 036	0. 849
	阴性	97	64 (65. 98)			63 (64. 95)		
分子分型	Luminal A 型	47	30 (63. 83)	2. 446	0. 485	32 (68. 09)	0. 554	0. 907
	Luminal B 型	40	22 (55. 00)			23 (57. 50)		
	HER-2 型	20	12 (60. 00)			14 (70. 00)		
	三阴型	17	13 (76. 47)			11 (74. 71)		

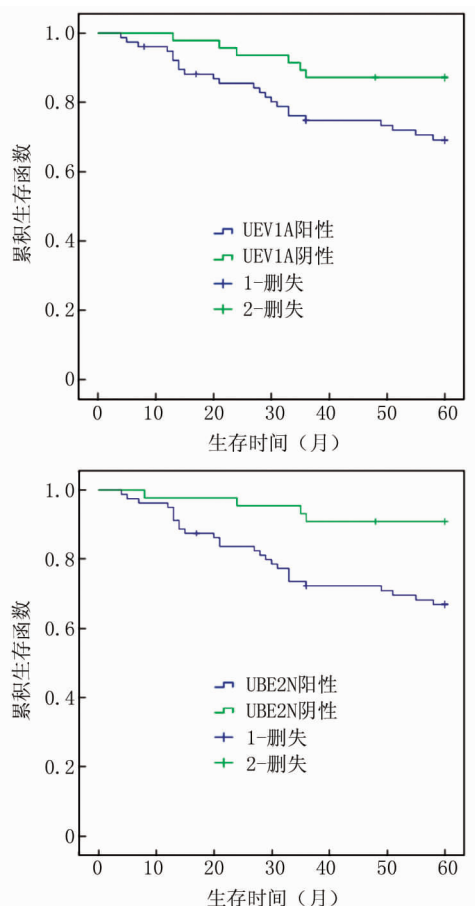


图 2 KM 生存曲线分析 UEV1A、UBE2N 蛋白表达与乳腺癌患者生存预后的关系

Fig. 2 KM survival curve analysis of the relationship between UEV1A, UBE2N protein expression and survival prognosis of breast cancer patients

表 4 多因素 Cox 回归分析影响乳腺癌预后的因素

Tab. 4 Multifactor Cox Regression Analysis of Factors Influencing the Prognosis of breast cancer

因素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
肿瘤 T2 ~ T4 期	0.575	0.160	12.915	<0.001	1.777	1.299 ~ 2.432
淋巴结转移	0.478	0.154	9.634	<0.001	1.613	1.193 ~ 2.181
UEV1A 阳性	0.609	0.176	11.973	<0.001	1.838	1.302 ~ 2.596
UBE2N 阳性	0.551	0.178	9.582	<0.001	1.735	1.224 ~ 2.459

3 讨论

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤,2020 年我国女性乳腺癌死亡例数达 11.7 万例,病死率可达 17.1%^[8]。目前乳腺癌的治疗以手术、放化疗、内分泌治疗及靶向治疗为主,但临床治疗中仍有部分患者存在肿瘤复发转移的现象,导致预后不佳。深入研究乳腺癌疾病机制,寻找能够有效评估预后的肿瘤标志物,对实施个体化治疗方案具有重要意义。乳腺癌的

发生发展是一个涉及多个步骤的复杂过程,与遗传和环境因素密切相关。EMT 是胚胎发育、组织修复的基本过程,也是恶性肿瘤细胞获得侵袭转移能力的重要生物学过程。本研究中,乳腺癌中上皮性标志物 E-cad 表达下调,而间质性标志物 N-cad、Vim 及 Snail 表达上调,与既往研究报道一致^[9],EMT 发生后肿瘤细胞与周围组织的黏附能力降低,细胞呈现长梭形间充质形态,促进乳腺癌细胞获得迁移、侵袭及转移。

在 E2 泛素连接酶催化下,蛋白质第 63 位的赖氨酸连接泛素链,并被 26S 蛋白酶体识别降解,是细胞内蛋白翻译后修饰的重要方式。UEV1A 是 E2 泛素连接酶的辅助因子,介导参与细胞增殖、分化、DNA 损伤修复和应激反应等多种病理生理学过程,与感染、免疫及肿瘤等疾病的发生等密切相关^[4,10]。本研究中,乳腺癌中 UEV1A 表达升高,并与肿瘤分期及淋巴结转移有关,这与既往学者在体外细胞实验中报道结果一致^[11],提示 UEV1A 可能参与乳腺癌的发生发展。UEV1A 编码基因位于 20q13.2,既往研究发现,乳腺癌中该区域存在 DNA 扩增的现象,导致乳腺癌中 UEV1A 基因表达上调^[11]。Wu 等^[4]报道,UEV1A 的表达上调能够通过激活核因子 κ B,促进乳腺癌肿瘤细胞抗凋亡蛋白 BIM 的表达,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤的过度增殖。此外,UEV1A 还能够通过促进肿瘤发生 EMT,增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力,导致肿瘤进展。Niu 等^[12]研究证实,乳腺癌细胞中过表达 UEV1A 后能够激活 AKT 信号通路,促进肿瘤干性的形成及上皮间质转化的发生,导致肿瘤侵袭和转移。本研究也观察到乳腺癌组织中 UEV1A 表达与间质性标志物呈正相关,而与上皮性标志物呈负相关,提示 UEV1A 能够促进乳腺癌 EMT 的发生。因此,乳腺癌中 UEV1A 可能作为一种促癌基因,其通过诱导肿瘤发生上皮间质转化,促进乳腺癌的肿瘤进展。本研究中,UEV1A 阳性表达乳腺癌患者预后较差,是影响患者不良预后的独立危险因素,提示乳腺癌组织中 UEV1A 表达可能作为新的肿瘤标志物,有助于预测乳腺癌患者的临床预后。研究发现,在顺铂耐药的肿瘤细胞中,UEV1A 能够被招募到 DNA 损伤位点,促进 DNA 损伤修复,导致化疗耐药性的形成^[4,13]。因此,UEV1A 可通过影响乳腺癌患者放化疗治疗的敏感性,影响患者的临床预后,以 UEV1A 为靶点的临床治疗可能有助于改善化疗耐药,增强肿瘤细胞对化疗的敏感性,是一种潜在的临床治疗方案,值得深入研究。

UBE2N 又称为 UBC13,是一种 E2 泛素连接酶,通过非经典泛素化途径调节 DNA 损伤修复过程。近年

来发现,UBE2N 在卵巢癌、膀胱癌等恶性肿瘤中表达异常上调,可促进细胞周期蛋白依赖性激酶 6 的表达,促进肿瘤细胞 G0/G1 期的进行,导致肿瘤进展^[14-15]。本研究中,乳腺癌组织中 UBE2N 表达升高,与不良临床病理特征有关,提示 UBE2N 促进乳腺癌的发生进展。乳腺癌中 UBE2N 的表达受微小 RNA 的转录后水平调节。研究表明,乳腺癌中 miR-590-3p 表达下调,导致 miR-590-3p 不能结合 UBE2N mRNA,UBE2N mRNA 稳定性升高,激活丝裂原活化蛋白激酶通路,导致肿瘤过度增殖^[16-17]。此外,UBE2N 还能够激活 EMT 通路,促进乳腺癌肿瘤进展。有研究发现,乳腺癌肿瘤细胞中 UBE2N 的表达能够激活转化生长因子 β 活化激酶 1 和 p38,导致转化生长因子 β 通路下游 SMAD 的活化,促进 EMT 的发生及肿瘤侵袭和转移,而利用 UBE2N 抑制剂治疗后,动物体内乳腺癌肿瘤细胞的转移能力显著受到抑制^[18]。此外,UBE2N 还介导组蛋白去乙酰化酶 1 泛素化和降解,抑制组蛋白 H4 赖氨酸 16 乙酰化,抑制肿瘤细胞上皮性标志物如 E-cad 表达,促进 EMT 的发生^[19]。这与本研究中观察到乳腺癌组织中 UBE2N 的表达与间质性标志物表达呈正相关,与上皮性标志物表达呈负相关的研究结果一致,提示 UBE2N 能够促进乳腺癌 EMT 的发生,促进乳腺癌的肿瘤进展。本研究中,UBE2N 阳性表达患者预后较差,表明 UBE2N 是一种乳腺癌预后相关肿瘤标志物。分析其原因,UBE2N 的表达升高能够促进肿瘤放化疗中 DNA 损伤修复过程,降低对放化疗的敏感性,导致患者不良预后。研究表明,结直肠癌中 UBE2N 能够与含有三方基序的 11 结合,促进 TAX1 结合蛋白 1 的活化,抑制铁蛋白吞噬,促进肿瘤细胞对吉西他滨等化疗药物耐药性形成^[20]。因此,乳腺癌中 UBE2N 是一种新的肿瘤标志物,有助于评估乳腺癌患者的临床预后。本研究发现,乳腺癌中 UBE2N 与 UBE2N 表达呈显著正相关,表明两者在乳腺癌肿瘤进展中可能发挥协同效应。Wu 等^[21]发现,UBE2N 能够与 UBE2N 结合形成复合物,催化靶蛋白 K63 位点的多泛素化修饰,促进核因子 κ B 入核,增加肿瘤细胞侵袭和转移能力。

综上所述,乳腺癌中 UBE2N 表达上调,两者表达与乳腺癌患者肿瘤 T 分期、淋巴结转移有关。UBE2N 可通过促进乳腺癌 EMT 的发生,导致乳腺癌疾病的发生发展。UBE2N 阳性表达乳腺癌患者生存预后较差,是影响患者不良预后的独立危险因素。但本研究存在一定的不足,本研究样本量有限,未对乳腺癌中 UBE2N 的具体机制进行研究,有待今后深入研究验证。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

吴欣妍:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;林小龙:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;王健宝:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;黄心瑜:进行统计学分析;唐仁梅:课题设计,论文撰写

参考文献

- [1] Youn HJ, Han W. A review of the epidemiology of breast cancer in Asia: Focus on risk factors[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2020, 21 (4): 867-880. DOI: 10. 31557/APJCP. 2020. 21. 4. 867.
- [2] 陈秀, 李蕾, 张鹤达, 等. 钙磷蛋白表达在预测乳腺癌预后中的价值[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2022, 14 (3): 238-243. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-4136. 2022. 03. 006. Chen X, Li L, Zhang HD, et al. The value of calpain expression in predicting the prognosis of breast cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Surgery, 2022, 14 (3): 238-243. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-4136. 2022. 03. 006.
- [3] Elangovan M, Ka J, Pak B, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme V variant 1 enables cellular responses toward fibroblast growth factor signaling in endothelium [J]. FASEB J, 2022, 36 (1): 2210-2218. DOI: 10. 1096/fj. 202100808RRR.
- [4] Wu Z, Niu T, Xiao W. Uev1A promotes breast cancer cell survival and chemoresistance through the AKT-FOXO1-BIM pathway [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19 (9): 331-321. DOI: 10. 1186/s12935-019-1050-4.
- [5] 宫梦晓, 邓鑫州, 沈力, 等. 沉默 UBE2N 对人喉鳞癌 hep-2 细胞放射敏感度的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46 (7): 583-587. DOI: 10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2019. 18. 1648. Gong MX, Deng XZ, Shen L, et al. Effect of silencing UBE2N on radiosensitivity of human laryngeal squamous cell carcinoma hep-2 cells [J]. Cancer Prevention and Treatment Research, 2019, 46 (7): 583-587. DOI: 10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2019. 18. 1648.
- [6] Barreyro L, Sampson AM, Ishikawa C, et al. Blocking UBE2N abrogates oncogenic immune signaling in acute myeloid leukemia [J]. Sci Transl Med, 2022, 14 (635): 7695-7703. DOI: 10. 1126/scitranslmed. abb7695.
- [7] 吴婷月, 陈雯敏, 陈策实. 上皮间质转化与乳腺癌干细胞的关系[J]. 贵州医科大学学报, 2022, 47 (11): 1241-1263, 1273. DOI: 10. 19367/j. cnki. 2096-8388. 2022. 11. 001. Wu TY, Chen WM, Chen CS. The relationship between epithelial mesenchymal transformation and breast cancer stem cells [J]. Journal of Guizhou Medical University, 2022, 47 (11): 1241-1263, 1273. DOI: 10. 19367/j. cnki. 2096-8388. 2022. 11. 001.
- [8] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134 (7): 783-791. DOI: 10. 1097/CM9. 0000000000001474.
- [9] 张烽萍, 齐高秀, 丁康, 等. ZFP36L1 通过激活 STAT3 信号通路抑制上皮间质转化减弱人乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022, 38 (8): 721-726. DOI: 10. 13423/j. cnki. cjcmi. 009398. Zhang FP, Qi GX, Ding K, et al. ZFP36L1 inhibits epithelial mesen-

- chymal transformation and weakens the proliferation, invasion and migration of human breast cancer cells by activating STAT3 signaling pathway[J]. Journal of Cell and Molecular Immunology, 2022, 38 (8): 721-726. DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.009398.
- [10] Zhang Y, Li Y, Yang X, et al. Uev1A-Ubc13 catalyzes K63-linked ubiquitination of RHBDF2 to promote TACE maturation[J]. Cell Signal, 2018, 42 (8): 155-164. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.10.013.
- [11] Wu Z, Shen S, Zhang Z, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme complex Uev1A-Ubc13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- κ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(4): 75-84. DOI:10.1186/bcr3692.
- [12] Niu T, Wu Z, Xiao W. Uev1A promotes breast cancer cell migration by up-regulating CT45A expression via the AKT pathway[J]. BMC Cancer, 2021, 21 (1): 1012-1019. DOI: 10.1186/s12885-021-08750-3.
- [13] Bai Z, Wei M, Li Z, et al. Drosophila Uev1a is dually required for Ben-dependent DNA-damage response and fly mobility[J]. Cell Signal, 2020, 74 (8): 1097-1105. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109719.
- [14] Wambecke A, Ahmad M, Morice PM, et al. The lncRNA UCA1 modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels[J]. Mol Oncol, 2021, 15(12): 3659-3678. DOI:10.1002/1878-0261.13045.
- [15] Yan H, Ren S, Lin Q, et al. Inhibition of UBE2N-dependent CDK6 protein degradation by miR-934 promotes human bladder cancer cell growth[J]. FASEB J, 2019, 33(11): 12112-12123. DOI: 10.1096/fj.201900499RR.
- [16] Song TT, Xu F, Wang W. Inhibiting ubiquitin conjugating enzyme E2 N by microRNA-590-3p reduced cell growth of cervical carcinoma[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36 (7): 501-507. DOI: 10.1002/kjm2.12204.
- [17] Chang J, Zhang Y, Ye X, et al. Long non-coding RNA (lncRNA) CASC9/microRNA(miR)-590-3p/sine oculis homeobox 1 (SIX1)/NF- κ B axis promotes proliferation and migration in breast cancer[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8709-8723. DOI:10.1080/21655979.2021.1977555.
- [18] Wu X, Zhang W, Font-Burgada J, et al. Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 controls breast cancer metastasis through a TAK1-p38 MAP kinase cascade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (38): 13870-13879. DOI:10.1073/pnas.1414358111.
- [19] Shen T, Cai LD, Liu YH, et al. Ube2v1-mediated ubiquitination and degradation of Sirt1 promotes metastasis of colorectal cancer by epigenetically suppressing autophagy[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11 (1): 95-103. DOI:10.1186/s13045-018-0638-9.
- [20] Shang M, Weng L, Xu G, et al. TRIM11 suppresses ferritinophagy and gemcitabine sensitivity through UBE2N/TAX1BP1 signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. J Cell Physiol, 2021, 236 (10): 6868-6883. DOI:10.1002/jcp.30346.
- [21] Wu Z, Neufeld H, Torlakovic E, et al. Uev1A-Ubc13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- κ B activation[J]. Oncotarget, 2018, 9(22): 15952-15967. DOI: 10.18632/oncotarget.24640.

(收稿日期:2022-12-17)

(上接 394 页)

- [17] 张文莉, 王彩丽, 冯彩霞, 等. 宫颈鳞癌组织中 miR-448、KDM2B 表达水平与术后复发的相关性研究[J]. 疑难病杂志, 2022, 21 (4): 350-355. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.04.004.
- Zhang WL, Wang CL, Feng CX, et al. Correlation between the expression levels of miR-448 and KDM2B in cervical squamous cell carcinoma and postoperative recurrence[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2022, 21 (4): 350-355. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.04.004.
- [18] 赵芳, 马德勇, 王婷婷, 等. 液基薄层细胞 p16 免疫组化检测对宫颈非典型鳞状上皮的分流价值[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(12): 1243-1247. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.12.014.
- Zhao F, Ma DY, Wang TT, et al. The value of p16 immunocytochemical stain of cervical cell in triaging cervical atypical squamous cells[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2020, 19(12): 1243-1247. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.12.014.
- [19] 马德勇, 冯慧, 王婷婷, 等. 细胞 P16 联合液基细胞学检测对子宫颈癌和癌前病变筛查价值探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11): 1116-1119. DOI: 10.19538/j.fk2020110118.
- [20] Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, et al. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial[J]. Gynecologic Oncol, 2017, 144(1): 51-56. DOI:10.1016/j.ygyno.2016.10.031.
- [21] Wentzensen N, Clarke MA, Bremer R, et al. Clinical evaluation of human papillomavirus screening with p16/Ki-67 dual stain triage in a large organized cervical cancer screening program[J]. JAMA Intern Med, 2019, 179 (7): 881-888. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019.0306.
- [22] Remila R, Yan W, Feng C, et al. Clinical evaluation of p16 INK4a immunocytology in cervical cancer screening: A population-based cross-sectional study from rural China[J]. Cancer Cytopathol, 2021, 129(9): 679-692. DOI:10.1002/cncy.22428.
- [23] Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017, 8(8): CD008587. DOI: 10.1002/14651858.CD008587.pub2.
- [24] Barken SS, Rebolj M, Andersen ES, et al. Frequency of cervical intraepithelial neoplasia treatment in a well-screened population[J]. Int J Cancer, 2012, 130(10): 2438-2444. DOI: 10.1002/ijc.26248.

(收稿日期:2022-10-19)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.012

论著·临床

慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 表达及其在肝纤维化诊断中的应用价值

孙瑞青, 邓娟, 李丰, 王龙, 王秀芳

作者单位: 710032 西安, 空军军医大学第一附属医院消化内科

通信作者: 王秀芳, E-mail: wxfmm@163.com

【摘要】目的 分析 β -连环蛋白(β -catenin)、长链非编码 RNA(lncRNA)KCNQ1OT1 在慢性乙型肝炎患者血清中的表达变化及其在肝纤维化诊断中的应用价值。**方法** 选取 2020 年 1 月—2021 年 1 月空军军医大学第一附属医院消化内科收治慢性乙型肝炎患者 90 例, 根据患者的肝纤维化程度分为无肝纤维化 23 例(S0 组)、轻度肝纤维化 42 例(S1~S2 组)、中重度肝纤维化 25 例(S3~S4 组); 另选取同期医院健康体检者 30 例为健康对照组。比较各组血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 表达水平及肝纤维化指标; 分析 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 表达水平与肝纤维化程度及其指标的相关性; Logistic 回归分析慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的影响因素; 受试者工作特征曲线(ROC)分析血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平对慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的预测价值。**结果** 健康对照组、S0 组、S1-S2 组、S3-S4 组血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平依次升高($F/P=28.066/ <0.001$, $25.173/ <0.001$); 肝纤维化指标透明质酸(HA)、前胶原 N 端肽(PⅢP)、IV 型胶原(CⅣ)、层黏连蛋白(LN)水平逐次升高($F/P=79.414/ <0.001$, $119.630/ <0.001$, $104.574/ <0.001$, $96.631/ <0.001$)。血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平均与肝纤维化程度呈显著正相关($r/P=0.598/0.001$, $0.643/0.009$), 血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化指标 HA、PⅢP、CⅣ、LN 呈显著正相关(β -catenin; $r/P=0.483/0.016$, $0.456/0.013$, $0.641/0.006$, $0.519/0.008$; lncRNA KCNQ1OT1; $r/P=0.496/0.014$, $0.604/0.007$, $0.523/0.014$, $0.611/0.002$)。血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1、HA、PⅢP、CⅣ、LN 升高是慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的危险因素[$OR(95\% CI)=1.564(1.205 \sim 2.030)$, $2.213(1.449 \sim 3.379)$, $1.816(1.261 \sim 2.615)$, $2.315(1.380 \sim 3.884)$, $1.564(1.161 \sim 2.107)$, $3.013(1.491 \sim 6.090)$]。血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 及二者联合预测慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的 AUC 为 0.784、0.775、0.857, 二者联合优于各自单独预测($Z/P=2.617/0.028$, $2.897/0.014$)。**结论** 慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化程度密切相关, 二者联合检测对慢性乙型肝炎患者是否发生肝纤维化有较好参考价值。

【关键词】 乙型肝炎, 慢性; 肝纤维化; β -连环蛋白; 长链非编码 RNA KCNQ1OT1; 诊断**【中图分类号】** R512.6⁺2; R575.2**【文献标识码】** A

Serum expression of β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 and the application in the diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B Sun Ruiqing, Deng Juan, Li Feng, Wang Long, Wang Xiufang. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Wang Xiufang, E-mail: wxfmm@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of β -catenin and long chain non coding RNA (lncRNA) KCNQ1OT1 in serum of patients with chronic hepatitis B and their application value in the diagnosis of liver fibrosis. **Methods**

A total of 90 patients with chronic hepatitis B admitted to the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University from January 2020 to January 2021 were selected. According to the degree of liver fibrosis, they were divided into 23 patients without liver fibrosis (S0 group), 42 patients with mild liver fibrosis (S1-S2 group), and 25 patients with moderate to severe liver fibrosis (S3-S4 group); In addition, 30 patients undergoing physical examination in the same hospital were selected as the healthy control group. Compare the serum expression levels of β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 and indicators of liver fibrosis; analysis the correlation between the expression levels of β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 and the degree of liver fibrosis and its indicators; Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B; receiver operation characteristic curve (ROC) analysis the predictive value of serum β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 levels in the development of liver fibrosis in patients with

chronic hepatitis B. **Results** Serum β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 levels in healthy control group, S0 group, S1-S2 group, S3-S4 group increased sequentially ($F/P=28.066/ <0.001$, $25.173/ <0.001$). The levels of hyaluronic acid (HA), pro-collagen N-terminal peptide (P III P), type IV collagen (C IV), and laminin (LN) were gradually increased ($F/P=79.414/ <0.001$, $119.630/ <0.001$, $104.574/ <0.001$, $96.631/ <0.001$). The levels of serum β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 were significantly and positively correlated with the degree of liver fibrosis ($r/P=0.598/0.001$, $0.643/0.009$). β -Catenin and lncRNA KCNQ1OT1 levels were significantly positively correlated with liver fibrosis indicators HA, P III P, C IV, and LN (β -catenin: $r/P=0.483/0.016$, $0.456/0.013$, $0.641/0.006$, $0.519/0.008$; Serum lncRNA KCNQ1OT1: $r/P=0.496/0.014$, $0.604/0.007$, $0.523/0.014$, $0.611/0.002$). Elevated levels of serum β -catenin, lncRNA, KCNQ1OT1, HA, P III P, C IV, and LN are risk factors for liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [$OR(95\% CI)=1.564 (1.205 - 2.030)$, $2.213 (1.449 - 3.379)$, $1.816 (1.261 - 2.615)$, $2.315 (1.380 - 3.884)$, $1.564 (1.161 - 2.107)$, and $3.013 (1.491 - 6.090)$]. The AUC of serum β -catenin, lncRNA, KCNQ1OT1, and their combination in predicting liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B were 0.784, 0.775, and 0.857, respectively. The combination of the two was superior to their respective prediction alone ($Z/P=2.617/0.028$, $2.897/0.014$). **Conclusion** The levels of serum β -catenin and lncRNA KCNQ1OT1 from patients with chronic hepatitis B are closely related to the degree of liver fibrosis, and the combined detection of the two has a good reference value for the occurrence of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B.

【Key words】 Hepatitis B, chronic; Hepatic fibrosis; β -catenin; Long non-coding RNA KCNQ1OT1; Diagnosis

慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 是一种与乙型肝炎病毒感染情况相关的复杂疾病,通过宿主免疫系统对病毒的反应,进而影响疾病的进程^[1]。随着 CHB 病情的发展,患者可能会出现各种肝脏病变,其中最常见的是肝纤维化^[2]。肝纤维化是肝细胞发生坏死,纤维结缔组织在肝脏组织中过度沉积引起的慢性组织损伤和炎性反应,进一步发展会导致正常肝脏结构的破坏,发展为肝硬化和肝癌,给患者和社会带来沉重的经济负担^[3]。研究表明,肝纤维化是一个可逆的过程,阻断肝纤维化进程是治疗 CHB 的关键^[4]。因此,确定肝纤维化程度,并积极采取有效措施对 CHB 的临床治疗具有重要意义。 β -连环蛋白 (β -catenin) 是一种多功能蛋白,既可以与细胞膜上的黏附分子、黏蛋白结合以调节细胞黏附,也可以在细胞核内与下游基因结合参与细胞信号转导和转录调控^[5]。 β -catenin 作为 Wnt 经典信号通路的主要成分,在胚胎发生、慢性炎性反应、器官纤维化、恶性肿瘤等多种生理和病理过程中发挥着重要作用^[6]。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一种没有编码蛋白质能力的新型 RNA, lncRNA 的失调与多种不同疾病的发生发展密切相关,在宿主免疫系统对病毒响应方面起着重要作用^[7]。lncRNA KCNQ1OT1 位于 KCNQ1 位点 11p15.5 区域,能够与 miRNA、RNA 和蛋白质相互作用,影响基因表达和细胞增殖、迁移、凋亡等各种细胞功能,在心肌梗死、冠心病、脑卒中、癌症等多种疾病中表达上调^[8]。然而,目前 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 在 CHB 患者血清中的表达水平及与肝纤维化的关系,尚未报道。因此,现分析 CHB 不同肝纤维化程度患者血

清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 表达水平及其与 CHB 肝纤维化程度的关系,为 CHB 的有效诊治提供参考依据,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 1 月—2021 年 1 月空军军医大学第一附属医院消化内科收治慢性乙型肝炎患者 90 例,根据慢性乙型肝炎患者的肝纤维化程度,将患者分为无肝纤维化 23 例 (S0 组)、轻度肝纤维化 42 例 (S1 ~ S2 组)、中重度肝纤维化 25 例 (S3 ~ S4 组)。另选取同期医院健康体检者 30 例为健康对照组。4 组性别、年龄、体质量指数、病程、吸烟史、饮酒史、高血压、糖尿病比例比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。4 组间营养风险比较, S3 ~ S4 组 $>$ S1 ~ S2 组 $>$ S0 组 $>$ 健康对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1。本研究经医院伦理委员会审核批准 (KY20192135-1),受试者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准:①符合慢性乙型肝炎相关诊断标准^[9];②年龄 > 18 岁;③入院时无肝衰竭。(2) 排除标准:①既往有肝移植手术史者;②病例资料不完整患者;③恶性肿瘤晚期患者;④自身免疫性疾病患者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 水平:患者入院次日清晨、健康对照组体检当日,采集肘静脉血 3 ~ 5 ml 于干燥试管,离心留取血清后,分装于无菌 EP 管中,于 -20°C 冰箱中保存待检。采用 RNA 提取试剂盒 (上海生工生物有限公司) 提取血清样品总 RNA,使

用逆转录试剂盒(德国 Qiagen 公司)按其说明书逆转录合成 cDNA。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测血清中 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 的相对表达量。根据 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书配置反应体系。反应程序为:95℃预变性 5 min,95℃变性 10 s、60℃退火 1 min、72℃延伸 30 s,40 个循环。在 ABI 7500 Fast 系统上进行 qRT-PCR。以 GAPDH 作为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 基因的相对表达量。基因引物经设计软件设计后由上海生工生物工程有限公司合成,基因引物序列见表 2。

1.3.2 肝纤维化指标测定:上述血清,使用 γ -放射免疫计数器(DFM-96,合肥众成机电技术开发有限责任公司),采用化学发光免疫分析法检测血清透明质酸(HA)、前胶原 N 端肽(PⅢP)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、层黏连蛋白(LN)等肝纤维化指标水平。

1.4 肝纤维化程度判定 在 B 型超声引导下对患者进行肝穿刺活检术,取肝组织标本长度 >1.0 cm,送病理科待检。由 2 位病理医生独立阅片,根据 Scheuer 评分系统判定肝纤维化程度^[10]。S0:肝无纤维化;S1:窦周、小叶内纤维化;S2:汇管区周围纤维化,形成纤维间隔;S3:大量纤维间隔,致小叶结构紊乱;S4:肝硬化。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-

q 检验;Spearman 法分析慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化程度的相关性;Pearson 法分析慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化指标的相关性;Logistic 回归分析慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的影响因素;受试者工作特征曲线(ROC)分析血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平对慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平比较 与健康对照组比较,CHB 患者血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 水平随着肝纤维化程度加重依次升高,且两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 健康对照组和 CHB 患者血清 β -catenin 和 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 healthy control group and CHB patient serum β -Comparison of expression levels of Catenin and lncRNA KCNQ1OT1

组 别	例数	β -catenin	lncRNA KCNQ1OT1
健康对照组	30	1.02 $\pm$ 0.10	1.05 $\pm$ 0.12
S0 组	23	1.45 $\pm$ 0.14	1.53 $\pm$ 0.23
S1 ~ S2 组	42	1.91 $\pm$ 0.46	2.04 $\pm$ 0.50
S3 ~ S4 组	25	2.39 $\pm$ 1.13	2.48 $\pm$ 1.26
F 值		28.066	25.173
P 值		<0.001	<0.001

表 1 4 组受试人员临床资料比较

Tab.1 Clinical Data Comparison of Four Groups of Subjects

组 别	健康对照组($n=30$)	S0 组($n=23$)	S1 ~ S2 组($n=42$)	S3 ~ S4 组($n=25$)	F 值	P 值
男/女[例(%)]	15(50.00)/15(50.00)	12(52.17)/11(47.83)	23(54.76)/19(45.24)	13(52.00)/12(48.00)	0.165	0.983
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	55.58 $\pm$ 5.14	55.61 $\pm$ 5.21	56.34 $\pm$ 5.36	56.21 $\pm$ 5.28	0.177	0.912
体质量指数($\bar{x} \pm s$,kg/m ²)	22.41 $\pm$ 2.65	23.27 $\pm$ 2.83	22.65 $\pm$ 2.16	22.56 $\pm$ 2.33	0.583	0.627
病程($\bar{x} \pm s$,月)	—	11.34 $\pm$ 1.52	11.56 $\pm$ 1.59	11.83 $\pm$ 1.58	0.573	0.566
营养风险[例(%)]	11(36.67)	16(69.57)	33(78.57)	21(84.00)	18.880	<0.001
吸烟史[例(%)]	14(46.67)	10(43.48)	18(42.86)	11(44.00)	0.110	0.991
饮酒史[例(%)]	12(40.00)	9(20.93)	17(40.48)	12(48.00)	0.582	0.912
高血压[例(%)]	13(43.33)	11(47.83)	19(45.24)	11(44.00)	0.119	0.989
糖尿病[例(%)]	11(36.67)	10(43.48)	20(47.62)	10(40.00)	0.941	0.816

表 2 qRT-PCR 基因引物序列

Tab.2 qRT-PCR gene primer sequence

基因	上游引物	下游引物
β -catenin	5'-AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG-3'	5'-CGAGTCATTGCATACTGTCCAT-3'
lncRNA KCNQ1OT1	5'-CCCAGAAATCCACACCTCGG-3'	5'-TCCTCAGTGAGCAGAT-GGAGA-3'
GAPDH	5'-TACATGGGCCGAGGCAAGATAA-3'	5'-ATAGCCGAGGGAAGT-GAAGTGTC-3'

2.2 4 组肝纤维化指标比较 健康对照组、S0 组、S1 ~ S2 组、S3 ~ S4 组血清 HA、PⅢP、CⅣ、LN 水平依次升高,且两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.3 血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化程度及相关指标的相关性分析 Spearman 相关性分析结果显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平均与肝纤维化程度呈显著正相关($r/P = 0.598/0.001$ 、 $0.643/0.009$)。Pearson 相关性分析结果显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平均与肝纤维化指标 HA、PⅢP、CⅣ、LN 呈正相关($P < 0.01$ 或 0.05),见表 5。

表 5 CHB 患者血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化指标的相关性

Tab.5 CHB Patient Serum β -Correlation between the levels of Catenin and lncRNA KCNQ1OT1 and liver fibrosis indicators

指 标	β -catenin		lncRNA KCNQ1OT1	
	r 值	P 值	r 值	P 值
HA	0.483	0.016	0.496	0.014
PⅢP	0.456	0.013	0.604	0.007
CⅣ	0.641	0.006	0.523	0.014
LN	0.519	0.008	0.611	0.002

2.4 多因素 Logistic 回归分析 CHB 患者发生肝纤维化的影响因素 以 CHB 患者是否发生肝纤维化为因变量($S1 \sim S4 = 1, S0 = 0$),以血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1、营养风险、HA、PⅢP、CⅣ、LN 为自变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1、HA、PⅢP、CⅣ、LN 升高是 CHB 患者发生肝纤维化的危险因素($P < 0.01$),见表 6。

2.5 血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 对 CHB 患者发生肝纤维化的预测价值 ROC 曲线结果显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 及二者联合预测 CHB 患者发生肝纤维化的曲线下面积曲线(AUC)分别为

0.784、0.775、0.857,二者联合优于各自单独预测效能($Z = 2.617$ 、 $2.897, P = 0.028$ 、 0.014),见表 7、图 1。

表 6 多因素 Logistic 回归分析 CHB 患者发生肝纤维化的影响因素

Tab.6 Multivariate Logistic Regression Analysis of the Influencing Factors of Liver Fibrosis in CHB Patients

影响因素	β 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
β -catenin 高	0.447	0.133	11.308	<0.001	1.564	1.205 ~ 2.030
KCNQ1OT1 高	0.794	0.216	13.524	<0.001	2.213	1.449 ~ 3.379
营养风险高	0.384	0.249	2.385	0.122	1.469	0.902 ~ 2.393
HA 高	0.597	0.186	10.289	0.001	1.816	1.261 ~ 2.615
PⅢP 高	0.839	0.264	10.110	0.001	2.315	1.380 ~ 3.884
CⅣ高	0.447	0.152	8.656	0.003	1.564	1.161 ~ 2.107
LN 高	1.102	0.359	9.439	0.002	3.013	1.491 ~ 6.090

表 7 血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 对 CHB 患者发生肝纤维化的预测价值

Tab.7 Serum β -The predictive value of Catenin and lncRNA KCNQ1OT1 for liver fibrosis in patients with CHB

变 量	截断值	AUC	95% CI	敏感度	特异度	Youden 指数
β -catenin	>1.74	0.784	0.685 ~ 0.864	0.672	0.956	0.628
lncRNA KCNQ1OT1	>1.82	0.775	0.675 ~ 0.856	0.657	0.913	0.570
二者联合		0.857	0.768 ~ 0.922	0.687	0.956	0.643

3 讨 论

慢性乙型肝炎病毒感染是一个动态的过程,通过激活肝星状细胞促进肝纤维化,通过降解和释放细胞外基质来解决炎症反应和纤维化,当乙型肝炎病毒复制受到抑制,慢性乙型肝炎患者相关的肝纤维化可以消退^[11]。肝纤维化的早期诊断、及时有效的治疗,可以延缓或避免肝纤维化向不可逆肝硬化阶段的发展^[12]。因此,开发一种简单、准确地方法评估慢性乙型肝炎是否发生肝纤维化及肝纤维化程度的方法,对慢性乙型肝炎的临床治疗具有重要意义。

Wnt/ β -catenin 通路是高度保守的,通过自分泌或旁分泌途径分泌 Wnt 蛋白,在细胞外与膜受体结合而

表 4 健康对照组和 CHB 患者肝纤维化指标比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)
Tab.4 Comparison of Liver Fibrosis Indexes between Healthy Control Group and CHB Patients

组 别	例数	HA	PⅢP	CⅣ	LN
健康对照组	30	27.54 $\pm$ 2.03	7.65 $\pm$ 1.96	8.06 $\pm$ 2.31	8.98 $\pm$ 2.38
S0 组	23	98.31 $\pm$ 9.64	28.31 $\pm$ 6.64	26.54 $\pm$ 6.43	24.80 $\pm$ 9.61
S1 ~ S2 组	42	98.31 $\pm$ 9.64	42.64 $\pm$ 11.97	39.48 $\pm$ 12.64	37.53 $\pm$ 15.65
S3 ~ S4 组	25	223.97 $\pm$ 82.11	52.43 $\pm$ 12.50	54.99 $\pm$ 14.06	68.21 $\pm$ 18.22
F 值		79.414	119.630	104.574	96.631
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

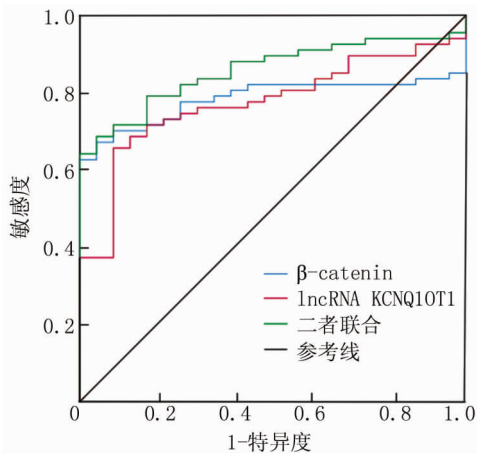


图1 血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平预测 CHB 患者发生肝纤维化的 ROC 曲线

Fig.1 Serum β -ROC Curve of Catenin and lncRNA KCNQ1OT1 Levels Predicting Liver Fibrosis in Patients with CHB

激活 Wnt/ β -catenin 通路,诱导 β -catenin 的表达并将其转移到细胞核,参与细胞增殖、分化和迁移,在生物体整个生命过程中至关重要^[13]。Kim 等^[14]发现 β -catenin 的外显子 3 中发生错译致使突变频率升高与肝癌、子宫内膜癌和结直肠癌的发生有关。Feng 等^[15]发现 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活通过刺激巨噬细胞分化为促炎性经典激活和伤口愈合/促纤维化交替激活表型,来促进肾纤维化。陈清河等^[16]发现 β -catenin 在骨质疏松合并骨关节炎患者血清中水平显著高于骨质疏松患者, β -catenin 的表达变化可作为临床骨关节炎患者炎症反应程度和骨质量诊断的参考。范文艳等^[17]发现肝纤维化的发病受 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控。本研究结果显示,健康对照组、S0 组、S1 ~ S2 组、S3 ~ S4 组血清 β -catenin 表达水平依次显著升高,与以往研究结果一致,提示血清 β -catenin 可能激活慢性乙型肝炎患者炎症因子的分泌,促进肝纤维化,其表达水平对于初步判断慢性乙型肝炎是否发生肝纤维化及肝纤维化程度具有一定的意义。

lncRNA KCNQ1OT1 是只表达父源等位基因的印记基因,其异常表达常常引起复杂突变和表型缺陷^[18]。Yu 等^[19]发现 lncRNA KCNQ1OT1 在短暂性脑缺血发作患者中显著上调,通过加速神经元的自噬,从而加剧急性脑血管疾病的缺血再灌注损伤。李莹等^[20]发现 lncRNA KCNQ1OT1 在 II 型糖尿病和糖尿病肾病中的表达较对照组明显升高,为糖尿病肾病诊断及预后疗效评估提供依据。本研究结果发现,慢性乙型肝炎患者血清 lncRNA KCNQ1OT1 表达水平随肝纤

维化程度的加重显著上调,提示血清 lncRNA KCNQ1OT1 水平有望成为慢性乙型肝炎患者临床诊断的潜在标志物。HA、PⅢP、CⅣ、LN 是目前临床上反映慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的常用血清学指标^[21]。研究表明,HA、PⅢP、CⅣ、LN 随肝纤维化程度的加重逐渐上升,多因素 Logistic 回归分析结果显示,HA、PⅢP、CⅣ、LN 是慢性乙型肝炎患者发生肝纤维化的影响因素,提示应密切关注上述因素,以便及时对患者采取干预措施^[22-24]。穆莉^[25]研究发现, KCNQ1OT1 通过对 β -catenin 信号途径的调节,促进骨肉瘤细胞的顺铂耐药性。Gu 等^[26]发现 lncRNA KCNQ1OT1 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导细胞增殖和抑制细胞凋亡,在骨折延迟愈合中起着至关重要的作用。进一步研究显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化程度、纤维化指标呈显著正相关;ROC 曲线显示,血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 二者联合预测慢性乙型肝炎发生肝纤维化的效能优于各自单独预测,二者对预测慢性乙型肝炎发生肝纤维化具有重要指导价值。

综上所述,慢性乙型肝炎患者血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 水平与肝纤维化程度密切相关,二者联合预测慢性乙型肝炎患者是否发生肝纤维化有较好参考价值。然而血清 β -catenin、lncRNA KCNQ1OT1 参与慢性乙型肝炎肝纤维化发生发展的具体机制仍需进一步探究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

孙瑞青、邓娟:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;李丰:进行统计学分析;王龙:课题设计,论文撰写;王秀芳:提出研究思路,分析试验数据,论文修改、审核

参考文献

- [1] Ahmed FA, Bajaifar MS, Ahmed MA, et al. Quantitative HBsAg levels do not identify hepatic fibrosis in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients [J]. Saudi J Gastroenterol, 2019, 25 (5): 286-292. DOI:10.4103/sjg. SJG_80_19.
- [2] Xu B, Zhou NM, Cao WT, et al. Evaluation of elastography combined with serological indexes for hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24 (37): 4272-4280. DOI:10.3748/wjg.v24.i37.4272.
- [3] Lefevre C, Roux M, Blanchard S, et al. Analysis of hepatic fibrosis markers in the serum of chronic hepatitis B patients according to basal core promoter/precore mutants [J]. Sci Rep, 2022, 12 (1): 1-10. DOI:10.1038/s41598-022-14285-9.
- [4] Sun Y, Wu X, Zhou J, et al. Persistent low level of hepatitis B virus promotes fibrosis progression during therapy [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18 (11): 2582-2591. DOI:10.1016/j.cgh.2020.03.001.
- [5] Duan L, Yang Q, Yang J, et al. Identification of serum β -catenin as a

- biomarker in patients with HBV-related liver diseases[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):1-11. DOI:10.1186/s12967-018-1645-x.
- [6] Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2):713-725. DOI:10.3892/ijmm.2018.3689.
- [7] Yao J, Lin C, Jiang J, et al. lncRNA-HEIM facilitated liver fibrosis by up-regulating TGF- β expression in long-term outcome of chronic hepatitis B[J]. Front Immunol, 2021, 12(1):1-11. DOI:10.3389/fimmu.2021.666370.
- [8] Xia F, Wang Y, Xue M, et al. LncRNA KCNQ1OT1: Molecular mechanisms and pathogenic roles in human diseases[J]. Genes Dis, 2021, 9(6):1556-1565. DOI:10.1016/j.gendis.2021.07.003.
- [9] Cornberg M, Lok AS, Terrault NA, et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B - Report from the 2019 EA-SL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference[J]. J Hepatol, 2020, 72(3):539-557. DOI:10.1016/j.jhep.2019.11.003.
- [10] Yao QY, Feng YD, Han P, et al. Hepatic microenvironment underlies fibrosis in chronic hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(27):3917-3928. DOI:10.3748/wjg.v26.i27.3917.
- [11] Ding R, Zheng J, Huang D, et al. INR-to-platelet ratio (INPR) as a novel noninvasive index for predicting liver fibrosis in chronic hepatitis B[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(5):1159-1166. DOI:10.7150/ijms.51799.
- [12] Friedman A, Siewe N. Chronic hepatitis B virus and liver fibrosis: A mathematical model[J]. PLoS One, 2018, 13(4):e0195037. DOI:10.1371/journal.pone.0195037.
- [13] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1):1-23. DOI:10.1038/s41392-021-00762-6.
- [14] Kim S, Jeong S. Mutation hotspots in the β -catenin gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases[J]. Mol Cells, 2019, 42(1):8-16. DOI:10.14348/molcells.
- [15] Feng Y, Ren J, Gui Y, et al. Wnt/ β -Catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(1):182-193. DOI:10.1681/ASN.2017040391.
- [16] 陈清河, 陈闻佳, 曾维铨. 骨质疏松合并骨关节炎患者血清中 Wnt 通路调节因子研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12):1721-1724. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.12.011.
Chen QH, Chen WJ, Zeng WQ. Study on the regulatory factors of Wnt pathway in the combination of osteoporosis and osteoarthritis[J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(12):1721-1724. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2019.12.011.
- [17] 范文艳, 郝君玉, 陈虹秀, 等. 肝纤维化相关信号通路及中药活性成分靶向调节作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(11):2599-2605. DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2022.11.033.
Fan WY, Hao JY, Chen HX, et al. Research progress on signal pathways in hepatic fibrosis and targeted regulation mechanisms of active ingredients from traditional Chinese medicine[J]. Journal of Clinical Hepatobiliary Diseases, 2022, 38(11):2599-2605. DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2022.11.033.
- [18] 李攀, 李晓明. LncRNA KCNQ1OT1 在 DLBCL 患者中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤, 2019, 39(4):298-304. DOI:10.3781/j.issn.1000-7431.2019.33.628.
- Li P, Li XM. Expression of LncRNA KCNQ1OT1 in DLBCL patients and its clinical significance[J]. TUMOR, 2019, 39(4):298-304. DOI:10.3781/j.issn.1000-7431.2019.33.628.
- [19] Yu S, An J, Sun R, et al. LncRNA KCNQ1OT1 predicts further cerebral events in patients with transient ischemic attack[J]. Front Pharmacol, 2022, 13(1):1-9. DOI:10.3389/fphar.2022.961190.
- [20] 李莹, 刘琦, 欧三桃, 等. LncRNA KCNQ1OT1 在糖尿病肾病患者血清中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(1):71-74. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2019.01.015.
Li Y, Liu Q, Ou ST, et al. Expression of LncRNA KCNQ1OT1 in serum of patients with diabetic nephropathy and its clinical significance[J]. The Journal of Practical Medicine, 2019, 35(1):71-74. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2019.01.015.
- [21] 壮健, 朱韦文, 张超. 基于 LASSO 回归的慢性乙型肝炎肝纤维化无创诊断模型的构建及验证[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(8):1790-1795. DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2022.08.014.
Zhuang J, Zhu WW, Zhang C. Establishment and validation of a non-invasive diagnostic model for chronic hepatitis B liver fibrosis based on LASSO regression[J]. J Clin Hepato, 2022, 38(8):1790-1795. DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2022.08.014.
- [22] 刘娇, 刘青, 王大明, 等. 慢性乙型肝炎患者血清外泌体 miR-122、miR-146a 表达与 HBV-DNA 载量的相关性[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(10):976-979, 984. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.10.002.
Liu J, Liu Q, Wang DM, et al. Correlation between serum exosomal miR-122 and miR-146a expression and HBV-DNA load in patients with chronic hepatitis B[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2020, 19(10):976-979, 984. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.10.002.
- [23] 王柳青, 李雅静, 薛素娟, 等. 恩替卡韦联合扶正化痰胶囊治疗 HBV 感染失代偿期肝硬化患者的疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(10):985-989. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.10.004.
Wang LQ, Li YJ, Xue SJ, et al. The effect of entecavir combined with Fuzhenghuayu capsule in the treatment of decompensated cirrhosis patients with HBV infection and its influence on serum inflammatory factors[J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2020, 19(10):985-989. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.10.004.
- [24] 张蕾, 贺建勋, 范雪松, 等. 抗凝血酶Ⅲ活性联合 CLIF-C OFs 评分对 HBV 相关慢加急性肝衰竭患者预后的评估价值[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1):36-40, 45. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.007.
Zhang L, He JX, Fan XS, et al. Prognostic value of antithrombin III activity combined with CLIF-C OFs score in patients with HBV related chronic plus acute liver failure [J]. Chin J Diffic and Compl Cas, 2022, 21(1):36-40, 45. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.01.007.
- [25] 穆莉. KCNQ1OT1 通过 miR-335-5p/ β -catenin 轴促进骨肉瘤细胞的顺铂耐药性研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2021.
- [26] Gu H, Li Z, Lv XF, et al. LncRNA KCNQ1OT1 delayed fracture healing through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(11):4575-4583. DOI:10.26355/eurrev_201906_18034.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.013

论著·临床

生酮饮食联合高强度间歇训练干预非酒精性脂肪肝的效果

文艺霏, 郑嵘灵, 刘华英, 潘珂君

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2020D01C421)

作者单位: 830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院感染病·肝病中心

通信作者: 潘珂君, E-mail: 15899199151@163.com

【摘要】目的 观察生酮饮食(KD)联合高强度间歇训练(HIIT)干预非酒精性脂肪肝(NAFL)的效果。**方法** 选取2020年6月—2022年3月新疆医科大学第一附属医院感染病·肝病中心收治的NAFL患者112例作为研究对象,按照随机数字表法以1:1比例分为对照组、观察组,各56例。对照组采用HIIT干预治疗,观察组在对照组基础上加用KD干预。比较2组干预前后肥胖指标[体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)、肥胖度、体脂率(Fat)]、糖代谢指标[空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FPG)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)]、脂代谢指标[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)]、炎症因子[高敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)、IL-8]、固醇调节元件结合蛋白-1(SREBP-1c)、视黄醇结合蛋白4(RBP4)、肌肉量、骨质量水平。**结果** 干预3个月后,观察组BMI、WHR、肥胖度、Fat低于对照组($t/P=6.183/ <0.001, 4.224/ <0.001, 3.362/0.001, 3.268/0.001$), FINS、FPG、HOMA-IR水平低于对照组($t/P=2.888/0.005, 2.983/0.004, 2.459/0.016$), TG、LDL-C水平低于对照组, HDL-C高于对照组($t/P=3.582/ <0.001, 3.416/ <0.001, 4.036/ <0.001$), 血清hs-CRP、IL-6、IL-8水平低于对照组($t/P=3.109/0.002, 3.862/ <0.001, 3.431/ <0.001$), 血清SREBP-1c、RBP4水平低于对照组($t/P=5.248/ <0.001, 3.978/0.002$); 肌肉量高于对照组($t/P=2.613/0.010$), 干预前后2组骨质量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** KD联合HIIT对NAFL的干预效果更佳,可有效控制肥胖,降低体质量,同时对糖脂代谢、炎症因子及血清SREBP-1c、RBP4水平有良好调节作用,且不影响肌肉量、骨质量。

【关键词】 非酒精性脂肪肝;生酮饮食;高强度间歇训练;糖脂代谢;炎症因子**【中图分类号】** R575.2 **【文献标识码】** A

Effect of ketogenic diet combined with high-intensity intermittent training on nonalcoholic fatty liver Wen Yifei, Zheng Rongjiong, Liu Huaying, Pan Kejun. Infectious Diseases Liver Disease Center of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Province, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Pan Kejun, E-mail: 15899199151@163.com

Funding program: Natural Science Fund of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020D01C421)

【Abstract】 Objective To observe the effect of ketogenic diet (KD) combined with high intensity interval training (HIIT) on nonalcoholic fatty liver (NAFL). **Methods** From June 2020 to March 2022, 112 patients with NAFL admitted to the Infectious Disease/Liver Disease Center of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University were selected as the study subjects. They were divided into the control group and the observation group with a ratio of 1:1 according to the random number table, with 56 patients in each group. The control group was treated with HIIT intervention, and the observation group was treated with KD intervention on the basis of the control group. Obesity indexes (body mass index (BMI), waist to hip ratio (WHR), obesity degree, body fat rate (Fat)), glucose metabolism indexes [fasting insulin (FINS), fasting blood glucose (FPG), insulin resistance index (HOMA-IR)], lipid metabolism indexes (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) Inflammatory factors [high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), interleukin-6 (IL-6), IL-8], sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1c), retinol binding protein-4 (RBP4), muscle mass, bone mass level. **Results** After 3 months of intervention, BMI, WHR, obesity and Fat in the observation group were lower than those in the control group ($t/P=6.183/ <0.001, 4.224/ <0.001, 3.362/0.001, 3.268/0.001$), FINS, FPG, HOMA-IR levels were lower than those in the control group ($t/P=2.888/0.005, 2.983/0.004, 2.459/0.016$), TG, LDL-C levels were lower than

those in the control group, HDL-C levels were higher than those in the control group ($t/P=3.582/ <0.001$, $3.416/ <0.001$, $4.036/ <0.001$). The level of serum hs-CRP, IL-6 ,IL-8 was lower than that of the control group ($t/P=3.109/0.002$, $3.862/ <0.001$, $3.431/ <0.001$), and the level of SREBP-1c and RBP4 in serum was lower than that of the control group ($t/P=5.248/ <0.001$, $3.978/0.002$). The muscle mass was higher than that of the control group ($t/P=2.613/0.010$). There was no significant difference in bone mass between the two groups before and after the intervention ($P>0.05$). **Conclusion** The intervention effect of KD and HIIT on NAFL is better, which can effectively control obesity, reduce body mass, and regulate glycolipid metabolism, inflammatory factors and serum SREBP-1c, RBP4 levels, without affecting muscle mass and bone mass.

【 Key words】 Non-alcoholic fatty liver disease; Ketogenic diet; High-intensity interval training; Glucose and lipid metabolism; Inflammatory factors

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)是指无过量饮酒史导致的脂肪贮积、肝实质细胞脂肪变性的临床病理表现,属于代谢综合征的重要组成部分^[1]。缺乏运动是导致 NAFL 发生的潜在因素,因此通过运动干预是改善 NAFL 的重要方式^[2]。既往临床多通过中等强度有氧运动进行运动干预,但由于中等强度有氧运动时间较长,患者难以坚持,近年来高强度间歇训练(HIIT)由于其在较短时间内就可消耗与中等强度有氧运动相同的能量受到临床关注,逐渐应用于 NAFL 的干预治疗^[3]。此外,不良饮食习惯也是导致 NAFL 发生的重要原因,因此,采取饮食干预同样是改善 NAFL 的关键^[4]。近年来提出的生酮饮食(KD)逐渐应用于肥胖症、代谢综合征等疾病的治疗中,由低碳水化合物、高蛋白质及脂肪组成的饮食方案通过模拟人体饥饿状态,发挥减脂、减重效果^[5]。以上 2 种方式对 NAFL 的改善均具有一定帮助,既往临床多通过比较不同饮食、运动干预方案对 NAFL 的改善效果^[6],较少将二者联合应用分析干预效果。基于此,本研究对 NAFL 患者首次采用 KD 联合 HIIT 进行干预并观察治疗效果,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 6 月—2022 年 3 月新疆医科大学第一附属医院感染病·肝病中心收治的 NAFL 患者 112 例作为研究对象,按照随机数字表法以 1:1 比例分为对照组、观察组,各 56 例。2 组性别、年龄、体质量指数(BMI)、脂肪肝程度、诱因、吸烟史、饮酒史、家族遗传史比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经医院伦理委员会批准(202005180132),患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:均符合“非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)”^[7]中 NAFL 诊断标准,经 B 型超声检查符合以下任意 2 项即可确诊:①肝脏近场回声呈弥漫性增强,回声较肾脏强;②肝脏远场回声逐渐衰减;③肝内管道结构不清。依从

表 1 对照组与观察组 NAFL 患者临床资料比较
Tab. 1 Comparison of clinical data of NAFL patients in the control group and the observation group

项 目	对照组 (n=56)	观察组 (n=56)	t/χ^2 值	P 值
性别(男/女)	30/26	33/23	0.327	0.568
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	35.28 $\pm$ 4.31	36.19 $\pm$ 4.14	1.140	0.257
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	28.03 $\pm$ 1.45	28.41 $\pm$ 1.39	1.416	0.160
病程($\bar{x}\pm s$,年)	3.16 $\pm$ 0.58	3.01 $\pm$ 0.51	1.453	0.149
脂肪肝程度 [例(%)]	轻度 22(39.29)	20(35.71)	0.508	0.776
	中度 24(42.86)	23(41.07)		
	重度 10(17.85)	13(23.22)		
诱因 [例(%)]	肥胖 51(91.07)	49(87.50)	0.373	0.541
	代谢综合征 30(53.57)	29(51.79)		
	2 型糖尿病 20(35.71)	22(39.29)		
吸烟史[例(%)]	32(57.14)	35(62.50)	0.334	0.563
饮酒史[例(%)]	36(64.29)	33(58.93)	0.340	0.560
家族遗传史[例(%)]	22(39.29)	26(46.43)	0.583	0.445

性良好,均配合完成相关检查、治疗。(2)排除标准:①妊娠期、哺乳期女性;②精神异常、认知障碍;③伴恶性肿瘤;④其他类型脂肪肝;⑤重要器官功能障碍;⑥存在免疫、血液系统疾病;⑦近期存在指导性规律运动;⑧存在运动系统损伤。

1.3 干预方法 对照组:采用 HIIT 进行干预,以 Pular cosmos 4.0 跑台结合 AE-GER Oxygen Analyzer 实施负荷递增试验对患者最大摄氧量(VO_{2max})测定,在适应 3 d 后获取 85% VO_{2max} 、60% VO_{2max} 心率(HR)、监测自我用力感觉,每次运动前采取 10 min 50% VO_{2max} 准备活动,然后放松 5 min,开始运动时强度为 80% VO_{2max} ,同时 HR 需达 174 次/min,持续 4 min,然后运动强度调整为 50% VO_{2max} ,持续 2 min,间歇 5 min,重复 5 次。每周运动 5 次。观察组:在对照组基础上加用 KD 干预治疗,根据体质量计算 1 d 所需总热量,标准体质量(kg)=身高(cm)-105,总热量=标准体质量(kg) $\times$ 25 kcal/kg,每天摄入 3%~5% 碳水化合物、18%~25% 蛋白质、70%~75% 脂肪。2 组均干预 3 个月。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 肥胖指标检测:空腹状态下以标准体质量秤测定干预前后体质量、身高、体脂率(Fat)、腰臀比(WHR)变化,其中 BMI = 体质量(kg)/身高(m)²,肥胖度 = (实际体质量 - 标准体质量)/标准体质量 × 100%,体脂率(Fat) = 1.2 × BMI + 0.23 × 年龄 - 5.4 - 10.8 × 性别(男性为 1,女性为 0);腰臀比(WHR) = 腰围/臀围。

1.4.2 糖代谢指标检测:于干预前后晨起采取空腹肘静脉血 7 ml,以血液生化分析仪(美国德灵公司,RxL2Max 型)测定空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FPG),并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = FPG × FINS/22.5。

1.4.3 脂代谢指标检测:上述血液以全自动生化分析仪(美国贝克曼公司,AU5800)检测三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。

1.4.4 血清炎性因子检测:上述血液 4 ml 离心留取血清,以酶联免疫吸附法测定高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)、IL-8,试剂盒购自上海酶联生物公司。

1.4.5 血清 SREBP-1c、RBP4 检测:上述血液以酶联免疫吸附法测定固醇调节元件结合蛋白-1(SREBP-1c)、视黄醇结合蛋白 4(RBP4)水平,试剂盒购自上海联硕生物公司。

1.4.6 肌肉量、骨质量水平检测:以人体成分分析仪(CareBo 810,购自鸿泰盛健康科技公司)检测,嘱咐患者脱去鞋袜,输入患者信息,包括性别、年龄、体质量等,让患者双足对准站立在感应区,5 s 后在仪器发出“哔哔”两声,嘱咐患者双手握住两边把手,待仪器再次发出“哔”声,测量结束。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件处理数据。计数资料以频数或率(%)描述,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,2 组间比较

采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组干预前后肥胖指标比较 干预前 2 组 BMI、WHR、肥胖度、Fat 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),干预 3 个月后 2 组 BMI、WHR、肥胖度、Fat 均较干预前下降,且观察组低于对照组($P < 0.01$),见表 2。

2.2 2 组干预前后糖代谢指标比较 干预前 2 组 FINS、FPG、HOMA-IR 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),干预 3 个月后 2 组 FINS、FPG、HOMA-IR 水平均较干预前降低,且观察组低于对照组($P < 0.01$ 或 0.05),见表 3。

表 3 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后糖代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of glucose metabolism indexes between NAFL patients in control group and observation group before and after intervention

组 别	时间	FINS(mIU/L)	FPG(mmol/L)	HOMA-IR
对照组 (n = 56)	干预前	16.47 ± 3.86	5.92 ± 0.97	3.77 ± 0.79
	干预后	14.09 ± 3.01	5.58 ± 0.81	3.14 ± 0.73
观察组 (n = 56)	干预前	17.63 ± 3.25	6.01 ± 0.86	3.89 ± 0.85
	干预后	12.54 ± 2.66	5.14 ± 0.75	2.81 ± 0.69
t/P 对照组内值		3.639/ <0.001	2.013/ <0.047	4.383/ <0.001
t/P 观察组内值		9.070/ <0.001	5.706/ <0.001	7.382/ <0.001
t/P 干预后组间值		2.888/ 0.005	2.983/ <0.004	2.459/ 0.016

2.3 2 组干预前后脂代谢指标比较 干预前 2 组 TG、LDL-C、HDL-C 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),干预 3 个月后 2 组 TG、LDL-C、HDL-C 水平均较干预前降低/升高,且观察组 TG、LDL-C 水平低于对照组,HDL-C 高于对照组($P < 0.01$),见表 4。

2.4 2 组干预前后血清炎性因子水平比较 干预前 2 组血清 hs-CRP、IL-6、IL-8 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),干预 3 个月后 2 组血清 hs-CRP、IL-6、

表 2 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后肥胖指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of obesity index of NAFL patients in control group and observation group before and after intervention

组 别	时间	BMI(kg/m ²)	WHR	肥胖度(%)	Fat(%)
对照组 (n = 56)	干预前	28.03 ± 1.45	0.90 ± 0.11	46.71 ± 7.14	44.91 ± 4.91
	干预后	25.74 ± 1.52	0.84 ± 0.07	35.68 ± 5.26	38.46 ± 4.68
观察组 (n = 56)	干预前	28.41 ± 1.39	0.94 ± 0.12	45.66 ± 6.08	46.85 ± 5.79
	干预后	24.01 ± 1.44	0.78 ± 0.08	32.46 ± 4.87	35.74 ± 4.11
t/P 对照组内值		8.158/ <0.001	3.444/ <0.001	9.307/ <0.001	7.116/ <0.001
t/P 观察组内值		16.624/ <0.001	8.302/ <0.001	12.680/ <0.001	11.709/ <0.001
t/P 干预后组间值		6.183/ <0.001	4.224/ <0.001	3.362/ <0.001	3.268/ 0.001

表 4 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后脂代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab. 4 Comparison of lipid metabolism indexes of NAFL patients in control group and observation group before and after intervention

组 别	时间	TG	LDL-C	HDL-C
对照组 (<i>n</i> = 56)	干预前	3.08 ± 0.53	3.21 ± 0.90	0.97 ± 0.21
	干预后	2.75 ± 0.30	2.68 ± 0.63	1.19 ± 0.20
观察组 (<i>n</i> = 56)	干预前	3.14 ± 0.45	3.09 ± 0.82	1.02 ± 0.24
	干预后	2.56 ± 0.26	2.31 ± 0.51	1.38 ± 0.29
<i>t</i> / <i>P</i> 对照组内值		4.055/ <0.001	3.610/ <0.001	5.677/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 观察组内值		8.351/ <0.001	6.045/ <0.001	7.157/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 干预后组间值		3.582/ <0.001	3.416/ <0.001	4.036/ <0.001

IL-8 水平均较干预前降低,且观察组低于对照组 ($P < 0.01$),见表 5。

表 5 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of serum inflammatory factor levels of NAFL patients in control group and observation group before and after intervention

组 别	时间	hs-CRP (mg/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)
对照组 (<i>n</i> = 56)	干预前	4.89 ± 1.24	46.01 ± 8.34	75.87 ± 13.40
	干预后	4.10 ± 0.79	34.35 ± 6.15	55.36 ± 7.56
观察组 (<i>n</i> = 56)	干预前	5.03 ± 1.17	44.32 ± 7.81	77.35 ± 11.54
	干预后	3.63 ± 0.81	30.17 ± 5.27	50.63 ± 7.02
<i>t</i> / <i>P</i> 对照组内值		4.021/ <0.001	8.420/ <0.001	9.976/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 观察组内值		7.362/ <0.001	11.239/ <0.001	14.803/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 干预后组间值		3.109/ 0.002	3.862/ <0.001	3.431/ <0.001

2.5 2 组干预前后血清 SREBP-1c、RBP4 水平比较
干预前 2 组血清 SREBP-1c、RBP4 水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),干预 3 个月后 2 组血清 SREBP-1c、RBP4 水平均降低,且观察组低于对照组 ($P < 0.01$),见表 6。

2.6 2 组干预前后肌肉量、骨质量比较
干预前 2 组肌肉量、骨质量比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);干预 3 个月后 2 组肌肉量均较干预前升高,且观察组高于对照组 ($P < 0.05$),2 组骨质量比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 7。

3 讨 论

近年来随着人们生活方式、饮食习惯改变,NAFL 已成为全球性健康问题,发达国家其发生率在 30% 左右,而我国 NAFL 人数超过 2 亿,且近年来发病率不断上升^[8]。研究指出,NAFL 的发生与胰岛素抵抗、营养因素、肥胖、糖脂代谢异常、遗传等多种因素有关,目前虽然对 NAFL 的发生机制具有一定了解,但临床并没

表 6 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后血清 SREBP-1c、RBP4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Comparison of serum SREBP-1c and RBP4 levels of NAFL patients in the control group and the observation group before and after intervention

组 别	时间	SREBP-1c (μg/L)	RBP4 (mg/L)
对照组 (<i>n</i> = 56)	干预前	21.58 ± 5.54	38.25 ± 5.86
	干预后	18.44 ± 4.29	33.18 ± 4.96
观察组 (<i>n</i> = 56)	干预前	22.09 ± 5.83	37.92 ± 6.03
	干预后	14.43 ± 3.78	29.54 ± 4.72
<i>t</i> / <i>P</i> 对照组内值		3.353/ 0.001	4.942/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 观察组内值		8.250/ <0.001	8.189/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 干预后组间值		5.248/ <0.001	3.978/ <0.001

注:SREBP-1c. 固醇调节元件结合蛋白-1;RBP4. 视黄醇结合蛋白 4。

表 7 对照组与观察组 NAFL 患者干预前后肌肉量、骨质量比较 ($\bar{x} \pm s$, kg)

Tab. 7 Comparison of muscle mass and bone mass of NAFL patients in control group and observation group before and after intervention

组 别	时间	肌肉量	骨质量
对照组 (<i>n</i> = 56)	干预前	49.05 ± 8.19	3.35 ± 0.73
	干预后	55.17 ± 7.34	3.34 ± 0.81
观察组 (<i>n</i> = 56)	干预前	48.37 ± 9.06	3.29 ± 0.67
	干预后	58.99 ± 8.11	3.37 ± 0.88
<i>t</i> / <i>P</i> 对照组内值		4.164/ <0.001	0.068/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 观察组内值		6.536/ <0.001	0.541/ <0.001
<i>t</i> / <i>P</i> 干预后组间值		2.613/ 0.010	0.188/ 0.852

有批准用于治疗 NAFL 的药物^[9]。由于 NAFL 具有可逆性,因此寻找能够逆转 NAFL 的有效策略,对预防因 NAFL 引发的肝炎、心血管疾病的发生具有重要意义。

运动疗法作为代谢性疾病基本治疗方式已逐渐应用于临床,既往研究指出^[10-11],长时间坚持中低强度的有氧运动可有效消耗脂肪,达到减重效果,但实际应用过程中发现由于其持续时间较长,导致患者难以坚持,从而影响干预效果。因此有学者指出^[12],在身体情况允许前提下进行 HIIT 更有助于脂肪的消耗。高艳敏等^[13]指出,采用 HIIT 能减少约 6% 脂肪比例,而采用中强度有氧运动且持续长时间方式仅减少约 3% 脂肪比例,同时 HIIT 训练平均时长在 20 min,而中强度有氧运动则需 40 min。因此采用 HIIT 更有助于减脂、减重,已被广泛用于 NAFL 的干预治疗。由于 NAFL 的发生不仅仅因为运动缺乏导致,不健康饮食习惯也是导致 NAFL 发生的重要因素,仅采用运动干预而不控制饮食很难发挥对 NAFL 的干预效果,因此,临床常采用运动 + 饮食的方式进行干预。既往饮食干

预多关注于减少脂肪摄入,长期以来收益并不明显,随着对高升糖指数碳水及糖类物质在代谢综合征中作用的认识,临床逐渐将饮食干预方式转移至 KD 中^[14]。由于机体的自我调节性,身体具备新陈代谢灵活性、利用可替代原料提供能量的能力,机体在碳水化合物供应受到限制后,胰岛素水平下降,使脂肪生成、储蓄降低,机体从以葡萄糖为基础能量代谢变化为以脂肪为基础能量代谢,机体再通过一系列复杂过程将脂肪转化为可通过血脑屏障的酮体,从而作为大脑和其他组织的替代能量来源,这一模式称为 KD^[15]。多项研究指出^[16-17],短期 KD 能降低肥胖者胰岛素抵抗、腰围、体质量,且随访过程中体质量能基本维持稳定。本研究结果显示,与单纯 HIIT 比较,采用 KD 联合 HIIT 方案干预效果更好,且肥胖指标、糖脂代谢、胰岛素抵抗均得到明显改善。结合既往研究分析 KD 相关作用机制^[18-19]:(1)KD 一方面通过减少食用碳水化合物减少热量摄入,再通过模拟饥饿状态,从而转换机体供能方式,发挥减重效果,同时酮体具有抑制胃促生长素释放效果,可增加机体饱腹感,进而减少摄食,降低能量摄入,以达到减重效果;(2)KD 降低了碳水化合物摄入,使酮体水平增加,直接降低循环中血糖水平,随之反馈性降低胰岛素分泌,减轻高胰岛素血症,从而减轻胰岛素抵抗;(3)在 KD 条件下,机体中游离脂肪酸被氧化产生大量乙酰辅酶 A,其可被肝脏线粒体基质转化为乙酰乙酸,而乙酰乙酸可激活 GPR43 酮体受体,调节脂蛋白脂肪酶活性,促使脂质分解,从而调节血脂水平。因此 KD 与 HIIT 联合使用能在不同机制发挥减重效果,从而提升干预效果。此外,有研究指出^[20],仅通过 KD 可导致肌肉量、骨质量下降。而本研究中却发现,与 HIIT 联用后骨质量并没有变化,而肌肉量却有所增加,分析原因可能在于通过 HIIT 能提升一定肌肉量,从而减少 KD 对肌肉量的影响。

研究指出,NAFL 多存在不同程度肠道菌群失调,导致其内毒素明显增加,激活炎性级联反应,释放大量的 hs-CRP、IL-6、IL-8 等炎性因子,炎性因子与内毒素相互影响,加重肝细胞炎性反应,形成恶性循环,参与 NAFL 发展^[21]。因此改善 NAFL 患者机体炎性反应也是控制 NAFL 进展的重要措施。本研究中干预后观察组血清炎性因子水平明显降低,表明 KD 联合 HIIT 能进一步减轻 NAFL 患者机体炎性反应。分析原因可能在于 KD 能通过酮体调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 活性,使肉碱棕榈酰转移酶 1A、脂肪酸代谢相关基因上调,丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 4、葡萄糖代谢基因下调,从而促使线粒体生物合成,提升细胞

抗氧化应激能力,减少炎性因子的生成、释放^[22]。另有研究指出^[23],SREBP-1c、RBP4 在 NAFL 发生、发展中具有重要作用,其中 SREBP-1c 为体内脂质平衡主要调节者,可参与脂代谢紊乱,其水平过度表达可使脂肪合成增加,在肝脏等非脂肪组织聚积;RBP4 为肽类激素之一,近年来发现其可通过抑制磷脂酰肌醇 3 激酶活性等方式介导胰岛素抵抗发生发展,其水平升高可降低葡萄糖转运蛋白 4 合成,抑制肝脏对葡萄糖利用,并促使脂肪脂解,造成脂肪在肝脏沉积。本研究结果显示,采用 KD 联合 HIIT 干预后血清 SREBP-1c、RBP4 明显降低,由此推测 KD 联合 HIIT 可通过调节血清 SREBP-1c、RBP4 水平改善胰岛素抵抗、减少肝脏脂肪生成,从而逆转 NAFL,但具体机制尚未明确,可作为后续研究重点。

综上所述,KD 联合 HIIT 对 NAFL 的干预效果更佳,可有效控制肥胖,降低体质量,同时对糖脂代谢、炎性因子及血清 SREBP-1c、RBP4 水平有良好调节作用,同时不影响肌肉量、骨质量。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

文艺霏:实施研究过程,论文撰写;郑嵘灵:课题设计,实施研究过程;刘华英:资料搜集整理,分析试验数据;潘珂君:实施研究过程,论文审核

参考文献

- [1] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Lancet, 2021, 397(10290): 2212-2224. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32511-3.
- [2] Zhou BJ, Huang G, Wang W, et al. Intervention effects of four exercise modalities on nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and Bayesian network meta-analysis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(24): 7687-7697. DOI: 10.26355/eurrev_202112_27615.
- [3] 李红梅, 毛彬彬. 高强度间歇训练在慢性病防治中的应用研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(2): 137-142. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6710.2019.02.009.
- Li HM, Mao SS. Research progress in the application of high-intensity interval training in the prevention and treatment of chronic diseases[J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2019, 38(2): 137-142. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6710.2019.02.009.
- [4] Buzzetti E, Linden A, Best LM, et al. Lifestyle modifications for non-alcohol-related fatty liver disease: a network meta-analysis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 6(6): CD013156. DOI: 10.1002/14651858.
- [5] 梁茂珊. 生酮饮食在几种常见内分泌代谢病中的临床应用进展[J]. 海南医学, 2021, 32(13): 1739-1742. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2021.13.031.
- Liang MS. Progress in clinical application of ketogenic diet in several common endocrine and metabolic diseases[J]. Hainan Medical Jour-

- nal, 2021, 32 (13) : 1739-1742. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-6350. 2021. 13. 031.
- [6] Khalafi M, Symonds ME. The impact of high-intensity interval training on inflammatory markers in metabolic disorders; A meta-analysis [J]. Scand J Med Sci Sports, 2020, 30 (11) : 2020-2036. DOI: 10. 1111/sms. 13754.
- [7] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南 (2018 更新版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26 (3) : 195-203. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1007-3418. 2018. 03. 008.
Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group, Hepatology Branch, Chinese Medical Association, Fatty Liver Disease Expert Committee, Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of non alcoholic fatty liver disease (2018 Update) [J]. Chinese Journal of Liver Diseases, 2018, 26 (3) : 195-203. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1007-3418. 2018. 03. 008.
- [8] Arshad T, Golabi P, Henry L, et al. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in North America [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26 (10) : 993-997. DOI: 10. 2174/138161282666200303114934.
- [9] Hallsworth K, Thoma C, Hollingsworth KG, et al. Modified high-intensity interval training reduces liver fat and improves cardiac function in non-alcoholic fatty liver disease; a randomized controlled trial [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129 (12) : 1097-1105. DOI: 10. 1042/CS20150308.
- [10] Sabag A, Barr L, Armour M, et al. The effect of high-intensity interval training vs moderate-intensity continuous training on liver fat; A systematic review and Meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107 (3) : 862-881. DOI: 10. 1210/clinem/dgab795.
- [11] Keating SE, Johnson NA, Mielke GI, et al. A systematic review and meta-analysis of interval training versus moderate-intensity continuous training on body adiposity [J]. Obes Rev, 2017, 18 (8) : 943-964. DOI: 10. 1111/obr. 12536.
- [12] Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, et al. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH [J]. Mol Metab, 2021, 53 (1) : 101270. DOI: 10. 1016/j. molmet. 2021. 101270.
- [13] 高艳敏, 王光明, 杨文礼, 等. 高强度间歇训练和有氧运动对肥胖青年脂代谢及慢性炎症的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2017, 36 (7) : 628-632, 650. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-6710. 2017. 07. 011.
Gao YM, Wang GM, Yang WL, et al. Effects of high-intensity interval training and aerobic exercise on fat metabolism and chronic inflammation in obese youth [J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2017, 36 (7) : 628-632, 650. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-6710. 2017. 07. 11.
- [14] 张汀樾, 李钰婷, 李小舟, 等. 生酮饮食与代谢相关脂肪性肝病的关系 [J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25 (18) : 1-5. DOI: 10. 7619/jcmp. 20212327.
Zhang TY, Li YT, Li XZ, et al. The relationship between ketogenic diet and metabolism related fatty liver disease [J]. Journal of Practical Clinical Medicine, 2021, 25 (18) : 1-5. DOI: 10. 7619/jcmp. 20212327.
- [15] 赵莎莎, 吴丽, 张以婧, 等. 生酮饮食与临床常见疾病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28 (5) : 953-958. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2022. 05. 021.
Zhao SS, Wu L, Zhang YJ, et al. Research progress on the relationship between ketogenic diet and common clinical diseases [J]. Medical Review, 2022, 28 (5) : 953-958. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2022. 05. 021.
- [16] Pilone V, Tramontano S, Renzulli M, et al. Metabolic effects, safety, and acceptability of very low-calorie ketogenic dietetic scheme on candidates for bariatric surgery [J]. Surg Obes Relat Dis, 2018, 14 (7) : 1013-1019. DOI: 10. 1016/j. soard. 2018. 03. 018.
- [17] 杨辉, 张片红, 江波, 等. 生酮饮食及限能平衡饮食对超重及肥胖者人体成分及生化指标的影响 [J]. 营养学报, 2018, 40 (4) : 403-405. DOI: 10. 3969/j. issn. 0512-7955. 2018. 04. 019.
- [18] 刘诗贺, 南伟伟, 李晓莲, 等. 生酮饮食的临床应用与研究进展 [J]. 生理科学进展, 2021, 52 (6) : 445-450. DOI: 10. 3969/j. issn. 0559-7765. 2021. 06. 009.
Liu SH, Nan WW, Li XL, et al. Clinical application and research progress of ketogenic diet [J]. Progress in Physiology Science, 2021, 52 (6) : 445-450. DOI: 10. 3969/j. issn. 0559-7765. 2021. 06. 009.
- [19] 龚琳捷, 张松. 低碳生酮饮食干预 2 型糖尿病的研究进展 [J]. 临床荟萃, 2021, 36 (7) : 651-654. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-583X. 2021. 07. 016.
Gong LJ, Zhang S. Research progress in the intervention of low-carbon ketogenic diet on type 2 diabetes [J]. Clinical Meta, 2021, 36 (7) : 651-654. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-583X. 2021. 07. 016.
- [20] 许晓林, 吴秀华, 朱青安. 生酮饮食诱导骨丢失机制的研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98 (33) : 2691-2693. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2018. 33. 018.
Xu XL, Wu XH, Zhu QA. Research progress on mechanism of bone loss induced by ketogenic diet [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 98 (33) : 2691-2693. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2018. 33. 018.
- [21] 陈洁, 陈佳良, 肖琨珉, 等. 炎症因子与非酒精性脂肪性肝病关系研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25 (15) : 2949-2954. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2019. 15. 007.
Chen J, Chen JL, Xiao KM, et al. Research progress on the relationship between inflammatory factors and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Medical Review, 2019, 25 (15) : 2949-2954. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2019. 15. 007.
- [22] 赵舒含, 廖建湘. 生酮饮食抗炎作用机制研究进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36 (11) : 873-875. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101070-20200904-01468.
Zhao SH, Liao JX. Research progress on the anti-inflammatory mechanism of ketogenic diet [J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2021, 36 (11) : 873-875. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101070-20200904-01468.
- [23] Flores-Cortez YA, Barrag n-Bonilla MI, Mendoza-Bello JM, et al. Interplay of retinol binding protein 4 with obesity and associated chronic alterations (Review) [J]. Mol Med Rep, 2022, 26 (1) : 244. DOI: 10. 3892/mmr. 2022. 12760.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.014

论著·临床

支气管肺发育不良早产儿血浆 miR-15b、VEGF 水平变化及临床意义

张雯雯, 翁景文, 吴丹, 向希盈, 郑旭

基金项目: 首都卫生发展科研项目(首发 2020-3-7028)

作者单位: 100045 北京, 首都医科大学附属北京儿童医院新生儿内科

通信作者: 翁景文, E-mail: drzcattery@163.com

【摘要】目的 分析支气管肺发育不良早产儿血浆 miR-15b、血管内皮生长因子(VEGF)水平变化及临床意义。**方法** 收集 2020 年 3 月—2022 年 3 月首都医科大学附属北京儿童医院新生儿内科收治的早产儿 148 例, 根据是否存在支气管肺发育不良分为支气管肺发育不良组(不良组)65 例和发育正常组(正常组)83 例。实时荧光定量聚合酶链反应检测血浆 miR-15b 表达, 酶联免疫吸附试验检测血浆 VEGF 水平, 收集相关临床资料。Pearson 相关系数描述血浆 miR-15b 与 VEGF 之间相关性, 多因素 Logistic 回归分析影响早产儿支气管肺发育不良的因素。受试者工作特征曲线(ROC)分析血浆 miR-15b、VEGF 辅助诊断早产儿支气管肺发育不良的价值。**结果** 不良组血浆 miR-15b 表达高于正常组, VEGF 水平低于正常组($t/P=12.754/ <0.001$, $31.023/ <0.001$), 血浆 miR-15b 表达与 VEGF 呈负相关($r/P=-0.617/ <0.001$)。胎龄大、氧分压高、VEGF 高是早产儿支气管肺发育不良的保护因素, miR-15b 高是危险因素[$OR(95\% CI)=0.899(0.845 \sim 0.958)$ 、 $0.521(0.356 \sim 0.764)$ 、 $0.600(0.442 \sim 0.814)$ 、 $1.540(1.220 \sim 1.945)$]。血浆 miR-15b、VEGF 及二者联合诊断早产儿支气管肺发育不良的曲线下面积分别为 0.728、0.756、0.931, 且二者联合高于单独诊断($Z/P=4.543/ <0.001$, $4.207/ <0.001$)。**结论** 支气管肺发育不良早产儿血浆 miR-15b 表达上调, VEGF 水平降低, miR-15b 可能负向调控 VEGF 参与支气管肺发育不良过程。

【关键词】 支气管肺发育不良; 早产儿; miR-15b; 血管内皮生长因子**【中图分类号】** R562.2; R722.6**【文献标识码】** A

Changes and clinical significance of plasma miR-15b and VEGF levels in premature infants with bronchopulmonary dysplasia Zhang Wenwen, Weng Jingwen, Wu Dan, Xiang Xiying, Zheng Xu. Department of Neonatal Medicine, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China

Corresponding author: Weng Jingwen, E-mail: drzcattery@163.com

Funding program: Capital Health Development Scientific Research Project (2020-3-7028)

【Abstract】 Objective To analyze the changes and clinical significance of plasma miR-15b and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in premature infants with bronchopulmonary dysplasia. **Methods** A total of 148 premature infants admitted to the Department of Neonatology, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, from March 2020 to March 2022 were collected. They were divided into bronchopulmonary dysplasia group (65 cases) and normal development group (normal group, 83 cases) based on whether or not they had bronchopulmonary dysplasia. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of miR-15b in plasma, and enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the level of VEGF in plasma. Relevant clinical data were collected. Pearson correlation coefficient describes the correlation between miR-15b and VEGF, and multivariate logistic regression analysis is used to analyze the factors affecting bronchopulmonary dysplasia in premature infants. The value of miR-15b and VEGF in the auxiliary diagnosis of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants was analyzed by subject performance characteristic curve (ROC) analysis. **Results** The expression of plasma miR-15b in the adverse group was higher than that in the normal group, and the level of VEGF was lower than that in the normal group ($t/P=12.754/ <0.001$, $31.023/ <0.001$). The expression of plasma miR-15b was negatively correlated with VEGF ($r/P=-0.617/ <0.001$). Large gestational age, high partial pressure of oxygen, and high VEGF are protective factors for bronchopulmonary dysplasia in premature infants, while high miR-15b is a risk factor [$OR(95\% CI)=0.899(0.845 \sim 0.958)$, $0.521(0.356 \sim 0.764)$, $0.600(0.442 \sim 0.814)$, and $1.540(1.220 \sim 1.945)$]. The area under the curve of miR-15b, VEGF, and their combination in the diagnosis of bronchopulmonary dysplasia in premature infants was 0.728, 0.756, and 0.931, respectively, and the combination of the two was higher than that of the single diagnosis ($Z/P=$

4.543/ <0.001, 4.207/ <0.001). **Conclusion** The expression of miR-15b in the plasma of premature infants with bronchopulmonary dysplasia is upregulated, and the level of VEGF is decreased. miR-15b may negatively regulate VEGF participation in the process of bronchopulmonary dysplasia.

[Key words] Bronchopulmonary dysplasia; Premature infants; MiR-15b; Vascular endothelial growth factor

支气管肺发育不良是引起持续性呼吸窘迫的一种慢性肺部疾病,多见于早产儿,支气管发育不良会造成不可逆的黏膜上皮损伤,即便接受足够疗程的治疗,也会对未来生长发育产生严重的负面影响^[1]。支气管肺发育不良主要病理特点为肺泡及肺微血管发育受阻,肺泡数量和肺毛细血管床减少等^[2]。微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)通过促进 mRNA 降解或表征来调节基因表达,调控细胞增殖分化、血管生成等过程,与肺部疾病密切相关^[3]。研究显示 miR-15b 可调控血管细胞增殖、分化和凋亡,过表达 miR-15b 显著抑制新生血管生成和侧支动脉形成^[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促血管生长因子,对肺的发育和修复十分重要,研究显示 VEGF 水平是新生儿肺损伤的指标和治疗靶点^[5]。现分析早产儿血浆中 miR-15b 表达和 VEGF 水平及其与支气管肺发育不良的关系,旨在为临床诊治提供参考,

报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 3 月—2022 年 3 月首都医科大学附属北京儿童医院新生儿内科收治早产儿 148 例,根据是否存在支气管肺发育不良将患儿分为支气管肺发育不良组(不良组)65 例和发育正常组(正常组)83 例。不良组早产儿胎龄、出生体质量、出生 5 min Apgar 评分低于正常组($P < 0.01$),吸氧浓度、抗生素使用时间 & 多胎、肺表面活性物质使用、有创机械通气、输血、呼吸窘迫综合征、绒毛膜羊膜炎比例高于正常组($P < 0.05$),2 组性别、分娩方式、胎膜早破、前置胎盘、C 反应蛋白(CRP)、血红蛋白(Hb)、脓毒症、坏死性小肠结肠炎、母亲年龄、妊娠期糖尿病、妊娠期高血压、使用地塞米松比例比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。本研究获得医院伦理委员会批准(2020-214),患儿家属知情同意并签署知情同意书。

表 1 不良组和正常组早产儿临床资料比较

Tab. 1 Comparison of Clinical Data of Preterm Infants in the Adverse Reaction Group and the Control Group

项 目		正常组($n = 83$)	不良组($n = 65$)	t/χ^2 值	P 值
性别[例(%)]	男	48(57.83)	35(53.85)	0.235	0.628
	女	35(42.17)	30(46.15)		
胎龄($\bar{x} \pm s$,周)		34.95 $\pm$ 1.05	32.05 $\pm$ 2.06	11.120	<0.001
出生体质量($\bar{x} \pm s$,g)		2 105.35 $\pm$ 312.48	1 802.32 $\pm$ 263.35	6.266	<0.001
分娩方式[例(%)]	阴道分娩	62(74.70)	41(63.08)	2.327	0.127
	剖宫产	21(25.30)	24(36.92)		
多胎[例(%)]		7(8.43)	15(23.08)	6.176	0.013
胎膜早破[例(%)]		30(36.14)	21(32.31)	0.238	0.626
前置胎盘[例(%)]		9(10.84)	7(10.77)	0.001	0.988
出生 5 min Apgar 评分($\bar{x} \pm s$,分)		8.35 $\pm$ 1.65	7.05 $\pm$ 1.65	4.757	<0.001
CRP($\bar{x} \pm s$,mg/L)		2.01 $\pm$ 0.56	2.03 $\pm$ 0.42	0.240	0.811
Hb($\bar{x} \pm s$,g/L)		163.59 $\pm$ 4.16	162.31 $\pm$ 6.25	1.492	0.138
吸氧浓度($\bar{x} \pm s$,%)		30.11 $\pm$ 3.76	34.15 $\pm$ 2.25	7.653	<0.001
抗生素使用时间($\bar{x} \pm s$,d)		10.31 $\pm$ 2.06	15.02 $\pm$ 2.35	28.304	<0.001
肺表面活性物质使用[例(%)]		42(50.60)	54(83.08)	16.868	<0.001
有创机械通气[例(%)]		6(7.23)	40(61.54)	50.194	<0.001
输血[例(%)]		2(2.41)	11(16.92)	9.583	0.002
脓毒症[例(%)]		2(2.41)	2(3.08)	0.062	0.804
呼吸窘迫综合征[例(%)]		31(37.35)	49(75.38)	21.234	<0.001
坏死性小肠结肠炎[例(%)]		5(6.02)	7(10.77)	1.102	0.294
母亲年龄($\bar{x} \pm s$,岁)		28.91 $\pm$ 4.13	29.35 $\pm$ 4.23	0.636	0.526
妊娠期糖尿病[例(%)]		19(22.89)	13(20.00)	0.180	0.672
妊娠期高血压[例(%)]		8(9.64)	6(9.23)	0.007	0.933
绒毛膜羊膜炎[例(%)]		3(3.61)	10(15.38)	6.303	0.012
产前使用地塞米松[例(%)]		23(27.71)	18(27.69)	0.001	0.998

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①胎龄 28 ~ 37 周;②入住新生儿重症监护病房。(2)排除标准:①法洛四联征、肺动脉闭锁、右室双出口、大动脉转位等复杂性先天性心脏病;②气管食管瘘,气管支气管闭锁,气管支气管狭窄等呼吸系统严重畸形;③染色体异常、遗传代谢性疾病。支气管肺发育不良诊断标准^[6]:任何氧依赖(氧浓度 > 21%)超过 28 d 的早产儿。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 miR-15b 检测:所有患儿入组后当日均采集静脉血 3 ml 注入肝素抗凝试管离心留取血浆, -80℃ 保存。取血浆样本, Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA, 生物分析仪 2200(美国 Agilent 公司)测定 RNA 纯度确定 RNA 质量(> 8.0 为合格), miRNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司)纯化 miRNA, Ion Total RNA-Seq Kit v2.0(美国 Life Technologies 公司)将 RNA 逆转录为 cDNA。取 cDNA 样品, 使用 SYBR Green Master 混合试剂盒(日本 TaKaRa 公司)在 ABI Prizm 7300 序列检测系统(美国 Applied Biosystems 公司)上进行实时荧光定量聚合酶链反应。引物序列: miR-15b 上游 5'-TAGCAGCACATAATGGTTTGTG-3', 下游 5'-GCGTAGCAGCACATCATGG-3'; U6 上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'; 下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。以 U6 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法量化 miR-15b 表达。反应条件为:预变性 95℃ 5 min, 然后 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。反应体系:DNA 模板 2 μl, 上下游引物各 1 μl, Premix Ex Taq DNA 聚合酶 25 μl, RNase-Free ddH₂O 21 μl。引物设计由美国赛默飞公司提供。

1.3.2 VEGF、CRP、Hb 检测:上述血浆样本, 采用 Varioskan LUX 酶标仪(美国赛默飞公司)应用酶联免疫吸附试验检测血浆 VEGF、CRP 水平, VEGF 试剂盒购自上海纪宁生物科技有限公司, C 反应蛋白试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。采用全自动血细胞分析仪(美国贝克曼库尔特公司)检测 Hb 水平。

1.3.3 血气分析:采集患者动脉血 1 ml, 以 ABL 血气分析仪(丹麦雷杜公司)检测动脉血 pH、氧分压、二氧化碳分压。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.00 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Student-*t* 检验; 计数资料以频数或率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验; Pearson 相关系数描述 miR-15b 与 VEGF 之间的相关性; 多因素 Logistic 回归分析影响早产儿支气管肺发育不良的因素; 受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析

miR-15b、VEGF 辅助诊断早产儿支气管肺发育不良的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组血浆 miR-15b、VEGF 水平比较 不良组血浆 miR-15b 表达高于正常组, VEGF 水平低于正常组($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 正常组和不良组早产儿血浆 miR-15b、VEGF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of plasma miR-15b and VEGF levels in preterm infants in the adverse group and the control group

组 别	例数	miR-15b	VEGF(ng/L)
正常组	83	2.02 ± 0.77	175.16 ± 10.79
不良组	65	5.02 ± 1.96	86.35 ± 23.09
<i>t</i> 值		12.754	31.023
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 2 组血气分析比较 不良组早产儿 pH、氧分压低于正常组, 二氧化碳分压高于正常组($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 正常组和不良组早产儿血气分析比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of Blood Gas Analysis of Preterm Infants in the Adverse HTSS and Control Groups

组 别	例数	pH	氧分压(mmHg)	二氧化碳分压(mmHg)
正常组	83	7.26 ± 0.19	57.12 ± 9.03	48.21 ± 7.12
不良组	65	7.15 ± 0.21	45.35 ± 6.09	55.32 ± 6.09
<i>t</i> 值		3.337	9.021	6.419
<i>P</i> 值		0.001	<0.001	<0.001

2.3 血浆 miR-15b、VEGF 的相关性分析 不良组早产儿血浆 miR-15b 表达与 VEGF 水平呈负相关($r = -0.617 / < 0.001$)。

2.4 早产儿支气管肺发育不良的危险因素分析 以早产儿是否发生支气管肺发育不良为因变量(赋值: 0 = 否, 1 = 是), 以胎龄、多胎、出生体质量、出生 5 min Apgar 评分、pH、氧分压、二氧化碳分压、吸氧浓度、肺表面活性物质使用、呼吸窘迫综合征、输血、有创机械通气、绒毛膜羊膜炎、miR-15b、VEGF 为自变量, 进行多因素 Logistic 回归分析结果显示, 胎龄大、氧分压高、VEGF 高是早产儿支气管肺发育不良的保护因素($P < 0.01$), miR-15b 高是危险因素($P < 0.01$), 见表 4。

2.5 血浆 miR-15b、VEGF 诊断早产儿支气管肺发育不良的价值 绘制 miR-15b、VEGF 诊断早产儿支气管肺发育不良的 ROC 曲线, 并计算曲线下面积(AUC)值, 结果显示, 血浆 miR-15b、VEGF 及二者联合诊断早

表 4 早产儿支气管肺发育不良的多因素 Logistic 回归分析

Tab. 4 Multivariate Logistic Regression Analysis of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants

因 素	β 值	SE 值	Wald 值	OR(95% CI)	P 值
常数项	10.352	2.956	12.264	—	<0.001
胎龄大	-0.106	0.032	10.973	0.899(0.845 ~ 0.958)	<0.001
出生体质量低	0.326	0.207	2.480	1.385(0.923 ~ 2.079)	0.265
多胎	0.251	0.243	1.067	1.285(0.798 ~ 2.069)	0.902
出生 5 min Apgar 评分低	0.201	0.175	1.319	1.223(0.868 ~ 1.723)	0.552
pH 低	0.312	0.296	1.111	1.366(0.765 ~ 2.440)	0.832
吸氧浓度高	0.189	0.177	1.140	1.208(0.854 ~ 1.709)	0.779
肺表面活性物质使用	0.201	0.169	1.415	1.223(0.878 ~ 1.703)	0.485
呼吸窘迫综合征	0.158	0.143	1.221	1.171(0.885 ~ 1.550)	0.624
有创机械通气	0.098	0.085	1.329	1.103(0.934 ~ 1.303)	0.503
输血	0.209	0.183	1.304	1.232(0.861 ~ 1.764)	0.589
绒毛膜羊膜炎	0.175	0.163	1.153	1.191(0.865 ~ 1.640)	0.742
氧分压高	-0.652	0.195	11.180	0.521(0.356 ~ 0.764)	<0.001
二氧化碳分压高	0.236	0.227	1.081	1.266(0.811 ~ 1.976)	0.895
miR-15b 高	0.432	0.119	13.179	1.540(1.220 ~ 1.945)	<0.001
VEGF 高	-0.511	0.156	10.730	0.600(0.442 ~ 0.814)	<0.001

产儿支气管肺发育不良的 AUC 分别为 0.728、0.756、0.931,二者联合诊断早产儿支气管肺发育不良的 AUC 高于单独诊断($Z=4.543/4.207$, P 均<0.001),见表 5、图 1。

表 5 血浆 miR-15b、VEGF 诊断早产儿支气管肺发育不良的 ROC 曲线参数

Tab. 5 miR-15b, ROC Curve Parameters for VEGF Diagnosis of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants

因 素	临界值	AUC(95% CI)	敏感度	特异度	约登指数
miR-15b	>4.32	0.728(0.649 ~ 0.798)	0.677	0.747	0.424
VEGF	<120.35 ng/L	0.756(0.679 ~ 0.823)	0.708	0.759	0.467
二者联合		0.931(0.878 ~ 0.966)	0.923	0.940	0.863

3 讨 论

支气管肺发育不良是极低出生体质量新生儿死亡和长期发病的最常见因素,常见的病因包括含氧量高、缺乏清除自由基的能力,缺乏维生素 A 和维生素 E,胎膜过早破裂、小胎龄儿等,发病机制涉及高氧诱导肺损伤、通气诱导肺损伤、宫内和产后炎症反应,参与肺泡和血管发育基因调控机制异常^[7-8]。肺泡和血管发育受阻是支气管肺发育不良发病的关键,肺微毛细血管网络生长受限,肺血流量减低,导致气体交换障碍,并导致呼吸功能不全、低氧血症、运动不耐受、喘息、严重发育迟缓等严重的产后后遗症,促进内皮细胞生长和血管生成可能会降低支气管肺发育不良和晚期呼吸道疾病的风险^[9]。

miRNAs 是内源性产生的长 21 ~ 23 个核苷酸的单

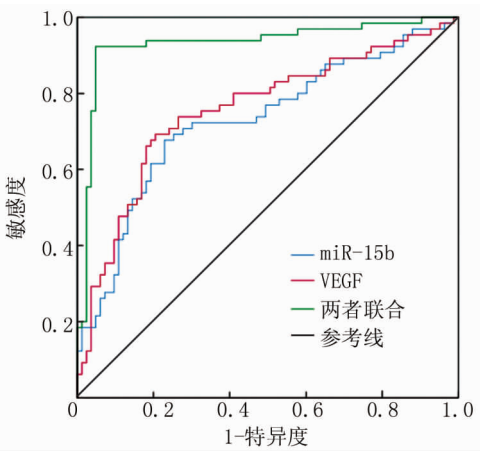


图 1 血浆 miR-15b、VEGF 诊断早产儿支气管肺发育不良的 ROC 图

Fig. 1 miR-15b, ROC diagram of VEGF in diagnosis of bronchopulmonary dysplasia in premature infants

链非编码 RNA 分子,通过结合其 3 非翻译区介导 mR-NA 靶标的转录后调控,调节血管生成的各个阶段^[10]。研究显示,过表达 miR-191 通过靶向血管内皮锌指 1 (VEZF1)抑制缺血性脑损伤大鼠模型脑血管生成^[11]。miR-21-3p 通过抑制磷酸酶和紧张素同源物及芽生同源物 1,增强内皮细胞的血管生成活性,促使皮肤伤口愈合^[12]。miR-15b 被认为是一种致癌基因,通过抑制肿瘤抑制因子孕酮及脂联素受体家族成员 3 表达促进乳腺癌细胞迁移、侵袭和疾病进展^[13]。miR-15b 还参与血管生成调节,研究显示,过表达 miR-15b 通过靶向下调 VEGF 表达抑制血管生成,缓解增生性糖尿病视网膜病变进展^[14]。miR-15b 在肝细胞癌中过表达,通

过靶向 PDGCD4 促进肝癌细胞的迁移、侵袭^[15]。本研究发现,血浆 miR-15b 在支气管肺发育不良早产儿中表达上调,miR-15b 表达增高是支气管肺发育不良的危险因素,分析可能的机制为:血管内皮生长因子 A 及其主要受体血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 与支气管肺发育不良的发病机制有关,VEGFR-2 正常表达可促使肺新生血管形成和发育,编码 VEGFR-2 基因变异则引起 VEGFR-2 表达异常,与支气管肺发育不良发生有关,miR-15b 是 VEGFR-2 的上游调控 miRNA,可通过靶向 VEGFR-2 的 3 非翻译区抑制 VEGFR-2 表达,阻碍静脉内皮细胞迁移和小血管形成^[16-17]。

VEGF 是一个蛋白质家族的成员,又称 VEGF-A,通过与 VEGF 受体结合调节多种激酶的活性,促使血管和淋巴管内皮细胞增殖、迁移、存活,诱导新生血管和淋巴管,在血管生理稳态中发挥重要作用^[18-19]。在病理血管生成中 VEGF 呈过度表达,缺氧是 VEGF 激活的主要途径,表皮生长因子、血小板衍生生长因子、致癌突变等也可协调 VEGF 表达和驱动 VEGF 信号通路激活,与内皮细胞上受体结合激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白等信号转导通路启动血管生成过程,引起支气管细胞的再调节和炎症反应,导致肺动脉高压、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺纤维化和肺癌等各种肺部疾病的发生^[20-22]。然而本研究发现,支气管肺发育不良早产儿中 VEGF 水平显著降低,VEGF 是早产儿支气管肺发育不良的保护性因素,表明在支气管肺发育不良发病过程中 VEGF 可能起到保护支气管和肺正常发育的作用,VEGF 的缺失将可能引起支气管和肺发育不良。Hirsch 等^[23]报道也指出,产前或产后增加缺氧诱导因子表达可诱导 VEGF 和内皮型一氧化氮合酶表达上调,增加肺泡计数和肺血管密度,改善肺结构和功能,预防支气管肺发育不良。

本研究相关性分析发现,miR-15b 表达与 VEGF 呈负相关,推测 miR-15b 表达上调可能负向调节 VEGF 表达,引起肺血管的发育及肺泡化受损,导致支气管肺发育不良。Yang 等^[14]研究发现,VEGF 是 miR-15b 的直接靶点,miR-15b 通过直接靶向 VEGF 的 3 非翻译区域调节 VEGF 转录,过表达 miR-15b 可呈剂量依赖性抑制内皮细胞中 VEGF 转录和蛋白表达。缺氧治疗可降低人鼻咽癌细胞中 miR-15b 的表达,但导致 VEGF 表达增加,通过促进 miR-15b 的表达可抑制胶质瘤中新生血管的形成^[24],这也证实了本研究支气管肺发育不良中 miR-15b 表达与 VEGF 负相关的

结论。

ROC 曲线分析结果显示,联合 miR-15b 和 VEGF 有助于诊断早产儿支气管肺发育不良的风险,回归分析胎龄、氧分压与支气管肺发育不良也有关,朱良梅等^[25]也指出胎龄越小、氧分压越低,发生支气管肺发育不良风险越大,临床应警惕高危早产儿,及时干预,以预防支气管肺发育不良的发生。

综上,支气管肺发育不良早产儿血浆 miR-15b 表达上调,VEGF 水平降低,高表达血浆 miR-15b,低水平 VEGF 与早产儿支气管肺发育不良有关,miR-15b 表达与 VEGF 呈负相关,提示 miR-15b 可能通过负向调控 VEGF 参与早产儿支气管肺发育不良的过程,但是该结论尚不确定,仍需开展进一步基础研究加以证实。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张雯雯:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;吴丹、向希盈:提出研究思路,分析试验数据;翁景文:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;郑旭:进行统计学分析

参考文献

- [1] Zhang W, Wang S. Diagnostic value of multi-slice spiral computed tomography for bronchial dysplasia in premature infants[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 7375-7381. DOI: 10. 12659/MSM. 911749.
- [2] Lee Y, Lee J, Nam SK, et al. S-endoglin expression is induced in hyperoxia and contributes to altered pulmonary angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia development[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3043. DOI: 10. 1038/s41598-020-59928-x.
- [3] Kishore A, Petrek M. Roles of macrophage polarization and macrophage-derived miRNAs in pulmonary fibrosis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 678457. DOI: 10. 3389/fimmu. 2021. 678457.
- [4] Zhu LP, Zhou JP, Zhang JX, et al. MiR-15b-5p regulates collateral artery formation by targeting AKT3 (Protein Kinase B-3)[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(5): 957-968. DOI: 10. 1161/ATVBAHA. 116. 308905.
- [5] Hendricks-Munoz KD, Xu J, Voynow JA. Tracheal aspirate VEGF and sphingolipid metabolites in the preterm infant with later development of bronchopulmonary dysplasia[J]. Pediatr Pulmonol, 2018, 53(8): 1046-1052. DOI: 10. 1002/ppul. 24022.
- [6] Sharma A, Xin Y, Chen X, et al. Early prediction of moderate to severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants[J]. Pediatr Neonatol, 2020, 61(3): 290-299. DOI: 10. 1016/j. pedneo. 2019. 12. 001.
- [7] Gao S, Zhang X, Du W, et al. Systematic review and meta-analysis: the effect of bronchopulmonary dysplasia on neurodevelopment in very low birth weight premature infants[J]. Transl Pediatr, 2021, 10(11): 3023-3033. DOI: 10. 21037/tp-21-449.
- [8] Lal CV, Olave N, Travers C, et al. Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants[J]. JCI Insight, 2018, 3(5): e93994. DOI: 10. 1172/jci. insight. 93994.

- [9] Baker CD, Seedorf GJ, Wisniewski BL, et al. Endothelial colony-forming cell conditioned media promote angiogenesis in vitro and prevent pulmonary hypertension in experimental bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305 (1): L73-L81. DOI:10.1152/ajplung.00400.2012.
- [10] Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: MiRNA biology and therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(3): 266-277. DOI:10.2174/1568009617666170630142725.
- [11] Du K, Zhao C, Wang L, et al. MiR-191 inhibit angiogenesis after acute ischemic stroke targeting VEZF1 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9): 2762-2786. DOI:10.18632/aging.101948.
- [12] Hu Y, Rao SS, Wang ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 169-184. DOI:10.7150/thno.21234.
- [13] Wei S, Peng L, Yang J, et al. Exosomal transfer of miR-15b-3p enhances tumorigenesis and malignant transformation through the DYNLT1/Caspase-3/Caspase-9 signaling pathway in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39 (1): 32. DOI: 10.1186/s13046-019-1511-6.
- [14] Yang Y, Liu Y, Li Y, et al. MicroRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105 (11): 3404-3415. DOI: 10.1210/clinem/dgaa538.
- [15] Song S, Qiu X. LncRNA miR503HG inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by enhancing PDCD4 via regulation of miR-15b[J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(1): 107-116. DOI:10.1016/j.dld.2020.09.008.
- [16] Mahlman M, Huusko JM, Karjalainen MK, et al. Genes encoding vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) and risk for bronchopulmonary dysplasia[J]. *Neonatology*, 2015, 108(1): 53-59. DOI:10.1159/000381279.
- [17] Chan LS, Yue PY, Wong YY, et al. MicroRNA-15b contributes to ginsenoside-Rg1-induced angiogenesis through increased expression of VEGFR-2[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(3): 392-400. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.05.006.
- [18] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-1264. DOI:10.1016/j.cell.2019.01.021.
- [19] 王炜. 维生素 D 与早产儿肺部疾病关系研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2020, 19(9): 968-972. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.09.026.
- [20] 成小蓉, 姜军, 吴大珍, 等. 基于基因表达综合数据库和生物信息学分析筛选小鼠支气管肺发育不良相关的潜在关键基因[J]. *中国医药*, 2022, 17(9): 1352-1355. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2022.09.017.
- [21] 左丹丹, 孙文强, 朱雪萍. 早期预测支气管肺发育不良生物标志物的研究进展[J]. *中国医药*, 2022, 17(11): 1735-1738. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2022.11.031.
- [22] Laddha AP, Kulkarni YA. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. *Respir Med*, 2019, 156: 33-46. DOI:10.1016/j.rmed.2019.08.003.
- [23] Hirsch K, Taglauer E, Seedorf G, et al. Perinatal hypoxia-inducible factor stabilization preserves lung alveolar and vascular growth in experimental bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202 (8): 1146-1158. DOI: 10.1164/rccm.202003-0601OC.
- [24] Zhou XM, Sun R, Luo DH, et al. Upregulated TRIM29 promotes proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PTEN/AKT/mTOR signal pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13634-13650. DOI:10.18632/oncotarget.7215.
- [25] 朱良梅, 孔少云, 戴玉腾, 等. 早产儿支气管肺发育不良的危险因素分析[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(13): 1647-1651, 1656. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2022.13.015
- Zhu LM, Kong SY, Dai YT, et al. Risk factors of bronchopulmonary dysplasia in premature infants [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2022, 38(13): 1647-1651, 1656. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2022.13.015.

(收稿日期: 2022-12-14)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.015

论著·临床

系统性红斑狼疮患者外周血 Th17/Treg 细胞和尿单核细胞趋化蛋白-1 的检测及意义

郑雪娜, 杨华强, 李博君, 覃骏

基金项目: 湖北省教育厅科学研究重点计划(D20142104)

作者单位: 442000 湖北十堰, 湖北医药学院附属人民医院/十堰市人民医院血液科

通信作者: 覃骏, E-mail: qinjun9801@126.com

【摘要】目的 检测系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)/调节性 T 细胞(Treg 细胞)比率及尿液单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平及临床意义。**方法** 选取 2018 年 7 月—2020 年 9 月十堰市人民医院收治 SLE 患者 68 例,根据 SLE 患者有无肾脏受累分为非狼疮肾炎组 28 例(non-LN 组)和狼疮肾炎组 40 例(LN 组),同期医院健康体检者 35 例为健康对照组。收集受试者临床资料,采用流式细胞术检测外周血单个核细胞(PBMC)中 Th17 细胞和 Treg 细胞比率,采用 RT-PCR 技术检测 Th17 细胞和 Treg 细胞相应的转录因子维甲酸相关孤核受体(ROR- γ t)和叉头螺旋翼状转录因子 3(Foxp3) mRNA 表达量,采用 ELISA 法检测尿液 MCP-1 水平。采用 Spearman 相关分析 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 的关系及其与临床指标的相关性,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 效能。**结果** LN 组和 non-LN 组 Th17 细胞比例均高于健康对照组($F=12.345, P=0.015$),Treg 细胞比例比较, LN 组 < non-LN 组 < 健康对照组($F=22.388, P<0.001$), Th17/Treg 细胞比率比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组($F=26.674, P<0.001$); ROR- γ t mRNA 表达水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组($F=20.578, P<0.001$), LN 组和 non-LN 组 Foxp3 mRNA 表达水平均低于健康对照组($F=7.782, P=0.003$);尿液 MCP-1 水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组($F=51.231, P<0.001$)。Spearman 相关分析显示, SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 水平呈正相关($r=0.604, P=0.017$), SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分呈正相关($r=0.534, P=0.021$), 尿液 MCP-1 水平与 SLEDAI 评分和 24 h 尿蛋白定量呈正相关($r/P=0.342/<0.001, 0.412/0.023$)。ROC 曲线显示, Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 预测 SLE 患者合并 LN 的曲线下面积(AUC)为 0.718、0.769, 敏感度为 0.782、0.993, 特异度为 0.736、0.569。**结论** SLE 合并 LN 患者体内存在 Th17/Treg 细胞比例失衡及尿液 MCP-1 水平的增加,二者联合检测可作为判断 SLE 患者疾病活动的指标,有助于评估 LN 进展情况。

【关键词】 系统性红斑狼疮;狼疮肾炎;辅助性 T 细胞 17;调节性 T 细胞;单核细胞趋化蛋白-1**【中图分类号】** R593.24⁺1**【文献标识码】** A

Detection and significance of peripheral blood Th17/Treg cells and urinary monocyte chemoattractant protein-1 in patients with systemic lupus erythematosus Zheng Xuena, Yang Huaqiang, Li Bojun, Qin Jun. Department of Hematology, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Hubei Province, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Qin Jun, E-mail: qinjun9801@126.com

Funding program: Key Scientific Research Program in Department of Education, Hubei Provincial (D20142104)

【Abstract】Objective To investigate the ratio of peripheral blood helper T cells 17 (Th17 cells) to regulatory T cells (Treg cells) and the level of urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** A total of 68 patients with SLE admitted to Shiyan People's Hospital from July 2018 to September 2020 were selected and divided into a non lupus nephritis group of 28 patients (non-LN group) and a lupus nephritis group of 40 patients (LN group) based on whether or not the SLE patients had renal involvement. During the same period, 35 healthy physical examinees from the hospital were included in the healthy control group. Collect clinical data of subjects, use flow cytometry to detect the ratio of Th17 cells to Treg cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and use RT-PCR technology to detect the corresponding transcription factor retinoic acid related solitary nuclear receptor (ROR- γ t) of Th17 cells and Treg cells), and the expression of forked helical wing like transcription factor 3 (Foxp3) mRNA. Urine MCP-

1 levels were measured using ELISA. Spearman correlation was used to analyze the relationship between Th17/Treg cell ratio and urine MCP-1, as well as its correlation with clinical indicators. Subjects' performance characteristic curve (ROC) was used to analyze Th17/Treg cell ratio and urine MCP-1 levels in the diagnosis of LN in patients with SLE. **Results** The ratio of Th17 cells in LN group and non LN group was higher than that in healthy control group ($F=12.345, P=0.015$). The ratio of Treg cells in LN group < non-LN group < healthy control group ($F=22.388, P<0.001$), and the ratio of Th17/Treg cells in LN group > non-LN group > healthy control group ($F=26.674, P<0.001$); Comparison of ROR- γ t mRNA expression levels in LN group > non-LN group > healthy control group ($F=20.578, P<0.001$). The expression level of Foxp3 mRNA in LN group and non-LN group was lower than that in healthy control group ($F=7.782, P=0.003$); Comparison of urinary MCP-1 levels in LN group > non-LN group > healthy control group ($F=51.231, P<0.001$). Spearman correlation analysis showed that there was a positive correlation between the Th17/Treg cell ratio and the urine MCP-1 level in SLE patients ($r=0.604, P=0.017$), a positive correlation between the Th17/Treg cell ratio and the SLEDAI score in SLE patients ($r=0.534, P=0.021$), and a positive correlation between the urine MCP-1 level and the SLEDAI score and 24-hour urine protein content ($r/P=0.342/ <0.001, 0.412/0.023$). The ROC curve showed that the area under curve (AUC) of Th17/Treg cell ratio and urine MCP-1 in predicting LN in SLE patients was 0.718 and 0.769, with sensitivity of 0.782 and 0.993, and specificity of 0.736 and 0.569. **Conclusion** In patients with SLE and LN, there is an imbalance in the ratio of Th17/Treg cells and an increase in the level of MCP-1 in urine. The combined detection of the two can be used as an indicator of disease activity in SLE patients, and is helpful in assessing the progress of LN.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; Lupus nephritis; T help cell 17; T regulation cell; Monocyte chemotactic protein-1

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一个累及全身多系统、多脏器的结缔组织疾病。回顾性临床研究结果表明,狼疮肾炎 (lupus nephritis, LN) 是系统性红斑狼疮患者最常见的并发症,机体免疫系统紊乱、T 细胞亚群分布异常、B 淋巴细胞高度活化和细胞因子网络失衡是 LN 发生、发展的关键环节^[1]。辅助性 T 细胞 17 (T help cell 17, Th17) 主要分泌多种炎性细胞因子,介导机体炎性反应及自身免疫反应,维甲酸相关孤核受体 (retinoid-related orphan receptor- γ t, ROR- γ t) 是初始 T 细胞向 Th17 细胞分化非常关键的转录因子^[2]。调节性 T 细胞 (T regulation cell, Treg) 归属于 CD4⁺ 效应性 T 细胞亚群,胞内高特异性表达叉头翼状螺旋转录因子 P3 (forkhead box P3, Foxp3), Treg 细胞起到抑制过度免疫反应和维持免疫耐受的作用^[3]。Th17/Treg 细胞平衡对维持正常免疫应答、防止自身免疫性疾病具有重要意义^[4]。单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 主要生理学作用表现为对单核细胞的趋化和激活作用,可加速 LN 的发生及进展。现分析 LN 患者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平及其与 LN 疾病活动的关系,探讨其在 LN 中可能的病理生理学机制,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2018 年 7 月—2020 年 9 月十堰市人民医院血液内科与风湿科收治的 SLE 患者 68 例,未出现肾脏受累或经治疗后肾损害缓解 28 例作为

非狼疮肾炎组 (non-LN 组),患者合并 LN 40 例作为狼疮肾炎组 (LN 组);排除合并高血压、糖尿病、冠心病、慢性阻塞性肺疾病、肿瘤等基础疾病患者。另选取同期医院健康体检者 35 例为健康对照组,男 5 例,女 30 例,年龄 21 ~ 47 (31.2 ± 13.3) 岁,血常规、肝肾功能、心电图、胸部 X 线片、尿常规均正常;排除结缔组织疾病、高血压、糖尿病、冠心病、慢性肾炎、合并肿瘤和精神疾病者。本研究经医院伦理委员会批准 (20180916-07),受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准:参照 2019 年欧洲风湿病联盟/美国风湿病学会 (EULAR/ACR) 制定的 SLE 分类标准^[5]:①经肾活组织检查证实,按 2003 年国际肾脏病学会 (ISN) 和肾脏病理学会 (RPS) 制定的 LN 病理组织学标准判定^[6];②尿蛋白 ≥ 0.5 g/24 h 或尿残渣检测提示蛋白 (+ + +);③出现管型尿:红细胞、血红蛋白、颗粒或混合管型或镜下血尿。上述 3 条件满足其一,即可归类 LN 组。(2) 排除标准:可能危及生命的中、重度活动性狼疮;目前正在使用大剂量糖皮质激素或免疫抑制剂诱导缓解的 SLE 患者;慢性肾脏病 (CKD) 4 期以上的 LN 患者;合并其他原发性或继发性肾脏疾病者;严重心、肝、脑功能障碍;合并感染性疾病、内分泌疾病等基础疾病者;妊娠期及哺乳期女性;合并精神病患者;吸烟、酗酒及合并家族遗传病患者。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 SLEDAI 及实验室相关指标检查:记录纳入

SLE 患者病程,参照文献[5]计算 SLE 患者 SLE 疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI),主要评分症状及体征如下:抽搐、精神疾病、视觉障碍、颅神经损害、狼疮性头痛、脑血管意外、血管炎、关节炎、肌炎、狼疮皮疹、脱发、复发性口腔溃疡、胸腔积液、心包积液、发热、低补体血症、抗双链 DNA 抗体(ds-DNA)增高、血小板降低、管型尿、血尿、蛋白尿和脓尿。采集 SLE 患者清晨空腹静脉全血 3 ml,经血液细胞仪检测血常规;采用魏氏法测定红细胞沉降率(ESR);留取血清 5 ml,采用免疫荧光法检测抗 dsDNA 抗体浓度;采用免疫比浊法测定高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、24 h 尿蛋白定量及血清补体 C3、C4 浓度。

1.3.2 Th17 和 Treg 细胞检测:抽取研究对象清晨空腹肘静脉血 4 ml,枸橼酸钠抗凝,加入人淋巴细胞分离液,经 Ficoll 密度梯度离心法分离提取单个核细胞(PBMCs),以 PBS 冲洗及 10% 胎牛血清的 RPMI640 培养基重悬单个核细胞并稀释,调整细胞密度为 $(2 \sim 5) \times 10^6$ 个/ml。将每份 PBMCs 样本分成 2 管,分别用于检测 Th17 细胞和 Treg 细胞。Th17 测定管加入佛波醇乙酯 $2.5 \mu\text{g}/10^6$ 细胞和离子霉素 $2 \mu\text{l}$ (终浓度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$),置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 3 h。孵育完成后,用 PBS 洗涤 2 次,各加入 FITC 标记的 CD3 单克隆抗体、PE 标记的 CD4 单克隆抗体和 PE 标记的 Cy5-CD8 单克隆荧光抗体各 $5 \mu\text{l}$,以 $\text{CD}3^+ \text{CD}8^-$ T 细胞代表 $\text{CD}4^+$ T 细胞, 4°C 避光孵育 1 h。加入 PE 标记的 IL-17A 单克隆抗体,室温避光 1 h, PBS 洗涤 2 次后,加入固定液 $400 \mu\text{l}$,规定时间内上流式细胞仪(美国 BD 公司, Calibur 型)检测,以 $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+ \text{IL-17A}^+$ 表示为 Th17 细胞。Treg 细胞测定管避光加入 CD4 单克隆抗体(CD4-PerCP) $5 \mu\text{l}$, CD25 - 藻红蛋白 $5 \mu\text{l}$, CD127 - 多甲藻叶绿素蛋白 - Cy5 $5 \mu\text{l}$ 。避光孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次后加入固定液,规定时间内上流式细胞仪检测,采用 $\text{CD}4^+ \text{CD}25^+ \text{CD}127^{\text{low}}$ 细胞表示 Treg 细胞。FITC 标记的 CD3 单克隆抗体、PE 标记的 Cy5-CD8 单克隆荧光抗体、PE 标记的 IL-17A 单克隆抗体、CD4-PerCP、CD25 - 藻红蛋白和 CD127 - 多甲藻叶绿素蛋白 - Cy5 购自美国 eBioscience 公司;淋巴细胞分离液、佛波醇、离子霉素、细胞固定剂和打孔剂均由德国 Sigma 公司提供。新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。用 Flowjo 7.6 软件系统分析流式细胞学结果。

1.3.3 ROR- γT 和 Foxp3 mRNA 检测:采用 RT-PCR 法检测 ROR- γT 和 Foxp3 mRNA 在 PBMCs 中的表达量。以上述 Ficoll 密度梯度离心法分离提取 PBMCs,外周

血采用 Trizol 法提取 RNA 后,反转录合成 cDNA,用 SYBR 染色法在 ABI 7900HT system 上进行 PCR 反应。淋巴细胞分离液、cDNA 反转录试剂盒、SYBR 染色试剂盒均由德国 Sigma 公司提供。相关基因引物由 Primer Premier 5.0 程序设计,内参为 β 肌动蛋白(β -actin),引物合成由上海生物工程技术服务有限公司完成,见表 1。Foxp3 和 ROR- γT mRNA 结果以与内参对照的 CT 校正值表示。

表 1 ROR- γT 、Foxp3 和内参基因引物序列
Tab. 1 ROR- γT , Foxp3, and internal reference gene primer sequences

基因	引物序列
ROR- γT	上游引物:5'-CCGAGATGCTGTCAAGTTC-3' 下游引物:5'-TTCTCTGTTGCTGCTGTTGTC-3'
Foxp3	上游引物:5'-TTCGAAGAGCCAGAGGACTT-3' 下游引物:5'-ATGGCACTCAGCTTCTCCTT-3'
β -actin	上游引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 下游引物:5'-TACCACCCTGTTGCTGTA-3'

注:ROR- γT . 维甲酸相关孤儿核受体;Foxp3. 叉头翼状螺旋转录因子 P3; β -actin. β -肌动蛋白。

1.3.4 尿液 MCP-1 浓度检测:分别取 SLE 患者及健康对照者清晨清洁中段尿 5 ml,离心提取上清液,采用 ELISA 双抗夹心法测定上清液 MCP-1 浓度,酶标仪由 Benchmark 公司生产,型号 HM-560,试剂盒由浙江夸克生物技术有限公司提供,操作按试剂盒说明书步骤进行。

1.4 统计学方法 利用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和单因素方差分析;计量指标间的相关性研究采用 Spearman 相关性分析;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 的效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组 SLE 患者临床资料比较 2 组 SLE 患者性别、年龄、病程、抗 dsDNA 浓度、补体 C3、补体 C4 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);LN 组 SLEDAI 评分、尿蛋白定量(24 h)、ESR、hs-CRP 水平均高于 non-LN 组,而白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)均低于 non-LN 组($P < 0.05$),见表 2。

2.2 各组外周血 Th17 细胞、Treg 细胞及 Th17/Treg 细胞比率比较 LN 组和 non-LN 组患者外周血 Th17 细胞比例高于健康对照组($P < 0.05$),而 LN 组与 non-LN 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);Treg 细胞

表 2 LN 组与 non-LN 组临床资料比较

Tab. 2 Comparison of Clinical Data between LN Group and Non LN Group

项 目	non-LN 组 (n=28)	LN 组 (n=40)	χ^2/t 值	P 值
性别(男/女,例)	2/26	5/35	0.096	0.755
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	32.1 $\pm$ 10.4	30.2 $\pm$ 14.5	1.45	0.435
病程($\bar{x} \pm s$)	5.9 $\pm$ 3.1	6.4 $\pm$ 3.1	1.09	0.312
SLEDAI 评分($\bar{x} \pm s$,分)	7.4 $\pm$ 3.1	11.3 $\pm$ 5.6	2.13	0.011
尿蛋白定量($\bar{x} \pm s$,g/24h)	0.34 $\pm$ 0.14	2.32 $\pm$ 1.12	2.84	0.001
抗 ds-DNA($\bar{x} \pm s$,IU/ml)	199.4 $\pm$ 77.8	243.5 $\pm$ 74.3	1.12	0.233
补体 C3($\bar{x} \pm s$,g/L)	0.72 $\pm$ 0.29	0.63 $\pm$ 0.33	1.31	0.405
补体 C4($\bar{x} \pm s$,g/L)	0.52 $\pm$ 0.21	0.42 $\pm$ 0.17	1.14	0.221
WBC($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9$ /L)	4.42 $\pm$ 0.69	3.12 $\pm$ 0.39	2.28	0.031
PLT($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9$ /L)	123.2 $\pm$ 72.6	89.2 $\pm$ 22.5	2.54	0.043
ESR($\bar{x} \pm s$,mm/h)	19.3 $\pm$ 8.7	32.2 $\pm$ 11.3	3.34	0.001
hs-CRP($\bar{x} \pm s$,mg/L)	13.2 $\pm$ 5.3	22.4 $\pm$ 6.8	3.93	0.001

比例比较, LN 组 < non-LN 组 < 健康对照组 ($P < 0.01$); Th17/Treg 细胞比率比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.3 各组 ROR- γ t 和 Foxp3 mRNA 在 PBMCs 中的表达比较 ROR- γ t mRNA 表达水平比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组 ($P < 0.01$); LN 组和 non-LN 组患者 Foxp3 mRNA 表达水平低于健康对照组 ($P < 0.01$), LN 组与 non-LN 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

2.4 各组尿液 MCP-1 浓度比较 LN 组患者尿液 MCP-1 浓度为 (367.7 $\pm$ 76.8) pg/ μ mol, non-LN 组为 (217.6 $\pm$ 89.9) pg/ μ mol, 健康对照组为 (102.6 $\pm$ 43.5) pg/ μ mol。尿液 MCP-1 浓度比较, LN 组 > non-LN 组 > 健康对照组, 差异均有统计学意义 ($F = 51.231, P < 0.001$)。

2.5 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 的关系及其与临床指标的相关性分析 Spearman 相关性分析表明, SLE 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿液 MCP-1 水平呈正相关 ($r = 0.604, P = 0.017$); 尿液 MCP-1 与 Foxp3、ROR- γ t mRNA 表达量无相关性 ($P > 0.05$)。SLE 患者外周血 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分

呈正相关 ($P < 0.05$); 尿液 MCP-1 浓度与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量均呈正相关 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 外周血 Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 浓度与临床指标的相关性

Tab. 4 Correlation between peripheral blood Th17/Treg cell ratio, urine MCP-1 concentration, and clinical indicators

项 目	Th17/Treg 细胞比率		尿液 MCP-1 浓度	
	r 值	P 值	r 值	P 值
SLEDAI 评分	0.534	0.021	0.342	0.001
WBC	0.045	0.235	0.056	0.065
PLT	0.004	0.332	0.061	0.443
24 h 尿蛋白定量	0.081	0.421	0.412	0.023
抗 ds-DNA	0.027	0.313	0.024	0.096
ESR	0.032	0.596	0.033	0.102
hs-CRP	0.002	0.120	0.042	0.233
补体 C3	0.020	0.072	-0.012	0.412
补体 C4	0.017	0.063	-0.023	0.238

2.6 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 合并 LN 活动的效能 ROC 曲线分析结果显示, Th17/Treg 细胞比率、尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 患者合并 LN 的曲线下面积 (AUC) 为 0.718、0.769, 见表 5、图 1。

表 5 外周血 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平预测 LN 疾病活动的效能比较

Tab. 5 Comparison of Effectiveness of Peripheral Blood Th17/Treg Cell Ratio and Urine MCP-1 Levels in Predicting LN Disease Activity

变 量	Cut-off 值	AUC	敏感度	特异度	Youden 指数
Th17/Treg 细胞比率	0.643	0.718	0.782	0.736	0.518
尿液 MCP-1 浓度	401.19 pg/ μ mol	0.769	0.993	0.569	0.562

3 讨 论

效应性 T 细胞的活化及 B 淋巴细胞功能亢进与 SLE 的发生关系最为密切, T 淋巴细胞功能的稳定在 SLE 自身免疫调节中发挥关键作用, 并贯穿整个发病过程^[6]。既往将 CD4⁺ T 淋巴细胞主要划分成 Th1 细

表 3 3 组外周血 Th17、Treg 细胞、Th17/Treg 细胞比例及 ROR- γ t、Foxp3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Ratio of Th17, Treg Cells, Th17/Treg Cells, and ROR in Peripheral Blood of Group 3- γ Comparison of t, Foxp3 mRNA Expression

组 别	例数	Th17 细胞 (%)	Treg 细胞 (%)	Th17/Treg 细胞比率	ROR- γ t mRNA	Foxp3 mRNA
健康对照组	40	1.23 $\pm$ 0.35	5.44 $\pm$ 1.72	0.33 $\pm$ 0.14	4.34 $\pm$ 1.67	3.85 $\pm$ 1.62
non-LN 组	28	3.13 $\pm$ 0.83 ^a	4.62 $\pm$ 0.89 ^a	0.59 $\pm$ 0.26 ^a	8.42 $\pm$ 3.89 ^a	2.66 $\pm$ 1.28 ^a
LN 亚组	40	3.82 $\pm$ 1.29 ^a	3.42 $\pm$ 0.75 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.41 ^{ab}	12.23 $\pm$ 4.84 ^{ab}	2.35 $\pm$ 0.84 ^a
F 值		12.345	22.388	26.674	20.578	7.782
P 值		0.015	<0.001	<0.001	<0.001	0.003

注:与健康对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 non-LN 组比较, ^b $P < 0.05$ 。ROR- γ t. 维甲酸相关核受体;Foxp3. 叉头翼状螺旋转录因子 P3。

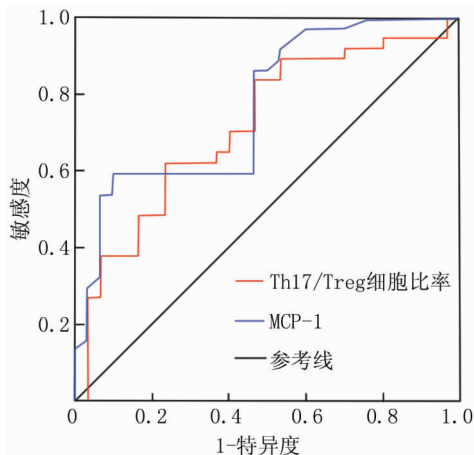


图1 Th17/Treg 细胞比率及尿液 MCP-1 水平诊断 SLE 合并 LN 活动 ROC 曲线

Fig.1 Th17/Treg cell ratio and urine MCP-1 level diagnosis SLE combined with LN activity ROC curve

胞和 Th2 细胞 2 个亚群,各分泌其特定的细胞因子,组成免疫细胞及细胞因子网络,通过多种不同生物学途径,发挥免疫学效应,Th1/Th2 比例及功能失衡在 SLE 发病机制中的作用已获得充分认可^[7]。Th17 细胞和 Treg 细胞是近年来发现的两类不同于传统 Th1 细胞和 Th2 细胞的 CD4⁺T 细胞亚群,二者与自身免疫病的关系是近年的研究热点。

Th17 细胞在核转录因子 ROR- γ t 的调控下,特异地自分泌 IL-17,后者作为一种强效的前炎性细胞因子,可促进单核巨噬细胞、内皮细胞和间质细胞的募集、增殖与分化,并分泌 IL-6、IL-8 等多种炎性因子或趋化蛋白,使炎性反应级联效应放大,造成组织、器官免疫损伤,进而参与多种自身免疫性疾病的发生、发展。Treg 细胞亚群胞内特异性表达内源性转录因子 Foxp3,其细胞抑制表型和调节功能的发挥与 Foxp3 表达水平密切相关,Treg 细胞可控制前炎性 CD4⁺T 细胞的稳态增殖,增加 TGF- β 、IL-4 和 IL-10 等具有抑炎作用细胞因子的分泌,对自身反应 T 细胞活化和增殖起负调控作用,故认为 Treg 细胞稳态的改变参与 SLE 的发病^[8]。本结果表明,SLE 患者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞的变化特点与国内外报道基本一致^[9-10]。提示 SLE 患者 Treg 细胞免疫耐受功能减低,其抑制反应能力减弱,伴随 Th17 细胞数目增加及其炎性反应效应的增强。Schaier 等^[11]研究表明,与健康对照组和非活动性 SLE 患者比较,处于病情活动期的 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的免疫抑制功能明显下降,且 Foxp3 mRNA 表达水平降低,后续体外研究表明,伴

随 Foxp3 mRNA 表达水平的下降,Treg 细胞对 CD4⁺效应 T 细胞的增殖和分泌功能的抑制效应明显减弱。本研究中 SLE 患者外周血 ROR- γ t mRNA 表达量明显升高,伴随 Foxp3 mRNA 表达水平的降低,提示二者分别作为 Th17 细胞与 Treg 细胞分化必不可少的转录因子,其表达量的变化可能是 SLE 发病过程中炎性反应启动和发展的重要促进因素。进一步行相关性分析发现,SLE 患者外周血 Th17/Treg 细胞比率与 SLEDAI 评分呈正相关,提示检测患者 Th17 细胞及 Treg 细胞比例,可能对判定 SLE 病情活动具有提示意义。

LN 是 SLE 严重的并发症之一,肾脏病理学特点主要表现为免疫复合物沉积和炎性细胞浸润,回顾性临床研究提示^[12-14],几乎所有的 SLE 患者在病程不同阶段均表现出不同程度的肾脏损害。本研究总体结果显示,LN 患者 Treg 细胞比例的下降及 Th17/Treg 细胞比例的失衡程度较未合并肾损害的 SLE 患者更加明显。Wu 等^[15]研究证实,Treg 细胞能有效抑制 BWFI 狼疮模型小鼠 B 细胞功能的活动,同时可减少抗 ds-DNA 抗体的产生,继而延缓狼疮性肾炎的发病。结合本研究结果推测,LN 患者体内 Treg 细胞比例的下降,可能诱导 PBMC 中 ROR- γ t 调控功能增强,增加 Th17 细胞炎性反应效应及其对下游炎性细胞因子网络的调控作用。本研究中 LN 患者 Treg 细胞比例同 Foxp3 mRNA 表达水平,以及 Th17 细胞比例同 ROR- γ t mRNA 表达水平并未表现出完全一致的变化,提示 Th17/Treg 细胞及其细胞因子网络在 LN 中作用的复杂性,本研究纳入病例数有限,且作为横断面研究,可能难以完全反映 Th17/Treg 细胞在 LN 发病机制中的作用。

MCP-1 是趋化因子 CC 亚家族的一员,主要由单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞分泌。基础研究表明,MCP-1 可诱导黏附分子过度表达,使多种炎性细胞尤其是单核细胞、巨噬细胞在 LN 病变部位聚集,在 LN 肾脏炎性反应中发挥始动作用^[16-17]。临床研究提示,SLE 患者血清 MCP-1 水平较正常对照人群显著增加,且与疾病活动度密切相关^[18]。本研究结果表明,SLE 患者 MCP-1 水平较健康对照组明显增高,且在合并 LN 患者中增高更加明显,相关性分析提示 SLE 患者尿液 MCP-1 浓度与 SLEDAI 评分和 24 h 尿蛋白定量均呈正相关,提示其在 SLE 尤其是 LN 发病机制中的潜在促进作用。国内有研究发现,儿童 SLE 患者血清 MCP-1 表达水平不仅与总 SLEDAI 评分密切相关,可反映 SLE 患者的疾病活动状况,还能作为狼疮患儿早期肾损伤有效的预测指标^[19]。本研究 ROC 曲线分析结果显示,Th17/Treg 细胞比率诊断 SLE 患者合并 LN

活动的 AUC 为 0.718, 尿液 MCP-1 水平对 SLE 合并 LN 活动诊断的 AUC 为 0.769, 二者均展现出较好的诊断价值, 提示 Th17/Treg 细胞比率和尿液 MCP-1 浓度监测, 可能作为 SLE 患者除 24 h 尿蛋白定量检测外便捷、有效的肾脏损害评估方式。此外, 本项研究表明, LN 患者 Th17/Treg 细胞比率与尿 MCP-1 呈正相关, 推测 SLE 患者体内 Th17/Treg 细胞比例失衡, 可能引起包括 MCP-1 在内的下游炎性细胞因子网络紊乱, 导致 LN 肾脏损害加重, 尚需更多的基础与临床研究证实。

总之, SLE 的发生是一个原因复杂、多因素共同参与的结果, 本研究提示 Th17/Treg 细胞比例失衡和尿液 MCP-1 水平的增加均可能参与 SLE 的发病, 并且与疾病整体活动度及 LN 的发生、发展关系密切, 患者尿液 MCP-1, 体内 Th17 细胞、Treg 细胞比例的测定有可能作为 SLE 病情监测的重要指标。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

郑雪娜:设计研究方案, 实施研究过程; 杨华强:资料搜集整理; 李博君:统计学分析; 章骏:提出研究思路

参考文献

- [1] Hsieh SC, Tsai CY, Yu CL. Potential serum and urine biomarkers in patients with lupus nephritis and the unsolved problems [J]. *Open Access Rheumatol*, 2016, 19 (8): 81-91. DOI: 10. 2147/OARRR.S112829.
- [2] Osborne LM, Brar A, Klein SL. The role of Th17 cells in the pathophysiology of pregnancy and perinatal mood and anxiety disorders [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76 (1): 7-16. DOI: 10. 1016/j. bbi. 2018. 11. 015.
- [3] Sharabi A, Tsokos GC. T cell metabolism: New insights in systemic lupus erythematosus pathogenesis and therapy [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16 (2): 100-112. DOI: 10. 1038/s41584-019-0356-x.
- [4] Zhang W, Liu X, Zhu Y, et al. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51 (9): 2137-2150. DOI: 10. 1002/eji. 202048794.
- [5] Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management [J]. *J Autoimmun*, 2019, 96: 1-13. DOI: 10. 1016/j. jaut. 2018. 11. 001.
- [6] Yang F, Lin J, Chen W. Post-translational modifications in T cells in systemic erythematosus lupus [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2021, 60 (6): 2502-2516. DOI: 10. 1093/rheumatology/keab095.
- [7] Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity [J]. *Cytokine*, 2015, 72 (2): 146-153. DOI: 10. 1016/j. cyto. 2014. 12. 027.
- [8] Tower C, Crocker I, Chirico D, et al. SLE and pregnancy: the potential role for regulatory T cells [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7 (2): 124-128. DOI: 10. 1038/nrrheum. 2010. 124.
- [9] Yazdani MR, Aflaki E, Gholijani N. Inflammatory and T helper 17/regulatory T cells related cytokines balance in cutaneous lupus ery-

- thematosus (CLE) [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2020, 19 (1): 9-17. DOI: 10. 18502/ijaa. v19i1. 2411.
- [10] 宋广浩, 沈瀚, 宁明哲. IL-35 Th17/Treg 失衡在系统性红斑狼疮中的表达与意义 [J]. *安徽医学*, 2020, 41 (12): 1440-1443. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-0399. 2020. 12. 018.
- [11] Schaier M, Gottschalk C, Kalble F, et al. The onset of active disease in systemic lupus erythematosus patients is characterised by excessive regulatory CD4⁺-T-cell differentiation [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39 (2): 279-288. DOI: 10. 55563/clinexp Rheumatol/cg29xj.
- [12] 李浙萌. 细胞因子在系统性红斑狼疮中的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2020, 19 (11): 1174-1178. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 11. 023.
- Li ZM. Research progress of cytokines in systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2020, 19 (11): 1174-1178. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 11. 023.
- [13] 李晓英, 杨丹丹, 黄辉, 等. 双重血浆置换治疗重症狼疮性肾炎合并急性肾损伤的效果及安全性研究 [J]. *疑难病杂志*, 2023, 22 (1): 67-72. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 01. 012.
- Li XY, Yang DD, Huang H, et al. The efficacy and safety of double plasma exchange in the treatment of severe lupus nephritis with acute renal injury [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2023, 22 (1): 67-72. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 01. 012.
- [14] Morell M, Pérez-Cózar F, Marañón C. Immune-related urine biomarkers for the diagnosis of lupus nephritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (13): 7143. DOI: 10. 3390/ijms22137143.
- [15] Wu D, Dong D, Bi X, et al. Cucurbitacin II b improved active chromatin-induced systemic lupus erythematosus via balancing the percentage of Th17 and Treg cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021, 48 (3): 329-336. DOI: 10. 1111/1440-1681. 13434.
- [16] 张绍君, 李俊巧, 张永刚, 等. 系统性红斑狼疮患者血清 PS-PLA1、CCL19 水平与疾病活动度及免疫功能的相关性分析 [J]. *疑难病杂志*, 2020, 19 (11): 1143-1146, 1156. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 11. 014.
- Zhang SJ, Li JQ, Zhang YG, et al. Correlation analysis of serum PS-PLA1 and CCL19 levels with disease activity and immune function in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2020, 19 (11): 1143-1146, 1156. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 11. 014.
- [17] Urrego-Callejas T, Alvarez SS, Arias LF, et al. Urinary levels of ceruloplasmin and monocyte chemoattractant protein-1 correlate with extra-capillary proliferation and chronic damage in patients with lupus nephritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40 (5): 1853-1859. DOI: 10. 1007/s10067-020-05454-0.
- [18] Moloi MW, Rusch JA, Omar F, et al. Urinary MCP-1 and TWEAK as non-invasive markers of disease activity and treatment response in patients with lupus nephritis in South Africa [J]. *Int Urol Nephrol*, 2021, 53 (9): 1865-1873. DOI: 10. 1007/s11255-020-02780-9.
- [19] 王文芳, 庞春玉, 王绪松, 等. 系统性红斑狼疮患儿血清 IL-18、IL-23 及 MCP-1 水平变化及其临床意义 [J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42 (1): 108-111. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2021. 01. 025.

(收稿日期: 2022-11-13)

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.016

论著·临床

机器人辅助 MIS-TLIF 对腰椎管狭窄症患者肌电图、红细胞免疫的影响

李光富, 彭丰, 吴美平, 杨威, 彭博

作者单位: 445099 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院中医部骨伤科

通信作者: 李光富, E-mail: liguangfu9630@163.com

【摘要】目的 观察机器人辅助微创通道下经椎间孔腰椎椎间融合术(MIS-TLIF)对腰椎管狭窄症患者肌电图、红细胞免疫的影响。**方法** 选取2019年10月—2021年8月恩施土家族苗族自治州中心医院中医部骨伤科收治腰椎管狭窄症患者142例,按随机数字表法分为MIS-TLIF组和机器人组,各71例。MIS-TLIF组行MIS-TLIF,机器人组行机器人辅助MIS-TLIF。统计2组围术期指标、椎间融合率、融合时间、并发症及手术前后红细胞免疫[协同肿瘤红细胞花环率(ATER)、红细胞C3b受体(RBC-C3Br)]、左右侧肌电图[平均功率频率(MPF)、积分肌电值(EMG)]、腰椎功能[日本骨科协会腰椎评价量表(JOA)、椎间隙高度、局部Cobb角]。**结果** 机器人组术中出血量少于MIS-TLIF组,椎弓根螺钉置钉准确率优于MIS-TLIF组 [$t(U)/P=15.884/<0.001, 2.563/0.010$];术后1d机器人组ATER、RBC-C3Br水平高于MIS-TLIF组 ($t/P=4.107/<0.001, 5.965/<0.001$);术后6个月2组左侧、右侧MPF、EMG及JOA评分、椎间隙高度均高于术前,局部Cobb角小于术前 ($P<0.01$),但2组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);2组术后6个月椎体间融合率及融合时间比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);机器人组并发症总发生率低于MIS-TLIF组 ($\chi^2/P=4.351/0.037$)。**结论** 机器人辅助MIS-TLIF有助于减轻腰椎管狭窄症患者红细胞免疫抑制,提高椎弓根螺钉置钉准确率,降低并发症发生率,改善肌电图。

【关键词】 腰椎管狭窄症;微创通道;椎间孔腰椎椎间融合术;机器人;红细胞免疫;肌电图**【中图分类号】** R681.5⁺3**【文献标识码】** A

Effect of robot-assisted MIS-TLIF on electromyography and erythrocyte immunity in patients with lumbar spinal stenosis Li Guangfu, Peng Feng, Wu Meiping, Yang Wei, Peng Bo. Department of Orthopedics and Traumatology, Enshi Autonomous Prefecture Central Hospital, Hubei Province, Enshi 445099, China

Corresponding author: Li Guangfu, E-mail: liguangfu9630@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of robotic assisted minimally invasive lumbar interbody fusion (MIS-TLIF) on electromyography and erythrocyte immunity in patients with lumbar spinal stenosis. **Methods** From October 2019 to August 2021, 142 patients with lumbar spinal stenosis were selected from the Department of Orthopedics and Traumatology of the Department of Traditional Chinese Medicine of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital. They were divided into MIS-TLIF group and robot group according to random number table, with 71 patients in each group. MIS-TLIF group line MIS-TLIF, robot group line robot assisted MIS-TLIF. Perioperative indexes, interbody fusion rate, fusion time, complications, and erythrocyte immunity before and after surgery [synergetic tumor erythrocyte rosette rate (ATER), erythrocyte C3b receptor (RBC-C3Br)], left and right electromyography [mean power frequency (MPF), integral electromyography (EMG)], lumbar function [Japan Orthopedic Association Lumbar Evaluation Scale (JOA), intervertebral space height, and local Cobb angle] were counted. **Results** The intraoperative blood loss in the robot group was less than that in the MIS-TLIF group, and the accuracy of pedicle screw placement was better than that in the MIS-TLIF group [$t(U)/P=15.884/<0.001, 2.563/0.010$]. The level of ATER and RBC-C3Br in the robot group was higher than that in the MIS-TLIF group ($t/P=4.107/<0.001, 5.965/<0.001$) 1 day after operation. At 6 months after operation, the left and right MPF, EMG and JOA scores and intervertebral space height of the two groups were higher than those before operation, and the local Cobb angle was lower than that before operation ($P<0.01$), but there was no statistically significant difference between the two groups ($P>0.05$). There was no significant difference in the rate and time of interbody fusion between the two groups ($P>0.05$). The total incidence of complications in the robot group was lower than that in the MIS-TLIF group

($\chi^2/P=4.351/0.037$).**Conclusion** Robot-assisted MIS-TLIF can help alleviate the erythrocyte immunosuppression in patients with lumbar spinal stenosis, improve the accuracy of pedicle screw placement, reduce the incidence of complications, and improve EMG.

【Key words】 Lumbar spinal stenosis; Minimally invasive access; Foraminal lumbar interbody fusion; Robotics; Erythrocyte immunization; Electromyography

腰椎管狭窄症好发于中老年人,据统计,其在 50 岁以上人群中发病率为 1.7%~8.0%,女性略高于男性^[1-2]。开放手术存在创伤大、并发症多、术后恢复慢等弊端,近年微创术式凭借微创、出血少、恢复快等优势逐渐应用于腰椎管狭窄症,特别是微创通道下经椎间孔腰椎椎间融合术(MIS-TLIF),其有效性及可行性得到诸多研究者证实^[3-4]。但有研究指出,MIS-TLIF 术中视野局限,通道下置钉相对困难,一定程度上增加手术创伤^[5]。脊柱机器人具有学习曲线短、置钉精准性高、射线暴露时间短等优点,现已逐渐应用于脊柱外科领域,但鲜见机器人辅助 MIS-TLIF 在腰椎管狭窄症中应用。本研究试图从红细胞免疫、肌电图等方面分析 2 种微创术式治疗腰椎管狭窄症的效果,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2019 年 10 月—2021 年 8 月恩施土家族苗族自治州中心医院中医部骨伤科收治腰椎管狭窄症患者 142 例,按随机数字表法分为 MIS-TLIF 组及机器人组,每组 71 例。2 组临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经医院医学伦理委员会审核批准(2019WY19),患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

表 1 MIS-TLIF 组及机器人组腰椎管狭窄症患者临床资料比较
Tab.1 Comparison of clinical data of patients with lumbar spinal stenosis in MIS-TLIF group and robot group

项 目	MIS-TLIF 组 (n=71)	机器人组 (n=71)	t/χ^2 值	P 值
性别[例(%)]	男 33(46.48)	30(42.25)	0.257	0.612
	女 38(53.52)	41(57.75)		
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	62.03 $\pm$ 4.02	60.81 $\pm$ 5.33	1.540	0.126
病程($\bar{x}\pm s$,年)	4.94 $\pm$ 0.75	5.11 $\pm$ 0.58	1.511	0.133
体质量指数($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	21.53 $\pm$ 0.82	21.76 $\pm$ 0.68	1.820	0.071
病变节段[例(%)]			0.326	0.850
L ₃ /L ₄	10(14.08)	12(16.90)		
L ₄ /L ₅	38(53.52)	35(49.30)		
L ₅ /S ₁	23(32.40)	24(33.80)		
临床表现[例(%)]				
腰腿疼痛	64(90.14)	60(84.51)	1.018	0.313
腰腿酸麻木	33(46.48)	38(53.52)	0.704	0.401
间歇性跛行	12(16.90)	15(21.13)	0.412	0.521
高血压[例(%)]	15(21.13)	18(25.35)	0.355	0.551
冠心病[例(%)]	12(16.90)	10(14.08)	0.215	0.643
糖尿病[例(%)]	20(28.17)	16(22.54)	0.595	0.440

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:参照《外科学》诊断标准^[6],结合 CT、MR 等影像学检查证实;均为单节段病变;经保守治疗 6 个月后症状无改善。(2)排除标准:重度骨质疏松症;腰部手术史;其他腰椎疾病(腰椎不稳、胸腰椎肿瘤、强直性脊柱炎);全身状况无法耐受手术;凝血功能异常;肝肾功能异常。

1.3 手术方法 机器人组行机器人辅助 MIS-TLIF,气管插管全麻,患者俯卧位,在手术节段头侧间隔一节椎体棘突表皮做一纵向切口,将 Mazor 机器人示踪器固定至棘突上,行 3D 图像扫描,传输至 Mazor 机器人主控台,确定椎弓根螺钉入点、方向、直径、长度,机器人机械臂引导下,自病变节段棘突双侧切小口,置入导针 4 枚,顺攻丝向对侧经皮椎弓根内拧入 2 枚螺钉,在术侧 2 枚导针尖作一切口,约 3 cm,逐级插入套管,若遇骨性组织,环钻扩孔,开放工作通道,置入椎间孔镜,超声骨刀切除部分椎板、关节突及增生黄韧带,注意保护椎管及神经根,处理症状侧椎间隙,刮除对侧椎间盘,置入自体骨颗粒、椎间融合器,安装连接棒,拧紧螺钉尾帽,反复冲洗切口,缝合切口。MIS-TLIF 组行 MIS-TLIF,除机器人相关操作外,其余操作均同机器人组。2 组均未放置引流管,术后 48 h 患者在支具保护下活动,术后 3 个月去除支具,期间避免腰部过伸及过屈运动。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 围术期指标:包括术中出血量、手术时间、住院时间、总置钉数、置钉准确率等,置钉准确率分为Ⅰ级(椎弓根螺钉未突破椎弓根皮质)、Ⅱ级(椎弓根螺钉突破椎弓根皮质,且 ≤ 2 mm)、Ⅲ级(椎弓根突破椎弓根皮质,且 > 2 mm)^[7]。

1.4.2 红细胞免疫检测:分别于术前及术后 1 d、5 d,采集患者空腹外周静脉血 3 ml,制备红细胞悬液,应用酵母花环法检测协同肿瘤红细胞花环率(ATER)、红细胞 C3b 受体(RBC-C3Br),试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司。

1.4.3 肌电图及腰椎功能检测:分别于术前、术后 6 个月,应用美国 Noraxon 公司 Tele Myo 2400 T 型表面肌电图仪检测左、右侧腰背伸肌群表面肌电信号,包括平均功率频率(MPF)、积分肌电值(EMG);采用日本

骨科协会腰痛评价量表(JOA)从主观症状、客观体征、日常活动限制情况、排尿功能等 4 个维度评价,总分 29 分,分值越高腰椎功能越好。应用上海医疗器械厂有限公司 AXGQ620 型 X 线摄影机测量局部 Cobb 角、椎间隙高度。

1.4.4 椎间融合率及融合时间:术后 6 个月由同一医生根据 CT 图像评价椎间融合情况,参照 BRIDWELL 法^[8]评价椎间融合率,分为 I 级(骨块融合重塑完全,骨小梁存在)、II 级(骨块完整,骨块重塑不完全,无透光区)、III 级(骨块完整,上方或下方出现透光区)、IV 级(骨块塌陷、吸收)。自术后至椎间融合恢复到 I 级的时间为融合时间。

1.4.5 并发症情况:记录患者并发症发生情况,包括迟发感染、切口延迟愈合、硬脊膜撕裂等。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件处理数据。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;计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组围术期指标比较 机器人组术中出血量少于 MIS-TLIF 组,椎弓根螺钉置钉准确率优于 MIS-TLIF 组($P < 0.05$)。2 组总置钉数均为 284 枚。2 组手术时间、住院时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 2 组手术前后红细胞免疫比较 术前、术后 5 d 2 组红细胞免疫指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 1 d 机器人组 ATER、RBC-C3Br 水平高于 MIS-TLIF 组($P < 0.01$),见表 3。

2.3 2 组手术前后肌电图比较 术后 6 个月 2 组左侧、右侧 MPF、EMG 均高于术前($P < 0.01$),术前、术后 6 个月 2 组间左侧、右侧 MPF、EMG 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 2 MIS-TLIF 组与机器人组腰椎管狭窄症患者围术期指标比较

Tab. 2 Comparison of perioperative indexes of patients with lumbar spinal stenosis in MIS-TLIF group and robot group

组 别	例数	术中出血量 ($\bar{x} \pm s$, ml)	手术时间 ($\bar{x} \pm s$, min)	住院时间 ($\bar{x} \pm s$, d)	置钉准确率[例(%)]		
					I 级	II 级	III 级
MIS-TLIF 组	71	191.33 $\pm$ 18.22	135.02 $\pm$ 10.34	9.02 $\pm$ 1.24	242(85.21)	31(10.92)	11(3.87)
机器人组	71	149.91 $\pm$ 12.28	133.75 $\pm$ 11.96	8.95 $\pm$ 1.33	277(97.54)	7(2.46)	0
t/U 值		15.884	0.677	0.324		2.563	
P 值		<0.001	0.500	0.746		0.010	

表 3 MIS-TLIF 组与机器人组腰椎管狭窄症患者手术前后红细胞免疫比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab. 3 Comparison of red blood cell immunity before and after surgery between MIS-TLIF group and robot group

组 别	例数	ATER			RBC-C3Br		
		术前	术后 1 d	术后 5 d	术前	术后 1 d	术后 5 d
MIS-TLIF 组	71	63.08 $\pm$ 4.72	43.12 $\pm$ 5.03	62.24 $\pm$ 5.78	16.95 $\pm$ 4.42	11.18 $\pm$ 3.71	17.02 $\pm$ 5.34
机器人组	71	62.24 $\pm$ 5.51	46.66 $\pm$ 5.24	61.89 $\pm$ 6.12	18.18 $\pm$ 3.34	14.42 $\pm$ 2.68	17.98 $\pm$ 4.62
t 值		0.976	4.107	0.350	1.871	5.965	1.146
P 值		0.331	<0.001	0.727	0.636	0.001	0.254

注:ATER. 协同肿瘤红细胞花环率;RBC-C3Br. 红细胞 C3b 受体。

表 4 MIS-TLIF 组与机器人组腰椎管狭窄症患者肌电图比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of EMG of patients with lumbar spinal stenosis between MIS-TLIF group and robot group

组 别	时间	MPF(Hz)		EMG($\mu V \times s$)	
		左侧	右侧	左侧	右侧
MIS-TLIF 组 ($n = 71$)	术前	38.76 $\pm$ 6.12	36.22 $\pm$ 3.87	101.89 $\pm$ 16.79	95.12 $\pm$ 8.02
	术后 6 个月	44.95 $\pm$ 7.42	44.89 $\pm$ 5.56	128.88 $\pm$ 18.13	120.95 $\pm$ 14.74
机器人组 ($n = 71$)	术前	39.44 $\pm$ 5.51	35.31 $\pm$ 4.42	103.34 $\pm$ 14.56	94.58 $\pm$ 8.81
	术后 6 个月	46.16 $\pm$ 5.48	45.52 $\pm$ 4.72	131.65 $\pm$ 16.68	122.28 $\pm$ 12.26
$t/PMIS$ -TLIF 组内值		5.423/ <0.001	10.784/ <0.001	8.204/ <0.001	12.970/ <0.001
t/P 机器人组内值		7.286/ <0.001	13.304/ <0.001	10.774/ <0.001	15.460/ <0.001
t/P 术后组间值		1.105/ 0.271	0.728/ 0.468	0.947/ 0.345	0.585/ 0.560

注:MPF. 平均功率频率;EMG. 积分肌电值。

2.4 2 组手术前后腰椎功能比较 术后 6 个月 2 组 JOA 评分、椎间隙高度高于术前,局部 Cobb 角小于术前($P < 0.05$),术前、术后 6 个月 2 组间腰椎功能比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 5,图 1、2。

表 5 机器人组 MIS-TLIF 组腰椎功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of lumbar function in robot group MIS-TLIF group

组 别	时间	JOA 评分 (分)	局部 Cobb 角 (°)	椎间隙高度 (mm)
MIS-TLIF 组 ($n = 71$)	术前	11.22 ± 1.87	19.12 ± 3.64	6.34 ± 1.02
	术后 6 个月	17.42 ± 5.11	12.24 ± 2.75	6.88 ± 1.35
机器人组 ($n = 71$)	术前	10.72 ± 2.21	18.53 ± 4.52	6.25 ± 1.11
	术后 6 个月	18.63 ± 4.42	11.51 ± 3.38	7.10 ± 0.68
$t/PMIS-TLIF$ 组内值		9.601/ <0.001	12.707/ <0.001	2.689/ 0.008
t/P 机器人组内值		13.487/ <0.001	10.466/ <0.001	5.502/ <0.001
t/P 术后 6 月组间值		1.509/ 0.134	1.412/ 0.160	1.226/ 0.222

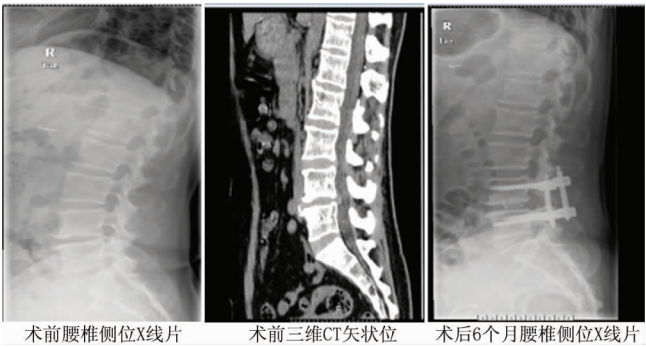


图 1 患者,男,62 岁,确诊为 L4/L5 段腰椎管狭窄症,实施机器人辅助 MIS-TLIF

Fig. 1 Patient, male, 62 years old, was diagnosed as L4/L5 lumbar spinal stenosis, and implemented robot-assisted MIS-TLIF

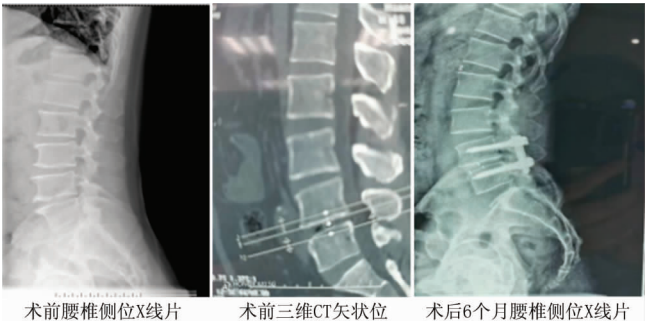


图 2 患者,女,58 岁,确诊为 L4/L5 段腰椎管狭窄症,实施 MIS-TLIF

Fig. 2 Patient, female, 58 years old, diagnosed as L4/L5 lumbar spinal stenosis, implemented MIS-TLIF

2.5 2 组椎体间融合率及融合时间比较 2 组椎体间

融合率及融合时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 6。

表 6 MIS-TLIF 组与机器人组椎体间融合率及融合时间比较

Tab. 6 Comparison of interbody fusion rate and fusion time between MIS-TLIF group and robot group

组 别	椎体间融合率[例(%)]			融合时间(月)
	I 级	II 级	III 级	
MIS-TLIF 组	42(59.15)	27(38.03)	2(2.82)	4.55 ± 0.46
机器人组	44(61.97)	26(36.92)	1(1.41)	4.60 ± 0.41
t/U 值	$U = 0.342$			$t = 0.684$
P 值	0.732			0.495

2.6 2 组并发症比较 机器人组未出现并发症,MIS-TLIF 组发生迟发感染 2 例(2.82%),切口延迟愈合 3 例(4.23%),硬脊膜撕裂 1 例(1.41%),总发生率为 8.45%,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.351, P = 0.037$)。

3 讨 论

对于腰椎管狭窄症来说,病情轻者以保守治疗为主,保守治疗无效或病情重者可考虑手术治疗,但迄今尚无标准术式。以往临床常用开放术式,近年随微创理念及微创技术普及和发展,MIS-TLIF 这一微创术式在腰椎管狭窄症中应用受到诸多脊柱外科医生青睐,主要优势体现在创伤小、椎旁肌肉损伤小、恢复快等方面^[9-10]。随着其临床应用增多,其局限性逐渐显现,如狭小工作通道中实施手术操作,术野及操作空间局限,易干扰上位神经根,诱发医源性损伤;同时手术视野的局限性可影响椎弓根螺钉置入,反复穿刺则会损伤椎旁组织,增加术中出血量,延长手术时间^[11-13]。

自 2004 年以来,机器人开始应用于脊柱疾病外科治疗,具有置钉准确、医患射线暴露少、创伤小、学习曲线短等优点。赵晓飞等^[14]将机器人辅助 MIS-TLIF、MIS-TLIF 分别应用于腰椎退行性疾病患者,结果发现前者术中出血量、椎弓根螺钉置钉准确率均优于后者。陈豪杰等^[15]研究报道,机器人辅助 MIS-TLIF 在术中出血量、置钉准确率方面改善效果优于透视下 MIS-TLIF,可用于单间隙腰椎间盘突出症的微创治疗,与上述研究观点相符。究其原因在于,机器人通过导入患者术前 CT 影像,做好术前规划,精准设计钉道,解决单纯 MIS-TLIF 术野局限的定位困难,加以其高精度度及良好重复性,可减少术中透视次数,提高置钉准确率,缩短置钉时间,防止周围组织、血管及神经损伤,减少术中出血量^[16]。但亦有学者持反对意见,认为脊柱机器人辅助置钉准确率与传统徒手置钉相比并无明显差异,这可能与术者操作经验、腰椎退行性病变类型不

同有关^[17]。本研究还发现,机器人组并无并发症发生,MIS-TLIF 组出现并发症 6 例,其中切口延迟愈合 3 例,考虑与术中反复多次置钉、患者肥胖所致切口干扰过度有关,经清创缝合、换药后愈合;硬脊膜撕裂 1 例,考虑与手术视野有限、手术操作范围狭小有关,缝合后好转;迟发感染 2 例,经敏感抗生素治疗后得到改善。JOA 评分及 X 线检查均为评价腰椎管狭窄症患者腰椎功能常用手段,而肌电图检查是重要神经辅助检查,可弥补影像学检查部分不足,尤其适用于腰椎管狭窄症诊断、病情及预后评估^[18]。本研究结果发现,术后 6 个月 2 组左侧、右侧 MPF、EMG 及 JOA 评分、椎间隙高度高于术前,局部 Cobb 角小于术前($P < 0.01$),可见 2 种微创术式均能改善腰椎功能及肌电图。可能机制为,MIS-TLIF 不仅能实现椎管内充分减压,还可避免对两侧椎旁肌肉过度剥离及牵拉,保留正常组织结构,促进腰椎功能恢复。

红细胞是人体免疫防御系统主要组成部分,涉及 ATER、RBC-C3Br 等指标,可黏附多种免疫复合物,清除异物,还可通过细胞表面补体受体蛋白黏附病毒、细菌,增强机体免疫能力^[19-21]。研究表明,脊柱手术创伤及术中牵拉、疼痛等刺激均会诱发强烈身心应激反应,损伤机体免疫功能,产生红细胞免疫抑制,影响术后康复^[22-23],但其在腰椎管狭窄症微创手术中表达及作用尚不得知。本研究创新性分析 2 种微创术式对腰椎管狭窄症患者红细胞免疫的影响,发现术后 1 d 机器人组 ATER、RBC-C3Br 水平高于 MIS-TLIF 组,说明机器人辅助 MIS-TLIF 创伤小、疼痛轻,可减轻术中红细胞免疫抑制。术后 5 d 2 组各指标呈现降低趋势,且趋于术前水平,说明 2 种微创术式所致红细胞免疫抑制均为一过性,并未带来远期影响。

综上,相比于单纯 MIS-TLIF,机器人辅助 MIS-TLIF 有助于减轻腰椎管狭窄症患者红细胞免疫抑制,提高椎弓根螺钉置钉准确率,降低并发症发生率,改善肌电图。但本研究为单中心研究,样本量小,未来应多中心、多渠道选取样本,提高样本代表性,佐证本研究结论。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

李光富、彭丰:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;吴美平、杨威:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;苏国义:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改

参考文献

- [1] Lai MKL, Cheung PWH, Cheung JPY, et al. A systematic review of developmental lumbar spinal stenosis [J]. *Eur Spine J*, 2020, 29 (9): 2173-2187. DOI:10.1007/s00586-020-06524-2.

- [2] 疏龙飞,代飞虎,张旭,等.黄韧带整体显露技术在经皮微创通道减压术治疗中央型腰椎管狭窄症中的应用[J].*中华神经外科杂志*,2021,37(10):1008-1013. DOI:10.3760/cma.j.cn112050-20210118-00041.
- Shu LF, Dai FH, Zhang X, et al. Application of the whole exposure technique of the ligamentum flavum in the treatment of central lumbar spinal stenosis by percutaneous minimally invasive decompression [J]. *Chin J Neurosurg*, 2021, 37 (10): 1008-1013. DOI: 10.3760/cma.j.cn112050-20210118-00041.
- [3] 孙武,杨克新,罗杰,等.退行性脊柱侧凸对 MIS-TLIF 治疗腰椎管狭窄症疗效影响[J].*中国骨伤*,2021,34(10):928-933. DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2021.10.009.
- Sun W, Yang KX, Luo J, et al. Influence of degenerative scoliosis on the treatment of lumbar spinal stenosis by MIS-TLIF [J]. *Chin J Orthopa Trauma*, 2021, 34 (10): 928-933. DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.10.009.
- [4] Leonova ON, Cherepanov EA, Krutko AV, et al. MIS-TLIF versus O-TLIF for single-level degenerative stenosis: Study protocol for randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2021, 5 (3): e041134. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-041134.
- [5] 林书,胡虹,万仑,等.机器人辅助下微创与传统开放经椎间孔腰椎椎体间融合治疗腰椎退行性疾病的疗效比较[J].*重庆医学*, 2020, 49 (22): 3829-3834. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.032.
- Lin S, Hu J, Wan L, et al. The comparison of short-term effects of robot-guided minimally invasive and traditional open transforaminal lumbar interbody fusion in the treatment of lumbar degenerative diseases [J]. *Chongqing Med J*, 2020, 49 (22): 3829-3834. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2020.22.032.
- [6] 陈孝平,汪建平.外科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:753.
- [7] 廖旭昱,周雷杰,马维虎,等.Wiltse 入路置钉联合对侧 TLIF 和传统术式治疗腰椎间盘突出的病例对照研究[J].*中国骨伤*, 2021, 34 (1): 51-57. DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.01.010.
- Liao XY, Zhou LJ, Ma WH, et al. Wiltse approach combined with contralateral transforaminal lumbar interbody fusion and conventional surgery for lumbar disc herniation: A case-control study [J]. *Chin J Orthopa Trauma*, 2021, 34 (1): 51-57. DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.01.010.
- [8] 许建中,蒋电明,王爱民,等.脊柱结核再次手术原因分析及治疗方案选择[J].*中华骨科杂志*,2008,28(12):969-973. DOI:10.3321/j.issn:0253-2352.2008.12.001.
- Xu JZ, Jiang DM, Wang AM, et al. The reasons and methods of resurgery for spinal tuberculosis-a retrospective multicenter study [J]. *Chinese Journal of Orthopaedics*, 2008, 28 (12): 969-973. DOI: 10.3321/j.issn:0253-2352.2008.12.001.
- [9] Yu B, Zhang J, Pan J, et al. Psychological and functional comparison between minimally invasive and open transforaminal lumbar interbody fusion for single-level lumbar spinal stenosis [J]. *Orthop Surg*, 2021, 13 (4): 1213-1226. DOI:10.1111/os.12986.
- [10] 李锐,许财运,刘正蓬,等.经 Wiltse 入路椎间孔椎体间融合术治

- 疗腰椎滑脱合并腰椎管狭窄的疗效[J]. 局解手术学杂志, 2021, 30(2):136-141. DOI:10.11659/jjssx.06E020133.
- Li R, Xu CY, Liu ZP, et al. Effect of transforaminal lumbar interbody fusion by Wiltse approach in treatment of patients with lumbar spondylolisthesis and lumbar spinal stenosis[J]. J Reg Anat Oper Surg, 2021, 30(2):136-141. DOI:10.11659/jjssx.06E020133.
- [11] 杨波, 杨晋才, 梁智林, 等. 老年单节段退行性腰椎管狭窄症患者椎旁肌形态改变与腰椎功能障碍的相关性分析[J]. 中国医药, 2020, 15(8):1284-1287. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2020.08.032.
- Yang B, Yang JC, Liang ZL, et al. Correlation analysis of paraspinal muscle morphology changes and lumbar dysfunction in elderly patients with single-segment degenerative lumbar spinal stenosis[J]. China Medicine, 2020, 15(8):1284-1287. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2020.08.032.
- [12] 王朵, 张丹, 桂萍. 腰椎管狭窄症患者应用以结局为导向的强化护理干预临床观察[J]. 中国医药导报, 2022, 19(28):194-196. DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2022.28.45.
- Wang D, Zhang D, Gui P. Clinical observation of outcome-oriented intensive nursing intervention in patients with lumbar spinal stenosis[J]. China Medical Herald, 2022, 19(28):194-196. DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2022.28.45.
- [13] 关海森, 卫星, 张军伟, 等. 可扩张通道微创系统下经椎间孔入路腰椎椎间融合术治疗腰椎管狭窄症的疗效观察[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1):79-82. DOI:10.3969/j.issn.2095-8552.2020.01.024.
- Guan HS, Wei X, Zhang JW, et al. Observation on the effect of lumbar interbody fusion via foraminal approach under minimally invasive system with expandable channels in the treatment of lumbar spinal stenosis[J]. Chin Clin Dr, 2020, 48(1):79-82. DOI:10.3969/j.issn.2095-8552.2020.01.024.
- [14] 赵晓飞, 王红强, 高延征, 等. 机器人辅助微创通道下经椎间孔腰椎椎间融合术治疗腰椎退行性疾病临床分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(2):144-147. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2020.02.011.
- Zhao XF, Wang HQ, Gao YZ, et al. Robotic assisted minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion for lumbar degenerative disease[J]. J Chin Pract Diag Ther, 2020, 34(2):144-147. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2020.02.011.
- [15] 陈豪杰, 黄小强, 高林, 等. 机器人与透视下辅助经椎间孔椎体间融合术治疗腰椎间盘突出的病例对照研究[J]. 中国骨伤, 2022, 35(2):101-107. DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2022.02.002.
- Chen HJ, Huang XQ, Gao L, et al. A case-control study of minimally invasive transforaminal interbody fusion with the assistance of robot and traditional fluoroscopy in the treatment of single-space lumbar disc herniation[J]. Chin J Orthopa Trauma, 2022, 35(2):101-107. DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2022.02.002.
- [16] 姜树东, 郭函, 梁得华, 等. 机器人辅助 MIS-TLIF 手术治疗腰椎退行病的初步结果[J]. 中国矫形外科杂志, 2020, 28(7):586-591. DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2020.07.03.
- Jiang SD, Guo H, Liang DH, et al. Primary outcomes of robot-assisted minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion for lumbar degenerative diseases[J]. Orthop J China, 2020, 28(7):586-591. DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2020.07.03.
- [17] Godzik J, Walker CT, Theodore N, et al. Minimally invasive transforaminal interbody fusion with robotically assisted bilateral pedicle screw fixation: 2-dimensional operative video[J]. Oper Neurosurg (Hagerstown), 2019, 16(3):E86-E87. DOI:10.1093/ons/opy288. PMID: 30252105.
- [18] 王晓雷, 韩奇, 王博, 等. 老年腰椎间盘突出患者椎间孔镜术中肌电图监测的应用研究[J]. 老年医学与保健, 2020, 26(5):798-799, 807. DOI:10.3969/j.issn.1008-8296.2020.05.024.
- Wang XL, Han Q, Wang B, et al. Study of electromyogram monitoring during the operation of percutaneous transforaminal endoscopic discectomy for lumbar disc herniation in the elderly[J]. Geriatr Heal Care, 2020, 26(5):798-799, 807. DOI:10.3969/j.issn.1008-8296.2020.05.024.
- [19] 李慧, 闫庆新, 尚宪平, 等. 剖宫产后产褥感染患者细胞因子及红细胞免疫状态临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(1):111-115. DOI:10.11816/cn.ni.2020-190194.
- Li H, Yan QX, Shang XP, et al. Clinical analysis of cytokines and erythrocyte immune status of cesarean section patients with puerperal infection[J]. Chin J Nosocomiol, 2020, 30(1):111-115. DOI:10.11816/cn.ni.2020-190194.
- [20] 刘万祥, 黄民锋, 陈远明, 等. 侧路椎间孔镜技术治疗腰椎管狭窄症的有效性和安全性[J]. 中国医药, 2019, 14(3):412-415. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2019.03.024.
- Liu WX, Huang MF, Chen YM, et al. Efficacy and safety of lateral percutaneous transforaminal endoscopic discectomy in treatment of lumbar spinal stenosis[J]. China Medicine, 2019, 14(3):412-415. DOI:10.3760/j.issn.1673-4777.2019.03.024.
- [21] Ukidve A, Zhao Z, Fehnel A, et al. Erythrocyte-driven immunization via biomimicry of their natural antigen-presenting function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 28(30):17727-17736. DOI:10.1073/pnas.2002880117.
- [22] 曾云, 熊敏, 何宁, 等. 脊柱损伤患者术后切口感染病原学特征, 红细胞免疫指标及降钙素原水平分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(5):580-582. DOI:10.13350/j.cjpb.200517.
- Zeng Y, Xiong M, He N, et al. Analysis of pathogen characteristics, immune indicators, and procalcitonin levels in patients with a postoperative surgical site infection after a spinal injury[J]. Chin J Path Biol, 2020, 15(5):580-582. DOI:10.13350/j.cjpb.200517.
- [23] 程方东, 邱雪莲, 成俊, 等. 脊柱手术后深部感染患者脑脊液中红细胞免疫与促炎因子的变化研究[J]. 实用医院临床杂志, 2021, 18(4):102-105. DOI:10.3969/j.issn.1672-6170.2021.04.030.
- Cheng FD, Qiu XL, Cheng J, et al. Changes of erythrocyte immunity and pro-inflammatory factors in cerebrospinal fluid of patients with deep infection after spinal surgery[J]. Clinical Journal of Practical Hospitals, 2020, 15(5):580-582. DOI:10.3969/j.issn.1672-6170.2021.04.030.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.017

罕见病病例

Aicardi-Goutières 综合征 2 例及文献复习

蒋琼, 曾兰, 朱会, 王齐艳, 罗泽民, 孙春华, 朱书瑶

基金项目: 成都市科技局科技项目(2021-YF05-01658-SN); 四川省妇幼保健院科技创新基金项目(CXPJ017-2020)

作者单位: 610031 成都, 四川省妇幼保健院儿科(蒋琼、朱会、罗泽民、孙春华、朱书瑶), 医学遗传与产前诊断科(曾兰), 放射科(王齐艳)

通信作者: 朱书瑶, E-mail: 330986673@qq.com

【摘要】 报道 2 例 Aicardi-Goutières 综合征的临床资料, 并进行文献复习。

【关键词】 Aicardi-Goutières 综合征; TREX1 基因; RNASEH2C 基因; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R742.8 【文献标识码】 B

Aicardi-Goutières syndrome: two cases and literature review Jiang Qiong*, Zeng Lan, Zhu Hui, Wang Qiyang, Luo Zemin, Sun Chunhua, Zhu Shuyao. * Department of Pediatrics, Sichuan Maternal and Child Health Hospital, Chengdu 610031, China
Corresponding author: Zhu Shuyao, E-mail: 330986673@qq.com

Funding program: Science and Technology Project of Chengdu Science and Technology Bureau(2021-YF056-01658-SN), Science and Technology Innovation Fund Project of Sichuan Maternal and Child Health Hospital(CXPJ017-2020)

【Abstract】 The clinical data of 2 cases of Aicardi-Goutières syndrome were reported and the literature was reviewed.

【Key words】 Aicardi-Goutières syndrome; TREX1 gene; RNASEH2C gene; Diagnosis; Treatment

例 1, 男, 1 岁 3 个月, 因“发现全面发育落后 1 年余”入院。患儿系 G2P2, 40 周顺产娩出, 无窒息病史。孕晚期发现胎儿后颅窝增宽, 未行产前诊断咨询。出生头围 31 cm, 体质量 3.2 kg, 身长 46 cm, 自幼全面发育落后, 新生儿期喂养困难, 1 月龄体质量 3 kg, 身高、体质量均低于同龄儿 -3SD。既往史: 因“皮疹、红斑”曾就诊皮肤科 2 次, 因“肺炎”住院 2 次。父母体健, 非近亲结婚, 第一胎为正常男性, 13 岁, 家族中无同类病史记载。查体: 体质量 8 kg, 身长 69 cm, 头围 41 cm, 四肢短小, 右侧眼球内斜视伴双眼球水平方向震颤, 高腭弓、耳位低、双上肢肌张力增高, 不能独坐、站立, 不能发音, 仅能追光追物。入院后检查肝功能: ALT 28 ~ 364 U/L, AST 39 ~ 332 U/L, PLT 83 ~ 293 × 10⁹/L, 血气分析、血氨、铜蓝蛋白、甲状腺功能、眼底检查及脑电图均正常。Gesell 发育量表示育商 25 分(重度智力残疾)。腹部彩色超声: 肝脏欠均匀回声, 脾脏增大。遗传代谢病串联质谱及尿液有机酸气相色谱-质谱检测正常。头颅 MR: 脑白质髓鞘化明显延迟, 双侧额叶及基底节区可见小片状 T1WI 高信号影, 双侧脑室增宽。全外显子组基因测序(WES)显示, 患儿 TREX1 基因(NM_033629.6): c. 868_885del 及 c. 293dupA 复合杂合突变。Sanger 测序验证该复合杂合突变分别来自表型正常的携带者父亲和母亲, 结合患儿的临床表现和基因分析结果确诊为 Aicardi-Goutières 综合征(AGS)1 型。给予保肝对症治疗, 复查肝功能正常。出院后随访 4 个月, 患儿反复呼吸道感染 2 次, 无惊厥发作, 仍不能独坐及发音。

例 2, 男, 5 岁, 因“诊断全面发育落后 4 年余, 反复癫痫发作 2 年”入院。患儿 4 年前诊断为全面发育落后, 近 2 年反复出

现癫痫发作, 呈局灶性强直阵挛, 3 ~ 5 次/月, 持续时间 5 ~ 10 min, 口服丙戊酸钠抗癫痫治疗, 症状无好转。G1P1, 39⁺⁶周剖宫产娩出, 无窒息病史。孕 34 周头颅 MR: 双侧脑室轻度扩张, 双侧脑室管膜下多发大小不一囊性灶。出生体质量 2.55 kg, 身长 48 cm, 头围 31 cm。生后 1 周曾因“少吃, 发热”脑脊液检查有核细胞增高, 诊断“颅内感染”住院抗感染治疗。3 月龄复查头颅 MR: 双侧脑室管膜下囊肿, 双侧脑室旁白质和半卵圆中心多个小斑点和小结片样异常信号, 考虑钙化灶, 髓鞘化延迟。2 岁时因“冻疮样皮疹”, 曾就诊皮肤科。父母体健, 非近亲结婚, 家族中无同类病史记载。查体: 体质量 13.5 kg, 身高 95 cm, 头围 43 cm(< -3.0SD), 高腭弓, 招风耳, 双上肢肌张力增高, 双下肢肌力降低, 不能独坐、站立, 无自主语言, 无眼神交流。入院后查血常规及肝功能正常, WES 检测示患儿 RNASEH2C 基因(NM_032193)分别遗传于父亲 c. 434(exon 3) G > T 及母亲 c. 392(exon 3) T > A 杂合变异, 2 个变异均为错义突变(图 1)。结合患儿的临床表现和基因分析结果确诊为 AGS3 型。给予丙戊酸钠抗癫痫治疗, 症状无减轻。出院后随访 1 年, 患儿反复癫痫发作, 偶有冻疮样皮疹对症处理好转, 但易反复, 无反复感染表现, 发育无进步。

讨论 Aicardi-Goutières 综合征(AGS)是一种罕见的, 与遗传性有关的神经-皮肤-免疫综合征, 与宫内经胎盘感染后的后遗症状相似, 有基底节钙化和脑白质异常、脑脊液(CSF)中持续淋巴细胞增多, 于 1984 年以家族性发病的早发性脑病首次被报道^[1]。尚无发病率报道, 大部分患儿在生后第 1 年发病, 除神经系统小头畸形、严重发育落后、轻到重度的智力障碍以

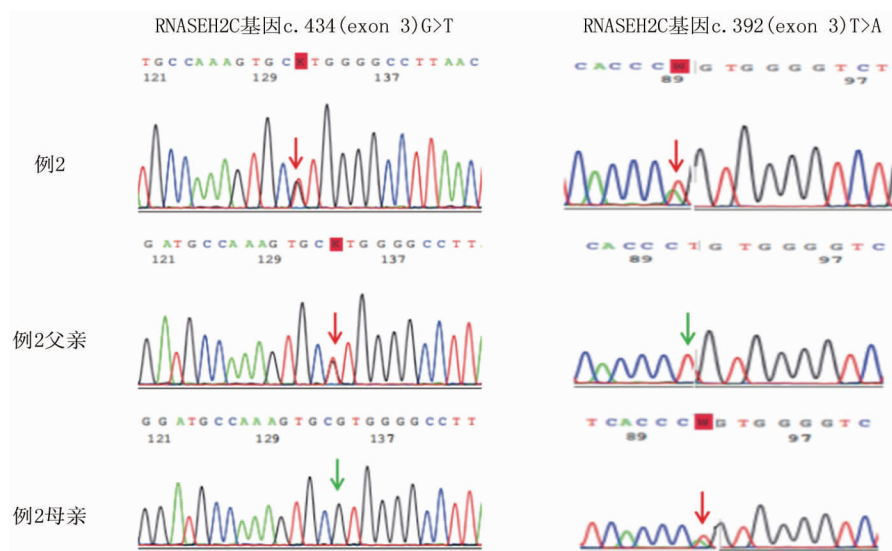


图1 例2患儿及其父母全外显子组基因测序示突变位点

外,还包含冻疮样皮疹、肝功能异常等多系统异常^[2]。

AGS 致病基因至少涉及 TEX1、RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C、SAMHD1、ADAR、IFIH1 等 7 个基因功能性突变,并将 AGS 分为 7 型,其中 TEX1 基因突变为 AGS1 型,RNASEH2C 基因突变为 AGS3 型。AGS1~6 型以常染色体隐性方式遗传,AGS7 型以常染色体显性方式遗传。检索文献我国仅 1 例 RNASEH2B 引起的 AGS2 型报道^[3],尚无 SAMHD1 基因引起的 AGS5 型报道。人体细胞不能正确区分外源性与内源性核酸,使抗病毒应答的细胞因子 I 型干扰素 (IFN) 中 GMP-AMP 合成酶—干扰素基因刺激物 (cGAS-STING),Janus 激酶 1-信号转导及转录激活因子 2 (JAK1-STAT2),这 2 个信号通路异常活化,导致体内 I 型 IFN 水平显著增加,可能是 AGS 的发病机制^[4]。

本研究发现,AGS 患者中不同基因型及表现型存在差异,且同一家族中也存在异质性,在少数家庭兄弟姐妹之间也可见神经系统预后严重程度的显著差异,这与国外大样本研究一致^[5-6],最具共同特征的表现有颅内钙化和皮肤炎性反应,部分可出现肝脾肿大、甲状腺功能异常、肾病等症状。该病多依靠典型临床症状及基因检查诊断,辅助检查可有血红蛋白降低、血小板减少,转氨酶升高,头颅影像学钙化灶及脑脊液淋巴细胞升高,部分患者可在血及脑脊液中发现 IFN- α 升高。

约 22.8% 的 AGS 患者在胎儿期发病,59.6% 患儿在 1 岁内以亚急性脑病伴神经功能倒退起病,病死率约 19%,致残率 74%,虽有报道 JAK1/2 抑制剂 Ruxolitinib 可明显改善与 TREX1 基因相关的皮肤病和 IFIH1 基因相关的全身炎症反应^[7],但 IFN 信号通路内的互补基因多态性^[8-9],仍缺乏基因型—表达型差异小鼠实验,目前尚无特效治疗方法。Li 等^[7]曾给予 AGS 患者 Janus 激酶抑制剂 (JAKinib) 治疗,皮肤情况得到显著改善,但对已发生的神经系统损伤无帮助。

能否在胎儿期及出生早期识别该病,对遗传学、儿科、放射科、皮肤科医生均是巨大的挑战,对曾经生育过 AGS 患儿的多子女家庭及对有再生育需求的 AGS 家庭应提供有效的遗传咨

询和产前诊断。

参考文献

- [1] Aicardi J, Goutieres F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis [J]. Ann Neurol, 1984, 15 (1): 49-54. DOI: 10.1002/ana.410150109.
- [2] Abdel-Salam GM, Zaki MS, Lebon P, et al. Aicardi-Goutieres syndrome: Clinical and neuroradiological findings of 10 new cases [J]. Acta Paediatr, 2004, 93 (7): 929-936. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2004.tb02691.x.
- [3] He T, Xia Y, Yang J. Systemic inflammation and chronic kidney disease in a patient due to the RNASEH2B defect [J]. Pediatr Rheumatol Online J, 2021, 19 (1): 9. DOI: 10.1186/s12969-021-00497-2.
- [4] Ugenti C, Lepelley A, Crow YJ. Self-Awareness: Nucleic acid-Driven inflammation and the type I interferonopathies [J]. Annu Rev Immunol, 2019, 37: 247-267. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041257.
- [5] 季涛云,王静敏,李慧娟,等. Aicardi-Goutières 综合征一家系并文献复习 [J]. 中华儿科杂志, 2014, 52 (11): 822-827. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.11.006.
- [6] 李博红,王辉,刘洋,等. 两个 Aicardi-Goutières 综合征 3 型家系的产前诊断 [J]. 中华围产医学杂志, 2021, 24 (6): 450-453. DOI: 10.3760/cma.j.cn113903-20200930-01002.
- [7] Li W, Wang W, Wang W, et al. Janus kinase inhibitors in the treatment of type I interferonopathies: A case series from a single center in china [J]. Front Immunol, 2022, 13: 825367. DOI: 10.3389/fimmu.2022.825367.
- [8] Crow YJ, Stetson DB. The type I interferonopathies: 10 years on [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22 (8): 471-483. DOI: 10.1038/s41577-021-00633-9.
- [9] Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15 (7): 429-440. DOI: 10.1038/nri3850.

(收稿日期: 2022-09-02)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 04. 018

罕见病例

II 型 Griscelli 综合征继发噬血细胞综合征 1 例并文献复习

黄娇娇, 黄佩, 施晓琦, 李纯莎, 徐艳朋, 冒青, 陈艳

基金项目: 省部共建协同创新中心项目(科技厅函[2020]39 号); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才-CXTD[2021]010)

作者单位: 563000 贵州省遵义市, 遵义医科大学附属医院小儿内科/贵州省儿童医院小儿内科/遵义医科大学组织损伤修复

与再生医学省部共建协同创新中心

通信作者: 陈艳, E-mail: cyz600@163.com

【关键词】 II 型 Griscelli 综合征; 噬血细胞综合征; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R322.2

【文献标识码】 B

A case of type II Griscelli syndrome secondary to hemophagocytic syndrome and literature review Huang Jiaojiao, Huang Pei, Shi Xiaoqi, Li Chunsha, Xu Yanpeng, Mao Qing, Chen Yan. Department of Pediatric Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Province, Zunyi 563000, China

Correspondent author: Chen Yan, E-mail: cyz600@163.com

Funding program: Provincial and Ministerial Co-construction of Collaborative Innovation Center Project (2020:39); Guizhou Science and Technology Plan Project (CXTD [2021] 010)

【Key words】 Griscelli syndrome type II; Hemophagocytic syndrome; Diagnosis; Treatment

患儿, 女, 6 岁, 因“腹部膨隆 1 个月余, 发热 5 d”于 2021 年 7 月 20 日入院。5 d 前患儿因发热(最高体温 39.5℃)于当地医院就诊, 对症退热处理后仍反复发热, 且全身出现散在瘀斑并牙龈出血, 鼻衄 1 次。患儿为第 4 胎第 4 产, 足月顺产, 生长发育正常, 毛发呈银灰色; 父母体健, 系近亲婚配(表兄妹), 患儿 2 个姐姐身体健康, 生长发育可; 其胞兄(第 3 胎)出生即为银灰色毛发, 6 岁时确诊为 II 型 Griscelli 综合征(GS2)继发噬血细胞综合征(HLH), 因出现持续高热及呼吸循环衰竭, 救治无效死亡。查体: T 40.4℃, 神志清, 精神稍差。头发、眉毛、睫毛呈银灰色, 毛发稀疏; 全身皮肤黏膜、甲床、眼睑颜色苍白, 呈中度贫血貌, 皮下散在瘀斑, 双下肢皮肤感染化脓并结痂, 可见部分色素脱失, 浅表淋巴结未触及肿大; 双肺呼吸音稍粗伴湿啰音, 心音尚有力, 律齐, 心前区未闻及明显杂音; 腹部膨隆, 肝肋下 10 cm, 脾脏重度肿大, 神经系统查体阴性。实验室检查: 血 WBC $1.74 \times 10^9/L$, N $0.66 \times 10^9/L$, 异型淋巴细胞 0.02, Hb 53 g/L, PLT $5 \times 10^9/L$; TG 2.93 mmol/L, Alb 23.8 g/L, LDH 545 U/L, Fib 1.37 g/L, 血清铁蛋白 1 278.0 μg/L; NK 细胞活性 3%, IL-6 41.24 ng/L, IL-10 316.65 ng/L, IFN-γ 14.42 ng/L; EB 病毒抗体阳性, 拷贝数为 6.87×10^3 copy/ml。胸部 CT 示双肺炎, 左侧胸腔少量积液; 腹部 CT 示肝脏稍大, 脾脏明显增大, 脾下缘约平左髂前上棘水平, 盆腔、腹股沟淋巴结肿大。基因测序结果示患儿 RAB27A 基因第 5 外显子 c.377 核苷酸纯合子缺失, 与胞兄一致(图 1), 综合病史及基因测序结果诊断为 GS2 继发 HLH。

入院后患儿反复高热, 期间出现呼吸困难, 三凹征(+), 予

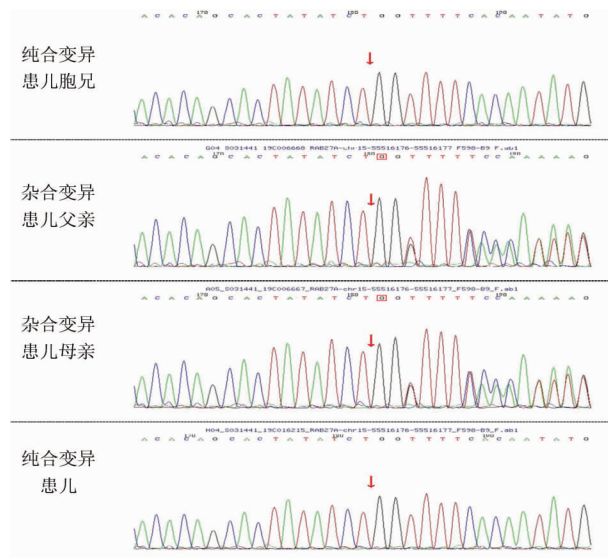


图 1 患儿及其父母、胞兄基因检测结果

呼吸机辅助通气、亚胺培南联合万古霉素抗感染、更昔洛韦抗病毒、成分输血等治疗。针对 HLH, 予甲泼尼龙冲击、依托泊苷、丙种球蛋白治疗, 期间因患儿肝功能出现异常(ALT 436 U/L), 加用保肝药。经上述治疗后, 患儿体温正常, 复查血 WBC $4.14 \times 10^9/L$, N $1.57 \times 10^9/L$, Hb 117 g/L, PLT $43 \times 10^9/L$; 肝功能有所好转; 血清铁蛋白 2 332 μg/L; EB 病毒转阴, 准予出院。现患儿定期返院化疗, 一般情况可, 于 2021 年 9 月 8 日复查血清铁蛋白、肝功能恢复正常, 择期行造血干细胞移植治疗。

讨 论 Griscelli 综合征(Griscelli syndrome, GS)是一种罕见疾病,其发病率 <1/100 万,为常染色体隐性遗传,多见于近亲婚配家庭^[1]。该病常在儿童时期发病,根据突变基因型,将其分为 3 种亚型,其中 RAB27A 突变者,可明确诊断为 II 型 GS (GS2)^[2-3]。该病常继发 HLH,疾病发展迅速,病情凶险,严重威胁患儿生命^[4-5]。目前国际公认治愈 GS2 的唯一方法是造血干细胞移植,但在疾病进展期,需及时针对 HLH 行 HLH-1994/2004 方案以控制病情进一步发展^[6]。

GS2 患儿常表现为银灰色毛发和反复感染,本例患儿头发、眉毛、睫毛呈银灰色,皮肤部分色素脱失和反复化脓感染,符合 GS2 的典型临床表现,同时患儿出现反复高热、血清铁蛋白升高、血常规三系和 NK 细胞活性降低、高三酰甘油和低纤维蛋白原血症,HLH 诊断明确^[7]。2 年前因患儿胞兄发病曾行家系全外显子测序,结果显示,父母均为 RAB27A 基因第 5 外显子 c.377 核苷酸杂合变异,患儿及胞兄均为同一位点纯合子缺失,造成 p. P126Qfs *3 移码突变。RAB27A 位于 15 号染色体的反义链上(15q21),有 2 个主要作用:一是在黑素细胞中作为肌凝蛋白 Va 和成熟黑素体的桥梁来调节色素分布;二是通过与 Munc13-4 的相互作用,参与 T 淋巴细胞和 NK 细胞的细胞毒性颗粒释放^[8]。因此 RAB27A 基因变异,会导致 GS2 患儿部分色素脱失出现银灰色毛发和皮肤白斑;同时因免疫系统缺陷,容易继发 HLH^[9]。HLH 是一种因免疫缺陷致机体免疫细胞异常持续活化和增生,形成“细胞因子风暴”的临床综合征。研究表明,迅速降低高细胞因子水平是挽救 HLH 患儿早期死亡的重要策略^[10],故早期诊断和治疗可提高 HLH 患儿生存率。

GS2 罕见且继发 HLH 后可出现全身各器官系统的临床症状,早期诊断较为不易,极易与其他遗传形式白化病混淆,如 Chediak-Higashi 综合征和 Hermansky-Pudlak 综合征等。Chediak-Higashi 综合征作为原发性 HLH 的一种类型,可出现血常规三系降低、肝脾及淋巴结肿大和严重感染症状,临床症状与 GS2 极难鉴别^[11]。同时,有研究报道 GS2 患儿呈正常发色,以口腔、神经系统病变为首发症状的个案,因此,该疾病临床表现具有异质性^[12-14]。本研究患儿发病时以腹部膨隆为首发症状,提示大量炎症反应浸润肝脾,病情危重;但疾病初期患儿未出现持续高热,而 HLH 一般以持续高热起病,故早期极易忽视 HLH 诊断,从而错过疾病最佳治疗时期。因此,无论是与其他遗传性白化病相鉴别或是本病的临床表现异质性,都是导致该病诊断困难的原因。本例患儿胞兄于 2 年前发病,由于疾病确诊耗时较长,未及时按 HLH 行规范化疗,错过了最佳治疗时期而死亡;而本例患儿得益于胞兄患病时基因检测报告,从而快速确诊疾病,挽救了生命,为后期行造血干细胞移植创造机会。

综上,GS2 作为一种罕见病,临床表现具有异质性,对于银灰色毛发且腹部膨隆患儿,需高度警惕 GS2 继发 HLH 并早期行基因检测确诊;患儿父母近亲婚配,导致隐性基因纯合化从而致病,因此临床医师应做好健康宣教,降低遗传病发病率。

参考文献

[1] Minocha P, Choudhary R, Agrawal A, et al. Griscelli syndrome sub-type 2 with hemophagocytic lympho-histiocytosis: A case report and review of literature[J]. Intractable Rare Dis Res, 2017, 6(1): 76-

79. DOI:10. 5582/irdr. 2016. 01084.

[2] Al-sulaiman R, Othman A, El-akouri K, et al. A founder RAB27A variant causes Griscelli syndrome type 2 with phenotypic heterogeneity in Qatari families[J]. Am J Med Genet A, 2020, 182(11): 2570-2580. DOI:10. 1002/ajmg. a. 61829.

[3] Russ A, Mack J, Green-Murphy A, et al. Griscelli type 2 syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis: Sisters with the same mutation but differe presentations[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2019, 41(6): 473-477. DOI:10. 1097/MPH. 0000000000001522.

[4] Castano-Jaramillo LM, Lugo-Reyes SO, Cruz Munoz ME, et al. Diagnostic and therapeutic caveats in Griscelli syndrome[J]. Scand J Immunol, 2021, 93(6): e13034. DOI:10. 1111/sji. 13034.

[5] Kuskonmaz B, Ayvaz D, Gokce M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in children with Griscelli syndrome: A single-center experience[J]. Pediatr Transplant, 2017, 21(7): e13040. DOI:10. 1111/ptr. 13040.

[6] Born AP, Müller K, Marquart HV, et al. Myositis in Griscelli syndrome type 2 treated with hematopoietic cell transplantation[J]. Neuromuscul Disord, 2010, 20(2): 136-138. DOI: 10. 1016/j. nmd. 2009. 11. 009.

[7] 王昭, 王天有. 噬血细胞综合征诊治中国专家共识[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(2): 91-95. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2018. 02. 004.

[8] Cetica V, Hackmann Y, Grieve S, et al. Patients with Griscelli syndrome and normal pigmentation identify RAB27A mutations that selectively disrupt MUNC13-4 binding[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(5): 1310-1318. e1. DOI:10. 1016/j. jaci. 2014. 08. 039.

[9] Sefsafi Z, Hasbaoui BE, Kili A, et al. Macrophage activation syndrome associated with griscelli syndrome type 2: case report and review of literature[J]. Pan Afr Med J, 2018, 29: 75. DOI:10. 11604/pamj. 2018. 29. 75. 12353.

[10] Rajasekaran S, Kruse K, Kovey K, et al. Therapeutic role of anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist, in the management of secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis/sepsis/multiple organ dysfunction/macrophage activating syndrome in critically ill children[J]. Pediatr Crit Care Med, 2014, 15(5): 401-408. DOI: 10. 1097/PCC. 0000000000000078.

[11] Sharma P, Nicoli ER, Serra-Vinardell J, et al. Chediak-Higashi syndrome: A review of the past, present, and future[J]. Drug Discov Today Dis Models, 2020, 31: 31-36. DOI:10. 1016/j. dmd. 2019. 10. 008.

[12] Ohishi Y, Ammann S, Ziaee V, et al. Griscelli syndrome type 2 sine albinism: Unraveling differential RAB27A effector engagement[J]. Front Immunol, 2020, 11: 612977. DOI: 10. 3389/fimmu. 2020. 612977.

[13] Tewari N, Rajwar A, Mathur VP, et al. Oral features of Griscelli syndrome type II: A rare case report[J]. Spec Care Dentist, 2018, 38(6): 421-425. DOI:10. 1111/scd. 12328.

[14] Panigrahi I, Suthar R, Rawat A, et al. Seizure as the presenting manifestation in Griscelli syndrome type 2[J]. Pediatr Neurol, 2015, 52(5): 535-538. DOI:10. 1016/j. pediatrneurol. 2015. 01. 010.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.019

综 述

WNT/ β -catenin 信号通路在消化系统肿瘤靶向治疗中的最新研究进展

冯富娟, 高春综述 张久聪审校

基金项目: 中央高校优秀青年团队培育项目(31920220065)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃中医药大学(冯富娟、高春); 730050 兰州, 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院消化内科(冯富娟、高春、张久聪)

通信作者: 张久聪, E-mail: zhangjiucong@163.com

【摘要】 WNT/ β -catenin 信号通路是以调控 β -catenin 的稳定性和核定位为核心过程的经典通路, 在细胞增殖、分化和组织稳态维持过程中发挥重要作用, WNT/ β -catenin 信号通路异常可促进肿瘤干细胞更新、细胞增殖和分化, 在肿瘤发生和治疗反应中作用显著。WNT/ β -catenin 信号通路作为肿瘤治疗的靶点成为目前研究的热点。研究表明, WNT/ β -catenin 信号通路与肿瘤的发生、发展等多个方面密切相关, 有效抑制这一信号通路可能在治疗肿瘤方面提供有效的措施。文章就 WNT/ β -catenin 信号通路在消化系统肿瘤靶向治疗中的最新研究进展作一简要综述。

【关键词】 消化系统肿瘤; WNT/ β -catenin 信号通路; 靶向治疗; 研究进展

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A

The latest research progress of WNT/ β -catenin signal pathway in targeted therapy of digestive system tumor Feng Fujuan*, Gao Chun, Zhang Jiucong. * Department of Gastroenterology, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force, Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Zhang Jiucong, E-mail: zhangjiucong@163.com

Funding program: Central University Excellent Youth Team Cultivation Project (31920220065)

【Abstract】 WNT/ β -catenin signaling pathway is regulated by the stability and nuclear localization of β -catenin are classic pathways in core processes that play an important role in cell proliferation, differentiation, and tissue homeostasis. Abnormal WNT/ β -catenin signaling pathway can promote tumor stem cell renewal, cell proliferation, and differentiation, and plays a significant role in tumor genesis and treatment responses. WNT/ β -catenin signaling pathway as a target for tumor therapy has become a hot research topic. Research shows that WNT/ β -catenin signaling pathway is closely related to many aspects of tumor occurrence and development, and effective inhibition of this signaling pathway may provide effective measures in the treatment of tumors. This article briefly reviews the latest research progress of the article on WNT/ β -catenin signaling pathway in targeted treatment of digestive system tumors.

【Key words】 Digestive system tumors; WNT/ β -catenin signaling pathway; Targeted therapy; Research progress

WNT 蛋白是由关键的效应因子 β -catenin 控制的一条典型信号通路, 因此该通路也被称为 WNT/ β -catenin 信号通路^[1]。WNT/ β -catenin 信号通路是一个保守的信号轴, 参与多种生理过程, 如增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭和组织内稳态, 并在肿瘤中发挥重要作用, 是一种潜在的治疗靶点^[2]。研究表明, 在 WNT/ β -catenin 信号通路中, β -catenin 作为转录因子的共激活因子, 即 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子(TCF/LEF), 它刺激 WNT 相关靶基因的转录, 控制细胞的增殖、分化、凋亡等, 从而导致肿瘤的发生和发展^[3,4]。WNT/ β -catenin 信号通路在人类肿瘤和动物实验性肿瘤模型广泛研究, WNT/ β -catenin 信号通路的异常激活与肿瘤的发病率增加、不良预后的发展, 甚至肿瘤相关死亡率的上升密切相关^[5]。因此, WNT/ β -catenin 信号

通路作为肿瘤治疗的靶点成为目前研究的热点, 本文就 WNT/ β -catenin 信号通路在消化系统肿瘤靶向治疗中的最新研究进展作一简要综述。

1 WNT/ β -catenin 信号通路概述

WNT 信号通路的主要组成部分是以旁分泌和自分泌的方式激活细胞膜受体的 WNT 蛋白家族^[6]。细胞分泌的 WNT 蛋白可通过激活卷曲蛋白(frizzled, FZD), 并通过胞内蛋白和转录因子调节基因表达, 从而诱导细胞发生变化^[7]。WNT 通路的结构基于 3 条信号通路: 典型的 β -catenin 依赖的 WNT 信号通路和 2 条非 β -catenin 依赖的非典型 WNT 信号通路, 即平面细胞极性信号通路和 Ca^{2+} 信号通路。这 3 条信号通路均与肿瘤的发生有关, 但典型的 β -catenin 依赖的 WNT 信号通路与肿瘤

的发生最为密切^[8-9]。非典型的 WNT 通路不依赖于 β -catenin, 典型的 WNT 通路, 涉及 β -catenin 的核转位和通过 TCF/LEF 转录因子激活靶基因, 其结构可分为 3 个主要组成部分, 即膜蛋白、降解复合体和 β -catenin 蛋白, β -catenin 是 WNT/ β -catenin 信号通路的核心分子。此外, 典型的 WNT 通路主要控制细胞的增殖, 而非典型的 WNT 通路调节细胞的极性和迁移, 这 2 条主要通路形成了一个相互调节的网络^[10-11]。

2 WNT/ β -catenin 信号通路与消化系统肿瘤

2.1 WNT/ β -catenin 信号通路与肝癌

WNT/ β -catenin 信号通路的异常是促进肝癌发生和发展的原因之一, 激活的 WNT/ β -catenin 与多个信号级联协同作用促进肝癌的形成, 并通过其下游效应器发挥作用^[12]。肝癌的发生主要涉及 β -catenin 的激活, β -catenin 作为 WNT 信号通路中的细胞内信号转导因子, 由 CTNNB1 编码, 在肿瘤发生中起关键作用^[13]。研究发现, 核苷二磷酸激酶 7 (nucleoside diphosphate kinase 7, NME7) 是 WNT/ β -catenin 信号通路的正向调节因子。敲除 NME7 基因抑制了肝癌的生长, 而 NME7 的过表达与 c-myc 协同作用, 诱导了小鼠模型的肿瘤形成, 并促进了肿瘤相关的有机化合物的产生。NME7 作为 WNT/ β -catenin 信号通路激活剂, 可作为肝细胞癌潜在的治疗靶点^[14]。

溴结构域的蛋白 9 (bromodomain-containing protein 9, BRD9) 可以识别乙酰化赖氨酸残基, 导致肿瘤的发生。研究显示, BRD9 在肝细胞癌中显著上调, 且 BRD9 高表达与肿瘤分级高、分期晚、肿瘤体积大、预后差有关。BRD9 过表达促进了细胞增殖、细胞周期进程, 但阻碍了细胞凋亡, 其机制是通过激活 WNT/ β -catenin 信号通路来实现的^[15]。B 淋巴瘤莫洛尼白血病病毒插入蛋白 1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1, BMI1) 是一种致癌转录因子, lncAY (long noncoding RNA AY927503) 和 BMI1 的表达呈显著正相关。lncAY 可能上调肝癌细胞中 BMI1 的表达, 进而激活 WNT/ β -catenin 信号转导, 而 BMI1 可逆转 lncAY 耗竭对肝癌细胞的抑制作用。因此, 靶向 lncAY/BMI1/WNT/ β -catenin 信号轴用于肝癌治疗可能是一种有效的方法^[16]。另有研究表明, 长春新碱通过调节 WNT/ β -catenin 通路抑制肝癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[17]。

研究发现, 敲除 LINC00355 基因可增加肝癌细胞的凋亡率。miR-217-5p 是与 LINC00355 结合的靶基因, 它在 WNT/ β -catenin 信号通路中对肝癌细胞表型和重要基因蛋白水平的调节与 LINC00355 完全相反。因此, LINC00355 在肝细胞癌标本中表达上调, 通过负调控 miR-217-5p, 从而激活 WNT/ β -catenin 信号转导通路, 促进肝癌细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[18]。Liang 等^[19]的研究首次发现 lncRNA-Daw, 并将其确定为一种新的肝癌基因。lncRNA-Daw 在肝癌组织中通常表现为上调, 而过表达的 lncRNA-Daw 显著促进了肿瘤的生长和转移。进一步的研究发现, lncRNA-Daw 通过拮抗 zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homologue 2, EZH2) 的功能来减弱多梳蛋白抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 介导的 WNT2 的抑制作用, 最终导致 WNT/ β -catenin 通路的激活和肿瘤的发生, 这一发现可能为了解肝癌发生的分子机制提供新的见解。

研究显示, Coronin6 (CORO6) 在分级较高的肝细胞癌组织中高表达, 并与不良预后相关。CORO6 的缺失显著损害了肝癌细胞的存活、迁移和侵袭能力。此外, CORO6 增强了肝癌细胞中的 WNT 信号转导, 敲除 CORO6 基因可抑制肿瘤的生长。重要的是, 参与细胞周期调节和肿瘤发生的关键 WNT 靶基因的表达在缺乏 CORO6 的情况下下调。因此, WNT 信号的激活与 CORO6 的促肿瘤作用有关^[20]。

2.2 WNT/ β -catenin 信号通路与胃癌

谷氨酰-脯氨酰-tRNA 合成酶 (glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, Eprs/GluRS) 是多种合成酶复合体的主要组成部分, 可能在肿瘤的发生发展中起关键作用。Eprs 的高表达在功能上与胃癌的发生发展呈正相关。在机制上, Eprs 直接与 SCYL2 (SCY1-like protein 2) 结合, 增强 WNT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路的激活和 β -catenin 在细胞核内的积聚, 导致胃癌细胞增殖和肿瘤生长。此外, 还发现黄烷醇 (xanthoangelol, XA) 和 4-羟基蝶呤 (4-hydroxyderricin, 4-HD) 可以直接与 Eprs 结合, 从而阻断 WNT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路。而且, XA 和 4-HD 可抑制胃癌来源的移植瘤生长和幽门螺杆菌合并酒精诱导的萎缩性胃炎和胃癌的形成。因此, Eprs 介导的 WNT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路可以促进胃癌的发展, 而 XA 和 4-HD 可作为预防和治疗胃癌的一种靶点^[21]。泛素特异性蛋白酶 15 (ubiquitin-specific protease 15, USP15) 是泛素化蛋白水解酶家族的重要成员, 是最大的脱泛素酶亚家族, 在多种肿瘤中表达异常。USP15 通过调节 WNT/ β -catenin 通路促进胃癌的细胞增殖、侵袭和癌变进程, 敲除 USP15 基因可显著抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 抑制体内肿瘤生长, 而 USP15 过表达则促进这些过程^[22]。

双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 是从中药青蒿素中提取的主要成分, 研究表明, DHA 可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 还可以通过抑制 NF- κ B 活性来预防幽门螺杆菌诱导的胃癌。端锚聚合酶 (tankyrases, TNKS) 在胃癌组织中的表达高于正常组织。敲除 TNKS 基因抑制了胃癌细胞的增殖和迁移, 抑制了 WNT/ β -catenin 信号通路的激活。而 DHA 抑制了胃癌中 TNKS 的表达, 提示 DHA 可能是 TNKS 的抑制因子^[23]。研究发现, lncRNA 小泛素样修饰物 1 假基因 3 (small ubiquitin-like modifier 1 pseudogene 3, SUMO1P3) 在胃癌组织和细胞中过表达时, 通过增强 WNT/ β -catenin 信号通路促进 SGC-7901 和 MKN45 细胞增殖、迁移、侵袭, 抑制细胞凋亡, 表明 SUMO1P3 具有促进胃癌生长的潜力。因此, 降低 SUMO1P3 在胃癌细胞中的表达可能是阻止胃癌进展的潜在策略^[24]。lncRNA 酪氨酸激酶衔接蛋白 1 差异转录物非催化区 (noncatalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 divergent transcript, NCK1-DT/NCK1-AS1) 是一种癌基因, 可通过靶向 miR-22-3p/BCL9 轴激活 WNT/ β -catenin 信号通路促进胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 这可能为胃癌的分子研究提供新的视角^[25]。

研究表明, RNA 特异性腺苷脱氨酶 1 (adenosine deaminase acting on RNA-1, ADAR1) 在胃癌、淋巴结转移和大网膜转移中表达显著上调。在体内, 沉默 ADAR1 可显著减小腹膜转移瘤

的体积,下调癌基因钙网蛋白(calreticulin, CALR)的表达,阻断 WNT/ β -catenin 信号通路和 EMT。此外,敲除 ADAR1 基因可明显抑制 HGC-27 和 AGS 细胞的存活率、集落形成和迁移,并改善 WNT 激活剂对肿瘤进展的影响。可见,ADAR1 可能成为胃癌转移的治疗靶点^[26]。另外,CircCNIH4 在胃癌中表达下调,并且主要定位于细胞质。过表达 CircCNIH4 通过失活 WNT/ β -catenin 信号通路抑制胃癌细胞的增殖、侵袭,促进细胞凋亡。而 WNT 拮抗剂基因 DKK2(dickkopf 2)和 FRZB(frizzled related protein)在 MKN-74 和 HGC-27 细胞中过表达,证明了 CircCNIH4 在胃癌细胞中通过调节 DKK2 和 FRZB 在体内的表达来抑制肿瘤的生长和抑制 WNT/ β -catenin 信号通路发挥作用^[27]。

2.3 WNT/ β -catenin 信号通路与结直肠癌 银杏内酯 C(ginkgolide C, GGC)是从银杏叶中分离得到的一种化合物,具有多种药理作用。研究显示,GGC 下调 WNT/ β -catenin 信号通路,抑制 WNT/ β -catenin 通路靶基因 c-myc、cyclin D1 和 survivin 的表达。因此,GGC 可以通过抑制 WNT/ β -catenin 信号通路来抑制结肠癌细胞的增殖和促进细胞凋亡,可作为一种新的 WNT 信号抑制物,作为一种有效的结肠癌治疗药物^[28]。

研究发现,CircRNA 是影响结直肠癌进展的关键调节因子。CircRASSF2 是一种在结直肠癌中显著上调的 CircRNA,它能促进结直肠癌的发生。CircRASSF2 可通过调节 miR-195-5p/FZD4/WNT/ β -catenin 信号通路参与结直肠癌进展的调控,这是结直肠癌中一个新的调控轴。可以推测,CircRASSF2 可能是结直肠癌的一个潜在的生物标志物^[29]。Circ0038718 也是一种新的 CircRNA,Circ0038718 在结肠癌中高表达,并能结合胞浆中的 miR-195-5p。沉默 Circ0038718 可抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而高表达 Circ0038718 对结肠癌细胞的促进作用被 miR-195-5p 过表达所逆转。轴抑制蛋白 2(axis inhibition protein2, AXIN2)是 miR-195-5p 的下游靶点,可以调节 WNT/ β -catenin 信号通路。下调 AXIN2 基因还可减弱 Circ0038718 高表达对结肠癌细胞的促进作用,从而抑制肿瘤生长。可见,Circ0038718 能够通过 miR-195-5p/AXIN2 轴促进结肠癌细胞的发展,这为寻找新的靶向治疗提供新的思路^[30]。Zhang 等^[31]首次证明了 Circ0026628 通过激活 miR-346 和募集融合肉瘤蛋白(fused in sarcoma, FUS),正向调节其同源基因 Sp1 转录因子(Sp1 transcription factor, SP1),激活 WNT/ β -catenin 信号通路。此外,WNT/ β -catenin 信号通路的下游靶点性别决定基因相关转录因子 2(SRY-related HMGbox-containing transcription factor-2, SOX2)进一步转录激活 SP1,诱导 Circ0026628 上调。这种反馈机制促进了结直肠癌细胞的增殖、迁移、EMT 和干细胞分化。

Yan 等^[32]研究发现,C644-0303 是一个在多个水平上抑制 WNT 信号的先导化合物,它可作为 WNT 信号抑制因子。C644-0303 降低了 β -catenin 的活性、TCF/LEF 活性和下游靶基因的表达,它还能诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。酪氨酸蛋白激酶 7(protein tyrosine kinase7, PTK7)可部分通过与 β -catenin 的相互作用,调节 WNT/ β -catenin 通路的信号转导,而 PTK7 在结直肠癌中高表达。因此,抑制 PTK7/ β -catenin 的相互作用可能代

表一种新的治疗方法^[33]。

研究显示,microRNA-381/Spindlin1(miR-381/SPIN1)轴通过控制 WNT/ β -catenin 通路在结直肠癌的增殖和侵袭中起关键作用。SPIN1 表达上调与临床分期、侵袭深度和转移显著相关,突出了其在结直肠癌发生和发展中的重要作用。同时,实验表明,SPIN1 缺失可抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭能力,进一步提示 SPIN1 是结直肠癌患者潜在的癌基因^[34]。研究发现,抑制结肠癌的转移可以通过调节 WNT/ β -catenin 信号通路抑制 EMT 来实现。在实验中,发酵乳杆菌 ZS09(lactobacillus fermentum ZS09)可以通过调节 WNT/ β -catenin 信号通路来抑制 EMT,从而减少偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)和葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导的结肠癌的发生^[35]。另外,有研究以结肠癌患者标本和结肠癌细胞株为研究对象,观察 miR-605-3p 在结肠癌细胞中的表达,结果表明,miR-605-3p 在病理组织和肿瘤细胞中的表达显著下调,并且 miR-605-3p 能有效地诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。降低驱动蛋白家族成员 3B(kinetin family member3B, KIF3B)可以逆转 miR-605-3p 对结肠癌的作用。此外,当 miR-605-3p 上调时,在结肠癌细胞中也观察到失活的 WNT/ β -catenin 通路,而 KIF3B 的上调可改善这一现象^[36]。

研究发现,环指蛋白 128(ring-finger protein 128, RNF128)的表达水平与结直肠癌发生有关。过表达或敲除 RNF128 可相应抑制或促进结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,进一步确定了 RNF128 调节 β -catenin 的泛素化,从而抑制结直肠癌细胞中的 WNT/ β -catenin 信号转导^[37]。还有研究显示,环指蛋白 6(RNF6)在结直肠癌中高表达,并且 RNF6 的高表达促进了 p-GSK3 β 的表达,从而激活了 WNT/ β -catenin 通路,促进了结直肠癌细胞的侵袭和迁移^[38]。研究表明,WD 重复结构域 74(WD repeat domain 74, WDR74)在结直肠癌组织和细胞中表达上调,WDR74 表达下调抑制了结直肠癌细胞的增殖和细胞周期。此外,敲除 WDR74 基因可诱导细胞凋亡,抑制细胞转移和侵袭。从机制上讲,WDR74 降低了 β -catenin 的磷酸化水平,并诱导 β -catenin 在细胞核内积聚,从而激活了 WNT/ β -catenin 信号通路,促进结直肠癌细胞的增殖和转移^[39]。

3 小结

WNT/ β -catenin 是一种保守的信号通路,已有大量研究描述了干扰或激活 WNT/ β -catenin 通路在不同疾病模型中的作用,表明 WNT/ β -catenin 信号通路的异常调节参与了肿瘤的发生和发展。因此,针对肿瘤中 WNT/ β -catenin 信号通路制定不同的治疗策略将极大地改善肿瘤的治疗。然而,目前大多数研究主要集中于动物实验,针对 WNT/ β -catenin 的临床研究非常有限。另外,建议对合成、半合成和天然产物进行更多的临床研究,以了解它们在各种致癌信号通路之间的机制,为肿瘤的治疗及预防提供更多新的靶点。虽然改变 WNT/ β -catenin 信号通路的活性是一种有前景的治疗方法,但全身应用相关药物可能会产生广泛的不良反应,在安全性和选择性方面开发药物激活剂或抑制剂仍然具有挑战性^[40]。

参考文献

- [1] Huang P, Yan R, Zhang X, et al. Activating WNT/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196: 79-90. DOI: 10. 1016/j. pharmthera. 2018. 11. 008.
- [2] Zhou Y, Xu J, Luo H, et al. WNT signaling pathway in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2022, 525: 84-96. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2021. 10. 034.
- [3] Zhang Y, Wang X. Targeting the WNT/ β -catenin signaling pathway in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165. DOI: 10. 1186/s13045-020-00990-3.
- [4] Hiremath IS, Goel A, Warriar S, et al. The multidimensional role of the WNT/ β -catenin signaling pathway in human malignancies[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1): 199-238. DOI: 10. 1002/jcp. 30561.
- [5] Yu F, Yu C, Li F, et al. WNT/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 307. DOI: 10. 1038/s41392-021-00701-5.
- [6] Chatterjee A, Paul S, Bisht B, et al. Advances in targeting the WNT/ β -catenin signaling pathway in cancer[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(1): 82-101. DOI: 10. 1016/j. drudis. 2021. 07. 007.
- [7] Hayat R, Manzoor M, Hussain A. WNT signaling pathway: A comprehensive review[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(6): 863-877. DOI: 10. 1002/cbin. 11797.
- [8] Cheng X, Xu X, Chen D, et al. Therapeutic potential of targeting the WNT/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 473-481. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2018. 11. 082.
- [9] Ranes M, Zaleska M, Sakalas S, et al. Reconstitution of the destruction complex defines roles of AXIN polymers and APC in β -catenin capture, phosphorylation, and ubiquitylation[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(16): 3246-3261. e11. DOI: 10. 1016/j. molcel. 2021. 07. 013.
- [10] Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, et al. WNT signaling pathway in development and cancer[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69(2): 185-196. DOI: 10. 26402/jpp. 2018. 2. 07.
- [11] Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. WNT/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3. DOI: 10. 1038/s41392-021-00762-6.
- [12] Xu C, Xu Z, Zhang Y, et al. β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154515. DOI: 10. 1172/JCI154515.
- [13] He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110851. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110851.
- [14] Ren X, Rong Z, Liu X, et al. The protein kinase activity of NME7 activates WNT/ β -catenin signaling to promote one-carbon metabolism in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(1): 60-74. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-21-1020.
- [15] Fang D, Wang MR, Guan JL, et al. Bromodomain-containing protein 9 promotes hepatocellular carcinoma progression via activating the WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 406(2): 112727. DOI: 10. 1016/j. yexcr. 2021. 112727.
- [16] Chen MH, Fu LS, Zhang F, et al. LncAY controls BMI1 expression and activates BMI1/WNT/ β -catenin signaling axis in hepatocellular carcinoma[J]. *Life Sci*, 2021, 280: 119748. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2021. 119748.
- [17] Yue R, Liu H, Huang Y, et al. Sempervirine inhibits proliferation and promotes apoptosis by regulating WNT/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 806091. DOI: 10. 3389/fphar. 2021. 806091.
- [18] Luo X, Abudureyimu M, Yang G, et al. LINC00355 triggers malignant progression of hepatocellular carcinoma via the sponge effect on miR-217-5p with the involvement of the WNT/ β -catenin signaling[J]. *J BUON*, 2021, 26(5): 1964-1969.
- [19] Liang W, Shi C, Hong W, et al. Super-enhancer-driven lncRNA-DAW promotes liver cancer cell proliferation through activation of WNT/ β -catenin pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 1351-1363. DOI: 10. 1016/j. omtn. 2021. 10. 028.
- [20] Zhang J, Li P, Li T, et al. Coronin 6 promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing canonical WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2021, 12(24): 7465-7476. DOI: 10. 7150/jca. 62873.
- [21] Liu H, Fredimoses M, Niu P, et al. EPRS/GluRS promotes gastric cancer development via WNT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(5): 1021-1036. DOI: 10. 1007/s10120-021-01180-x.
- [22] Zhong M, Zhou L, Fang Z, et al. Ubiquitin-specific protease 15 contributes to gastric cancer progression by regulating the WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(26): 4221-4235. DOI: 10. 3748/wjg. v27. i26. 4221.
- [23] Ma Y, Zhang P, Zhang Q, et al. Dihydroartemisinin suppresses proliferation, migration, the WNT/ β -catenin pathway and EMT via TNKS in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(1): 34. DOI: 10. 3892/ol. 2021. 13152.
- [24] Xu Z, Ran J, Gong K, et al. LncRNA SUMO1P3 regulates the invasion, migration and cell cycle of gastric cancer cells through WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(6): 574-581. DOI: 10. 1080/10799893. 2020. 1836494.
- [25] Guan B, Ma J, Yang Z, et al. LncRNA NCK1-AS1 exerts oncogenic property in gastric cancer by targeting the miR-22-3p/BCL9 axis to activate the WNT/ β -catenin signaling[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(8): 1640-1653. DOI: 10. 1002/tox. 23160.
- [26] Li Z, Huang Y, Xu Y, et al. Targeting ADAR1 suppresses progression and peritoneal metastasis of gastric cancer through WNT/ β -catenin pathway[J]. *J Cancer*, 2021, 12(24): 7334-7348. DOI: 10. 7150/jca. 61031.
- [27] Shi Q, Zhou C, Xie R, et al. CircCNIH4 inhibits gastric cancer progression via regulating DKK2 and FRZB expression and WNT/ β -catenin pathway[J]. *J Biol Res (Thessalon)*, 2021, 28(1): 19. DOI: 10. 1186/s40709-021-00140-x.
- [28] Yang MH, Ha IJ, Lee SG, et al. Ginkgolide C promotes apoptosis and abrogates metastasis of colorectal carcinoma cells by targeting WNT/ β -catenin signaling pathway[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(10): 1222-1234. DOI: 10. 1002/iub. 2532.

- [29] Yang L, Bi T, Zhou S, et al. CircRASSF2 facilitates the proliferation and metastasis of colorectal cancer by mediating the activity of WNT/ β -catenin signaling pathway by regulating the miR-195-5p/FZD4 axis [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(9): 919-929. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001084.
- [30] Gu H, Xu Z, Zhang J, et al. Circ_0038718 promotes colon cancer cell malignant progression via the miR-195-5p/Axin2 signaling axis and also effect WNT/ β -catenin signal pathway [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 768. DOI: 10.1186/s12864-021-07880-z.
- [31] Zhang X, Yao J, Shi H, et al. Hsa_circ_0026628 promotes the development of colorectal cancer by targeting SP1 to activate the WNT/ β -catenin pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 802. DOI: 10.1038/s41419-021-03794-6.
- [32] Yan Y, Zhang Y, Li M, et al. C644-0303, a small-molecule inhibitor of the WNT/ β -catenin pathway, suppresses colorectal cancer growth [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(11): 4722-4735. DOI: 10.1111/cas.15118.
- [33] Ganier L, Betzi S, Derviaux C, et al. Discovery of small-molecule inhibitors of the PTK7/ β -catenin interaction targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer [J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(5): 1061-1072. DOI: 10.1021/acscmbio.1c00826.
- [34] Zhou L, Wang H, Fang Z, et al. The microRNA-381 (miR-381)/Spindlin1 (SPIN1) axis contributes to cell proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulating the WNT/ β -catenin pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12036-12048. DOI: 10.1080/21655979.2021.2003663.
- [35] Liu J, Chen X, Zhou X, et al. Lactobacillus fermentum ZS09 mediates epithelial-mesenchymal transition (EMT) by regulating the transcriptional activity of the Wnt/ β -catenin signalling pathway to inhibit colon cancer activity [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 7281-7293. DOI: 10.2147/JIR.S344564.
- [36] Wang Q, Hao X, Xu G, et al. Downregulated KIF3B induced by miR-605-3p inhibits the progression of colon cancer via inactivating Wnt/ β -catenin [J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 5046981. DOI: 10.1155/2021/5046981.
- [37] Zhu Y, Gan Y, Zou R, et al. RNF128 suppresses the malignancy of colorectal cancer cells via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(12): 13567-13578.
- [38] Li Q, Wang G, Tao J, et al. RNF6 promotes colorectal cancer invasion and migration via the Wnt/ β -catenin pathway by inhibiting GSK3 β activity [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 225: 153545. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153545.
- [39] Cai Z, Mei Y, Jiang X, et al. WDR74 promotes proliferation and metastasis in colorectal cancer cells through regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Open Life Sci*, 2021, 16(1): 920-929. DOI: 10.1515/biol-2021-0096.
- [40] Tewari D, Bawari S, Sharma S, et al. Targeting the crosstalk between canonical Wnt/ β -catenin and inflammatory signaling cascades: A novel strategy for cancer prevention and therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 227: 107876. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107876.

(收稿日期: 2022-09-27)

作者 · 编者 · 读者

“诊疗指南、专家共识解读”专栏征稿

近年来,各类疾病的诊断治疗趋于规范化、标准化,相应的诊疗指南、专家共识也层出不穷,对该类临床诊疗指南及专家共识进行深度权威解读,可为国内同行提供相关参考证据,有助于临床医师更好地学习、理解并应用于临床实践,有利于规范临床诊疗活动,提高医疗服务水平。《疑难病杂志》2022 年组织策划了“中国专家共识”“指南解读”等栏目,邀请相关专家组织了一系列专栏文章,收到良好的效果,文章获得较高的下载率和引用率。2023 年我刊继续面向广大专家学者进行征稿,对最新修订的诊疗指南、专家共识进行解读,其内容包括:指南形成背景、指南重点内容解读、指南主要亮点等,字数 4 000 ~ 6 000 字。稿件一经专家审定,即可在《疑难病杂志》当期发表,稿酬从优,欢迎踊跃赐稿。

联系电话: 0311-85901735, 邮箱: ynbzz@163.com

关于对冒用我刊名义进行非法征稿活动的郑重声明

近期发现网上有冒用我刊名义进行非法征稿活动的情况,我刊为此郑重声明如下: (1) 疑难病杂志社地址设在石家庄,我社从未委托任何代理机构和个人开展组稿、征稿活动,任何打着我刊名义进行收稿活动的个人或机构均属非法。(2) 根据原国家新闻出版广电总局的有关规定,一种期刊只能在其出版地设立一个编辑部,其他任何冒用本刊名义,在网上进行征稿及组稿的活动,均属非法行为。(3) 作者来稿,请直接通过本刊投稿网址进行投稿,禁止发给个人,收稿后本刊将尽快给予处理,谨防上当受骗。

联系电话: 0311-85901735, 邮箱: ynbzz@163.com

投稿网址: <https://ynbz.cbpt.cnki.net>

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.020

综 述

CD19 在急性髓系白血病中的研究进展

白会恩, 闫理想, 林旭综述 史哲新审校

基金项目: 天津市教委科研计划项目(2021KJ145)

作者单位: 300381 天津, 天津中医药大学第一附属医院/国家中医针灸临床医学研究中心

通信作者: 史哲新, E-mail: shzhx0604@163.com

【摘 要】 CD19 抗原作为 B 细胞谱系标志物, 在部分急性髓系白血病患者的细胞上也表达, 但对其预后情况尚存在较大争议。因此, 文章主要介绍 CD19 在急性髓系白血病中的表达, 并对其预后进行探讨, 为此类型白血病的诊断和治疗提供一定的依据。

【关键词】 急性髓系白血病; CD19; 免疫表型; 预后

【中图分类号】 R733.71 【文献标识码】 A

Research progress of CD19 in acute myeloid leukemia Bai Huien, Yan Lixiang, Lin Xu, Shi Zhixin. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

Corresponding author: Shi Zhixin, E-mail: shzhx0604@163.com

Funding program: Scientific Research Plan Project of Tianjin Municipal Education Commission (2021KJ145)

【Abstract】 CD19 antigen, as a B-cell lineage marker, is also expressed in some cells of patients with acute myeloid leukemia, but its prognosis is still controversial. Therefore, this article mainly introduces the expression of CD19 in acute myeloid leukemia and discusses its prognosis, so as to provide a certain basis for future diagnosis and treatment.

【Key words】 Acute myeloid leukemia; CD19; Immunophenotype; Prognosis

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一组起源于造血干细胞的恶性克隆性血液系统疾病, 发病率随年龄增长有增加的趋势, 其异质性较高^[1]。大多数患者起病急、疾病进展快, 使用放化疗、免疫抑制剂及异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)等治疗方法虽有一定的完全缓解率(CR), 但复发率较高。与其他癌症比较, 其靶向治疗发展缓慢, 目前临床效果仍不容乐观^[2]。随着检测技术尤其是流式细胞术的突破发展, 临床将其用于识别白血病细胞上不同抗原的表达, 有助于白血病更精细的分层及预后诊断。不同抗原的表达对 AML 的预后影响不一, 国内外研究结果也不尽相同。CD19 作为淋系抗原几乎表达于全部 B 细胞系血液系统疾病, 是治疗 B 细胞系疾病的重要靶点, 但研究发现其在 AML 各亚型中也呈现出不同频率的表达, 在 AML 的表达率为 3.2%~13.6%^[3-5], 临床意义尚未得到学者们统一认知。基于此, 本文将对 CD19 在 AML 的研究进展做逐一简述。

1 CD19 抗原概述

CD19 是 B 细胞表面的糖基化 I 型跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族的 95 kDa 成员^[6], 是 B 细胞发育和存活所必需的 B 谱系表面抗原, 在 B 细胞发育过程的各个阶段中广泛表达。CD19 几乎表达于所有阶段的 B 谱系急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、各种类型的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)及滤泡树突状细胞(FDC)上^[7], 具有参与 B 细胞的增殖、分化、活化及抗体

产生, 体液免疫信号传导的作用。

虽然 CD19 作为淋系相关抗原, 经常被用于髓系和淋系血液系统疾病的鉴别诊断, 但 CD19 在 AML 中也有不同程度的表达。大量文献研究发现, CD19 与 AML 亚型、细胞遗传学、基因突变、伴随症状及年龄等均有一定的相关性, 其临床意义有待进一步探索。

2 CD19 抗原在 AML 中的表达

2.1 CD19 在 t(8;21) AML 中的表达 欧洲白血病网(ELN)遗传风险分层中, 具有 t(8;21)的 AML 被归类为有利风险 AML, CR 较高, 但仍有一部分的复发率, 具有异质性^[8]。Iriyama 等^[9]研究中发现 CD19 主要在 t(8;21)的 AML 中表达, 显著高于其他正常或异常核型, 该抗原的表达对总生存期(OS)无明显影响, 与其他文献^[10-11]的研究结果基本一致。

中国台湾学者报道^[12], 在 t(8;21) AML 中 CD19 和/或 CD56 表达的频率显著高于其他异常染色体或正常核型, 但 CD19 和 CD56 表达与缓解率无明显相关性。因此这 2 种抗原的共表达有可能作为 AML 伴随 t(8;21)的标志物。Kita 等^[13]发现, t(8;21) AML 的白血病原始细胞在保留于干细胞相关抗原 CD34 的同时通常表达 CD19(18/23), 低表达 CD33, 与国内文献一致。同样有文献报道^[9], 在 t(8;21) AML 中, 特别是 M2/t(8;21)中, CD19 和/或 CD34 的表达较高。CD19 是 t(8;21) AML 的预测标志物之一。有学者研究结果显示, AML 伴 t(8;

21)CD34 表达的髓系原始细胞常伴有 CD19 和 CD56 的表达,而 CD33 的表达减弱或缺失^[14]。国内学者发现^[15], M2/t(8;21) CR 率显著高于无 t(8;21) M2、CD19⁺ M2 明显高于 CD19⁻,并且 CD19⁺/t(8;21) CR 率也明显高于 CD19⁻/无 t(8;21),而二者间伴随的临床体征无明显差别,证明 t(8;21)和 CD19⁺均是 M2 预后良好的指标。

可见,CD19 和 CD34 二者与 t(8;21) AML 关系密切,虽然 CD19 在 t(8;21) AML 中与 CD19 抗原无表达相比临床特征并无显著差别,但拥有较好的预后。t(8;21)异常可能发生在早期造血干细胞分化时期,在向粒细胞分化过程中其在形态学和免疫学上呈现异质性。

2.2 CD19 在 AML-M2 中的表达 AML-M2 是一种具有特殊表现的急性髓系白血病,主要表现为治疗效果差、易复发等特点。随着流式细胞仪的应用,发现 M2 有较为独特的抗原表达,尤其高表达 B 细胞系抗原 CD19,而且 t(8;21)(q22;q22)是和 AML-M2 相关的最常见染色体异常之一^[16]。

王晚霞等^[17]发现,CD19⁺在 AML 中最常表达于 M2 型,其次是 M5 型,而在其他文献中,CD19⁺仅在 M2 型中呈现出高表达,尤其是 M2b,极少见于其他亚型^[14]。t(8;21)是 M2 型的特征性染色体异常,M2/t(8;21)高表达 CD19 和 CD34,低表达 CD33。CD19 与 t(8;21)密切相关,CD19 和 CD34 可联合预测 t(8;21)核型异常,并且 CD19 和 t(8;21)均是 M2 型预后良好的指标,但具体机制尚不清楚。

2.3 CD19 在 AML 其他亚型中的表达 国内研究发现,CD19 除了 M2 型,在 M4 型中也有部分表达,少表达 M1 型^[18]。也有研究发现 CD19 在 M5 型中表达较多,亦少表达于 M4、M1 中,国外研究发现 CD19 在 M5 型中的表达率仅次于 M2 型,少量表达于 M3 型^[4,19]。另有研究发现部分 CD19⁺ AML 患者在 M7 型表达中伴有 t(9;11)(p21;q23)染色体异常,但未进一步明确机制和深入探讨。总而言之,从目前文献中分析可知,CD19 在 AML 其他亚型中的表达均低于 M2 型,且因病例少、无系统性等原因均未进一步探究 CD19 在这些亚型中的意义。

3 CD19 表达与 AML 患者的关系

3.1 CD19⁺ AML 患者的临床特征及生物学特征 在 t(8;21)伴随 RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) 融合转录本表达的 AML 患者中,CD19 抗原在大约 80% 的病例中异常表达^[20]。而且 CD19 抗原也在 CD34、CD38 群体中表达,该群体富含白血病干细胞,这种 AML 亚型在强化化疗方案中预后较好,但大约 40% 的患者会复发。有研究报道^[3]所有的 AML1-ETO 融合转录本阳性 M2 患者 (M2T) 均表达 CD19。Tang 等^[21]发现伴有 RUNX1 突变 AML (非 APL) 患者与 CD19 的表达呈负相关,且在该研究中 RUNX1 突变是影响 OS 的独立不良预后因素。有文献研究发现^[22],AML1-ETO 融合基因与 t(8;21)及 CD19 的表达相关,且此融合基因多见于 M2 型,阳性表达 AML 患者化疗拥有更高的 CR。在国内文献报道的 AML 伴随 RUNX1-RUNX1T1⁺患者中,显著表达 CD19 抗原,虽然表达 CD19 的患者与不表达此抗原的患者 OS 无差别,但有较高的 CR,且 CD19⁺患者不伴有较高的白细胞计数^[23]。

3.2 CD19⁻与 AML 的复发 Sakamoto 等^[24]发现在 RUNX1-RUNX1T1 阳性儿童 AML 中,CD19⁻伴或不伴 KIT 外显子 17 突变,患者均表现出较高的复发风险,尤其 CD19 阴性和 KIT 外显子 17 突变阳性共存的亚组中无复发生存时间 (RFS) 最差,但 CD19⁻仅与疾病复发有关,对生存期无明显影响。同样 Wang 等^[25]在 t(8;21) AML 中发现,KIT⁻/CD19⁺患者的疾病累积复发率 (CIR) 最低,而 KIT⁺/CD19⁻患者的 CIR 最高,CD19⁻的患者存在显著的复发风险,但与 KIT 突变和阿糖胞苷 (Ara-C) 的诱导强度无关,与生存期也无相关性。可见 CD19⁻和 KIT 突变共存可以为 t(8;21) AML 提供更明确的风险分层曲线,从而指导适合单独风险的治疗,如异基因造血干细胞移植 (allo-SCT)。王彪等^[26]同样发现在 t(8;21) AML 中,CD19⁻和 KIT-D816 突变均与 CIR 升高具有显著相关性,而多因素分析显示,CD19⁻是 CIR 升高的唯一相关独立预测因子。而且 CD19⁻还与不良的无病生存率 (EFS) 显著相关,但主要是通过升高累积复发率影响 EFS,在多因素分析中没有独立意义。

可见,缺乏 CD19 表达的 AML 患者与易复发、不良预后等关系密切。研究发现^[27],AML 患者化疗后导致复发的因素之一是 B 细胞功能受损,体液免疫功能恢复缓慢,因为化疗后 B 淋巴细胞中具有抗体产生功能的亚群比例较健康者显著降低,认为化疗干扰骨髓中 B 淋巴细胞的增殖及分化。

总之,CD19 无表达可以作为预测 AML 患者复发的独立危险因素。目前关于复发的机制考虑有以下几种可能:(1)与白血病细胞表面抗原 CD19 的缺失可逃脱 T 细胞介导的免疫清除机制,导致缓解后微小残留病持续存在,最终致白血病复发及伴有 RUNX1 突变有关。(2)与 KIT-D816 突变共表达,容易出现原发耐药有关。(3)与 CD56⁺共表达,神经黏附分子特性使肿瘤细胞更具有侵袭性,易与其他组织细胞黏附,且高表达 P 糖蛋白,易出现耐药有关。

3.3 CD19⁺与 AML 患者生存期 王伟伟等^[4]发现 CD19 表达呈阳性的 AML 患者,其 CR 率高于阴性患者。Iriyama 等^[9]发现具有 t(8;21)的 AML 经常同时表达 CD19 和 CD34,CD19 阳性是患者获得 CR 的常见因素,但对 OS 没有影响,而 CD19 阴性是复发的不利因素。且研究发现 CD56 作为易使肿瘤细胞侵袭性生长的抗原分子,其阴性表达的人群更频繁表达 CD19 阳性。国内研究发现^[28],AML 患者初诊组、继发组及复发组的 CD19 表达较健康者依次减少,且复发患者显著低于初诊的患者,说明在白血病细胞的作用下,骨髓免疫功能受到抑制。李光曦等^[29]等发现 AML 患者中 HuR 基因表达被抑制可诱导白血病细胞凋亡,从而降低 CD7 和 CD19 抗原表达,其机制可能与抑制 STAT3 信号通路有关,CD19 被诱导下降可能易导致患者复发。

Li 等^[30]发现 CD19⁺的 AML 患者不伴有较高白细胞计数及较低的血小板计数等危险因素,且相对于成人和老年人而言,在儿童中有较高的表达率并伴有良好风险的细胞遗传学及预后。但王晚霞等^[17]发现,与 CD7⁻CD19⁻CD56⁻ AML 相比,CD19⁺ AML 的白细胞计数、血红蛋白、年龄、肝脾淋巴结肿大、髓外浸润、骨髓原始细胞比例等临床特征无明显差别,但有较

低的血小板计数,而二者的 CR 率及 RFS 无差别。国外早期研究发现,CD19 抗原与较高的白细胞计数具有相关性,与较短的生存期有关。分析机制可能是 CD19⁺ 与 CD56 的表达呈负相关,不易发生髓外浸润及耐药。

3.4 CAR-T-19 在 AML 治疗中的应用 CD19 作为 B 细胞系抗原,几乎表达于全部 B 细胞系恶性肿瘤疾病,嵌合抗原受体 T 细胞靶向 CD19 (CAR-T-19) 治疗此类疾病取得了巨大成功。基于此,有临床研究将 CAR-T-19 用于治疗表达 CD19 的 AML 中。

Qu 等^[11] 研究中描述了 2 例 AML 患者在接受 CAR-T-19 治疗期间均表现出短暂时全血细胞减少。其中 1 例在治疗 1 个月达到分子学完全缓解 (mCR); 另 1 例在接受治疗后 1 周左右骨髓 (BM) 可检测到血液学完全缓解 (hCR) 和细胞遗传学完全缓解 (cCR)。在 Danylesko 等^[31] 研究中也报道了 1 例接受 CD19 CAR-T 细胞治疗的 t(8;21) AML 成年男性患者,证实了其能够诱导 CD19⁺ AML 患者的临床和分子缓解。在 Plesa 等^[20] 研究中报道了 1 例 CD19 阳性的复发 t(8;21) AML 患者,在使用对抗 CD19 表达细胞的 blinatumomab 双特异性抗体治疗后达到了完全的分子反应。在 Ma 等^[32] 研究中实验证明,CD19CAR 显示出了强大的靶细胞裂解能力,能够消除靶点 CD19⁺ AML 的细胞。值得注意的是,CAR-T-19 治疗 AML 虽然具有良好的效果,但也会出现一些不良反应。

目前,CAR-T 治疗 AML 面临的主要问题是缺乏特异性的 AML 抗原、脱靶毒性、缓解时间较短等。但 CAR-T-19 很有希望成为一种安全治疗 CD19 阳性 t(8;21) 难治/复发 AML 的潜在方法。迄今为止,CAR-T 治疗 AML 仍处于临床试验中,现有的临床数据有限,期待未来更多的临床试验进一步证实。

4 小结与展望

CD19⁺ 的 AML 具有独特的临床和生物学特征,临床表现为易复发、生存期短等特点,但具体机制尚不清楚,可能与癌细胞表面抗原 CD19 的缺失逃脱了 T 细胞介导的免疫清除机制,导致缓解后微小残留病持续存在及伴有较差的突变等有关。而 CD19⁺ AML 患者具有较高的完全缓解率,临床预后相对较好。分析原因可能为 CD19 的异常表达与具有良好遗传学的 t(8;21) 呈现高度相关性,有望做为 t(8;21) AML 的预测标志物,其伴有的基因突变多为预后良好型,如 RUNX1-RUNX1T1⁺ 等。CD19⁺ 与其在低 EFS 的评估中具有重要作用,并可能与细胞遗传学等一起用于 AML 预后评分系统。CD19 多表达于 AML-M2 中,可能有助于 AML 亚型分型的诊断。因现有研究发现 CD19 极少表达于 AML 其他亚型中,故其与 AML 其他亚型的关系暂不明确,有待进一步研究探索。目前 CAR-T-19 作为 B 细胞系恶性血液疾病的理想靶点,有望运用于 AML 的临床治疗中,但目前相关临床研究较少,虽有较好的完全缓解率但不良反应较多,期望未来有更多的临床数据或前瞻性研究证实。

参考文献

[1] Jia R, Ji M, Li G, et al. Subclones of bone marrow CD34⁺ cells in acute myeloid leukemia at diagnosis confer responses of patients to induction chemotherapy [J]. *Cancer*, 2022, 128 (22): 3929-3942. DOI:10.1002/cnecr.34481.

[2] Xia Y, An J, Li J, et al. Transferrin-guided intelligent nanovesicles

augment the targetability and potency of clinical PLK1 inhibitor to acute myeloid leukemia [J]. *Bioact Mater*, 2022, 21: 499-510. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.08.032.

[3] Abdelhaleem M. Frequent but nonrandom expression of lymphoid markers on de novo childhood acute myeloid leukemia [J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 83 (2): 259-263. DOI: 10.1016/j.yexmp.2007.05.007.

[4] 王伟伟,徐元宏. 免疫表型及非髓系分化抗原表达分析:对急性髓细胞白血病的诊断和预后判定有应用价值 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40 (11): 1639-1644. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.11.16.

Wang WW, Xu YH. Analysis of immunophenotypes and expressions of non-myeloid antigens in acute myeloid leukemia [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2020, 40 (11): 1639-1644. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.11.16.

[5] Sun X, Wang H, Wu W, et al. Relationship between abnormal expression of immunophenotypes in acute myeloid leukemia and karyotypic abnormalities [C]//Abstracts of IUIS 2019 Beijing—17th International Congress of Immunology (II). 2019:188. DOI:10.26914/c.cnkihy.2019.008953.

[6] Yamada S, Kaneko MK, Sayama Y, et al. Development of novel mouse monoclonal antibodies against human CD19 [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2020, 39 (2): 45-50. DOI: 10.1089/mab.2020.0003.

[7] Her JH, Pretscher D, Patra-Kneuer M, et al. Tafasitamab mediates killing of B-cell non-Hodgkin's lymphoma in combination with $\gamma\delta$ T cell or allogeneic NK cell therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71 (11): 2829-2836. DOI:10.1007/s00262-022-03165-w.

[8] Jahn N, Terzer T, Strang E, et al. Genomic heterogeneity in core-binding factor acute myeloid leukemia and its clinical implication [J]. *Blood Adv*, 2020, 4 (24): 6342-6352. DOI:10.1182/bloodadvances.2020002673.

[9] Iriyama N, Hattai Y, Takeuchi J, et al. CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21) [J]. *Leuk Res*, 2013, 37 (9): 1021-1026. DOI:10.1016/j.leukres.2013.05.002.

[10] 何琛,张秋堂,汤平,等. 急性髓系白血病微小残留病的多色流式细胞术检测 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2022, 30 (2): 341-345. DOI:10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2022.02.003.

He C, Zhang QT, Tang P, et al. Polyolor flow cytometry of minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *Chinese Journal of Experimental Hematology*, 2022, 30 (2): 341-345. DOI:10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2022.02.003.

[11] Qu C, Li Z, Kang L, et al. Successful treatment of two relapsed/refractory t(8;21) acute myeloid leukemia patients by CD19-directed chimeric antigen receptor T cells [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54 (7): 1138-1140. DOI:10.1038/s41409-018-0423-y.

[12] Chen SW, Li CF, Chuang SS, et al. Aberrant co-expression of CD19 and CD56 as surrogate markers of acute myeloid leukemias with t(8;21) in Taiwan [J]. *Int J Lab Hematol*, 2008, 30 (2): 133-138. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2007.00913.x.

[13] Kita K, Nakase K, Miwa H, et al. Phenotypical characteristics of

- acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21) (q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34 [J]. *Blood*, 1992, 80(2): 470-477. DOI: org/10.1182/blood.V80.2.470.470.
- [14] 林元峰, 方小丽, 徐川林, 等. 漳州地区 525 例急性髓系白血病患者免疫表型特点[J]. *福建医药杂志*, 2020, 42(4): 116-118. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0600.2020.04.041.
- Lin YF, Fang XL, Xu CL, et al. Immunophenotypic characteristics of 525 patients with acute myeloid leukemia in Zhangzhou region [J]. *Fujian Medical Journal*, 2020, 42(4): 116-118. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0600.2020.04.041.
- [15] 潘湘涛, 夏学鸣, 李建勇, 等. M2/t(8;21) 的免疫学和遗传学特征及其与预后的关系[J]. *临床内科杂志*, 2002, 19(2): 133-135. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2002.02.017.
- Pan XT, Xia XM, Li JY, et al. Relationship between immunologic and cytogenetic features and the prognosis of M2/t(8;21) [J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 2002, 19(2): 133-135. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2002.02.017.
- [16] Mishra SR, Rawal L, Othman MAK, et al. Complex rearrangement in acute myeloid leukemia M2 with RUNX1/RUNX1T1 fusion involving chromosomes 8, 17 and 21 [J]. *Mol Cytogenet*, 2021, 14(1): 28. DOI: 10.1186/s13039-021-00541-6.
- [17] 王晚霞, 李敬东. 淋系抗原表达对急性髓系白血病预后的价值[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(9): 1667-1671. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.09.029.
- Wang WX, Li JD. Prognostic value of lymphatic antigen expression in acute myeloid leukemia [J]. *Modern Medical Oncology*, 2022, 30(9): 1667-1671. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.09.029.
- [18] 宋斌, 陈雁, 吴修伟, 等. 急性髓系白血病幼稚细胞群免疫表型特点和预后分析[J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(12): 1250-1254. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2016.12.010.
- Song B, Chen Y, Wu XW, et al. Analysis of the immunophenotypic characteristics and prognosis of naive cell populations in acute myeloid leukemia [J]. *Journal of Difficult Diseases*, 2016, 15(12): 1250-1254. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2016.12.010.
- [19] 段王菲. 急性髓系白血病免疫表型及基因突变的特点分析[D]. 新乡: 新乡医学院, 2022.
- [20] Plesa A, Labussière-Wallet H, Hayette S, et al. Efficiency of blinatumomab in a t(8;21) acute myeloid leukemia expressing CD19 [J]. *Haematologica*, 2019, 104(10): e487-e488. DOI: 10.3324/haematol.2019.225557.
- [21] Tang JL, Hou HA, Chen CY, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations [J]. *Blood*, 2009, 114(26): 5352-5361. DOI: 10.1182/blood-2009-05-223784.
- [22] 刘恒. 163 例初治急性髓系白血病患者融合基因检测及预后分析[D]. 北京: 军事科学院, 2019.
- [23] 胡忠利, 张凤, 黄保军, 等. CD19、CD56 在急性髓系白血病 RUNX1-RUNX1T1 突变患者中的表达及其临床意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(3): 727-732.
- Hu ZL, Zhang F, Huang BJ, et al. Expression of CD19 and CD56 in patients with RUNX1-RUNX1T1 mutations in acute myeloid leukemia [J]. *Chinese Journal of Experimental Hematology*, 2018, 26(3): 727-732.
- [24] Sakamoto K, Shiba N, Deguchi T, et al. Negative CD19 expression is associated with inferior relapse-free survival in children with RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukaemia: results from the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 study [J]. *Br J Haematol*, 2019, 187(3): 372-376. DOI: 10.1111/bjh.16080.
- [25] Wang B, Yang B, Ling Y, et al. Role of CD19 and specific KITD816 on risk stratification refinement in t(8;21) acute myeloid leukemia induced with different cytarabine intensities [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(3): 1091-1102. DOI: 10.1002/cam4.3705.
- [26] 王彪, 林榕榕, 杨斌, 等. 联合 CD19 和 KITD816 进一步优化 t(8;21) 急性髓系白血病预后分层[J/OL]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2019, 13(8): 589-595. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2019.08.006.
- Wang B, Lin RR, Yang B, et al. Combined with CD19 and KITD816 to further optimize t(8;21) prognostic stratification of acute myeloid leukemia [J]. *Chinese Journal of Clinicians: Electronic edition*, 2019, 13(8): 589-595. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2019.08.006.
- [27] Goswami M, Prince G, Biancotto A, et al. Impaired B cell immunity in acute myeloid leukemia patients after chemotherapy [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 155. DOI: 10.1186/s12967-017-1252-2.
- [28] 高燕婷, 赵金艳, 王娟, 等. 急性髓细胞性白血病患者骨髓淋巴细胞亚群分析及其临床意义[J]. *诊断学理论与实践*, 2020, 19(4): 407-413. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2020.04.016.
- Gao YT, Zhao JY, Wang J, et al. Analysis of bone marrow lymphocyte subsets in acute myelogenous leukemia patients and its clinical significance [J]. *Diagnostics Theory and Practice*, 2020, 19(4): 407-413. DOI: 10.16150/j.1671-2870.2020.04.016.
- [29] 李光曦, 张军, 靳小可, 等. RNA 干扰 HuR 基因表达对急性髓系白血病细胞凋亡和 CD7、CD19 表达的影响及机制研究[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(8): 1046-1049. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.08.002.
- Li GX, Zhang J, Jin XK, et al. Effects and mechanisms of RNA interference of HuR gene expression on apoptosis and CD7 and CD19 expression in acute myeloid leukemia cells [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2018, 35(8): 1046-1049. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.08.002.
- [30] Li X, Li J, Du W, et al. Relevance of immunophenotypes to prognostic subgroups of age, WBC, platelet count, and cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia [J]. *APMIS*, 2011, 119(1): 76-84. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2010.02694.x.
- [31] Danylesko I, Jacoby E, Yerushalmi R, et al. Remission of acute myeloid leukemia with t(8;21) following CD19 CAR T-cells [J]. *Leukemia*, 2020, 34(7): 1939-1942. DOI: 10.1038/s41375-020-0719-y.
- [32] Ma G, Wang Y, Ahmed T, et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor targeting of CD19⁺ acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Res Rep*, 2018, 9: 42-44. DOI: 10.1016/j.lrr.2018.03.002.

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.04.021

综 述

肝纤维化分子机制的研究进展

吴智煌综述 沈瑶,冯敏,杨胜辉审校

基金项目:湖南省 2021 年度中医药科研计划项目(2021031);湖南中医药大学重点学科(基础医学)资助项目

作者单位:410208 湖南长沙,湖南中医药大学医学院(吴智煌、沈瑶、杨胜辉);湖南中医药大学护理学院(冯敏)

通信作者:杨胜辉, E-mail:2289836475@qq.com

【摘 要】 肝纤维化是一种由病毒感染、酒精、化学物质等原因导致的慢性肝损伤的愈合反应,是慢性肝脏疾病进展为肝硬化或肝癌的关键环节。如何预防和逆转肝纤维化是目前研究的热点和难点,而充分认识和阐明肝纤维化的发病机制是防治基础。文章从炎性反应、氧化应激、TGF- β /SMAD 信号通路、肝星状细胞自噬方面对肝纤维化的发生发展进行综述,旨在深入认识肝纤维化发生的分子机制,为其预防和治疗提供指导。

【关键词】 肝纤维化;肝星状细胞;分子机制

【中图分类号】 R575.2 【文献标识码】 A

Research progress in the molecular mechanism of liver fibrosis Wu Zhihuang*, Shen Yao, Feng Min, Yang Shenghui. *Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province, Changsha 410208, China

Corresponding author: Yang Shenghui, E-mail: 2289836475@qq.com

Funding program: Hunan 2021 Traditional Chinese Medicine Research Plan Project (2021031); Key Discipline (Basic Medicine) Funded Project of Hunan University of Traditional Chinese Medicine

【Abstract】 Liver fibrosis is a healing reaction of chronic liver injury caused by viral infection, alcohol, chemicals, and other factors. It is a key link in the progression of chronic liver diseases to cirrhosis or liver cancer. How to prevent and reverse liver fibrosis is a hot and difficult topic in current research, and fully understanding and clarifying the pathogenesis of liver fibrosis is the basis for prevention and treatment. This article focuses on inflammatory response, oxidative stress, and TGF- β /SMAD signaling pathway and hepatic stellate cell autophagy, with the aim of deeply understanding the molecular mechanism of liver fibrosis and providing guidance for its prevention and treatment.

【Key words】 Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; Molecular mechanism

肝纤维化是由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和降解失衡引起的一种疾病^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)占肝脏固有细胞总数的 5%~8%,主要存在于肝脏窦周 Disse 腔内,其活化是肝纤维化病理发生过程中至关重要的一环^[2]。HSC 的激活是一个复杂的过程,涉及多种细胞和炎性因子介质的相互作用。来自炎性细胞、损伤的肝细胞、内皮细胞等释放的细胞因子包括血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)和瘦素可促进 HSC 激活和 ECM 的沉积^[3]。各种病因如非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)、病毒性肝炎、胆道梗阻等,通过持续的肝损伤和伤口愈合反应使非增殖状态的 HSC 被激活转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),并分泌大量的 ECM,加重肝纤维化,在此病变上进一步发展为肝硬化和肝癌,严重影响慢性肝病患者预后^[4,5]。因此,探究肝纤维化发病过程中的分子机制是有效预防和逆转肝纤维化的基础和必要前提,也将为肝纤维化的防治提供参考和借鉴。

1 炎性因子在 HSC 活化中的作用

肝损伤诱发的炎性反应是进行性纤维化的典型事件^[6]。当肝脏受到炎性刺激时, HSC 被激活, 转化为 MFB, 分泌大量包含胶原 I、III 在内的 ECM 及炎性介质。IL-22 是 IL-10 细胞因子家族中的一员, 作为肝细胞的存活因子与受体 IL-22R1 和 IL-10R2 结合, 在多种肝脏疾病中发挥保护作用, 如肝炎、肝纤维化或肝细胞癌^[7]。研究表明, 过表达 IL-22 可通过减弱 HSC 的活化, 下调炎性细胞因子水平, 从而减轻肝纤维化^[8]。此外, IL-22 治疗可激活肝脏信号转导和转录激活因子 3, 改善酒精性脂肪肝, 有效缓解酒精和毒物引起的肝损伤^[9]。总之, IL-22 的保肝作用提示了 IL-22 在人类肝脏疾病治疗中的潜力。在 PDGF/PDGFR 通路中, PDGF 作为肝脏中一种重要的有丝分裂原, 具有促进 HSC 增殖和迁移的能力^[10]。PDGFR 可通过自身磷酸化激活 Akt 蛋白来调控 Caspase-3、Bcl-2 等细胞凋亡因子, 促进 HSC 分裂增殖, 并使其汇集于炎性反应区域, 加剧肝损伤, 导致肝纤维化^[11]。研究表明, 在四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)和胆管结扎(bile duct ligation, BDL)小鼠模型中, 敲除

HSCs 中 PDGFR β 可减少炎性细胞浸润和胶原蛋白的表达^[12]。众所周知, NF- κ B 是参与炎性反应的主要信号通路, 其调控不仅强调了转录因子在肝病发展中的作用, 同时阐明了肝损伤、肝炎、肝纤维化之间的机制联系。NF- κ B 活化后可通过促进 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎性因子的生成, 诱使肝脏发生炎症反应, 激活促纤维化因子 TGF- β_1 大量分泌, 进一步加剧肝纤维化进程^[13]。PPAR γ 是一个抗纤维化的核受体, 在活化的 HSC 中可通过抑制 NF- κ B 向细胞核的转位来阻断 NF- κ B 信号通路^[14]。研究表明^[15], 在 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型中, 左旋四氢巴马汀治疗显著上调 PPAR γ mRNA 和蛋白水平, 且呈剂量依赖性抑制 NF- κ B-P65 mRNA 和蛋白表达的增加, 从而下调 TGF- β_1 /Smad 通路的表达, 抑制 HSCs 的激活、ECM 的合成。这些参与纤维化的因子及信号通路相互影响, 相互联系, 最终形成靶向 HSC 来调控肝纤维化的网络。因此, 深入探讨细胞因子、信号通路与 HSC 的关系, 可为肝纤维化的防治提供新的思路和方向。

2 氧化应激在 HSC 活化中的作用

氧化应激是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生和抗氧化系统清除能力之间不平衡的反映, 贯穿整个肝纤维化过程。在受损的肝脏中, 活化的 Kupffer 细胞、活化的 HSCs 和中性粒细胞等可激活氧化应激系统产生 ROS, 干扰肝脏特异性细胞的正常功能, 因此恢复体内氧化与抗氧化系统的平衡可以改善肝纤维化^[16-17]。NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 作为一种由多蛋白亚基构成的跨膜复合体, 是肝细胞中 ROS 的主要来源^[18]。NOX4 是机体内氧化系统的一个多蛋白复合体, 是目前已知唯一的专职产生 ROS 的酶类^[19]。研究表明, 在肝脏组织和被血清培养激活的原代 HSC 中, NOX4 mRNA 明显增多, 而在缺乏 NOX4 的 HSC 中, ROS 生成则被减弱^[18]。丙二醛 (MDA) 是脂质与氧自由基反应形成的产物之一, 作为氧化应激指标, 其水平代表机体脂质过氧化程度; 而超氧化物歧化酶 (SOD) 是生物体内清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶, 具有内源性自由基清除剂功能, 在肝脏受损过程中, SOD 表达下调, 使肝脏对超氧化物诱导的损伤敏感, 提高 SOD 水平可以提高细胞抗氧化能力, 减轻肝细胞损伤^[20]。Yang 等^[21]研究表明, 槲皮素能通过增加 SOD、GSH 水平、明显降低机体内氧化应激指标 GST、MDA 水平, 降低 collagens I mRNA 表达, 而达到改善肝纤维化的目的。研究表明, Nrf2 是体内重要的抗氧化应激效应因子, 也是肝脏抗氧化应激系统的中心环节, Nrf2 激活能增强内源性抗氧化系统, 抵抗体内氧化应激系统的失衡^[16, 22]。在胆汁淤积性肝损伤状态下, Nrf2 被持续激活, 与 Keap1 解偶联并与下游抗氧化因子 II 期解毒酶结合, 包括 HO-1 和 NQO1, 保护机体免受活性氧攻击来降低氧化应激损伤^[23-24]。研究发现^[25], 骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 上调 CCl₄ 中毒大鼠肝组织 Nrf2 和 HO-1 的表达, 证明 BMSCs 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激、炎症反应和肝纤维化。综上, 提高机体抗氧化应激能力可望成为治疗肝纤维化的一种可行策略。

3 TGF- β /SMAD 分子信号通路在 HSC 活化中的作用

TGF- β 通常被认为是最有效的促纤维化细胞因子, 由肝脏

中的几种细胞群包括肝巨噬细胞、内皮细胞等以潜伏形式释放^[26]。它在促进 HSC 激活和 MFB 转分化中发挥重要作用, 促进纤维化进展^[27-28]。TGF- β 和特异性 I 型受体结合诱导下游 SMAD 蛋白的磷酸化, 主要是 SMAD2 和 SMAD3。HSC 激活过程中 SMAD2 与 SMAD3 的激活可促进肝纤维化相关因子 α -SMA、I 型和 III 型胶原蛋白的转录, 加重肝纤维化的进展^[29]。相比之下, SMAD7 在 TGF- β /SMAD 信号通路中充当负调控因子抑制肝纤维化。Yang 等^[30]的研究发现, 复方苦参注射液靶向 SMAD7 并上调其表达, 诱导 TGF β R1 降解, 随后抑制 SMAD2 和 SMAD3 的磷酸化, 抑制激活的 HSC 中 TGF- β /SMAD2/3 信号, 提示复方苦参注射液重新平衡 TGF- β /SMAD7 信号是治疗肝纤维化和肿瘤发生的一种新策略。Mu 等^[31]研究表明, 阿魏酸作为肉桂酸的衍生物, 可通过抑制 TGF- β_1 、p-SMAD2/3 蛋白表达水平减轻 I 型胶原、 α -SMA 积累和 HSC 活化。Liu 等^[32]研究发现, 异鼠李素在 CCl₄ 和 BDL 两种模型中均可抑制 HSC 激活, 通过抑制 TGF- β_1 介导的 SMAD3 和 p38 MAPK 信号通路, 减少 ECM 形成和自噬, 保护肝纤维化。这些研究表明可通过采用 TGF- β /SMAD 信号通路合适的靶点, 特异性抑制 TGF- β 信号, 从而阻断 HSC 的活化, 减少 ECM 的沉积, 改善甚至逆转肝纤维化进程。

4 自噬在 HSC 活化中的作用

自噬是一种内源性保护系统, 即真核细胞消化自身细胞器和长寿蛋白质的代谢过程, 对发育、分化和动态平衡至关重要^[33]。研究发现^[34], 抑制自噬作用可抑制 HSC 的激活, 由于自噬与脂质降解密切相关, HSC 自噬减少导致细胞难以降解, 由此可见自噬是 HSC 活化的必要前提。据报道^[35], 3-MA 诱导的自噬抑制导致 HSC-T6 细胞在细胞周期 G2 期停滞, 随后抑制 HSC-T6 细胞的增殖, 这表明 HSC 的增殖需要自噬作用促进。研究发现^[36], 肝损伤期间, 肝窦内皮细胞选择性地丧失自噬功能会放大内皮功能障碍并通过促进急性肝损伤时的氧化应激反应激活 HSCs, 加重肝纤维化。摩擦假蛋白 3 (TRIB3) 是伪激酶家族的成员, 作为在多种应激源作用下上调的应激蛋白, 它直接与 Cargo 受体 SQSTM1 相互作用阻碍其与 MAP1LC3/LC3 的结合, 从而导致 SQSTM1 聚集并抑制自噬通量^[37]。另有发现 HSC 特异性的 SQSTM1 缺失能够激活 HSC, 促进肝纤维化, 干扰 HSC 中 TRIB3-SQSTM1 相互作用可以通过恢复部分受损的自噬通量和抑制外泌体介导的 HSC 激活减缓肝纤维化进展^[38]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是自噬在肝纤维化中发挥多功能作用的主要分子信号通路。Wu 等^[39]研究 BDL 和 CCl₄ 小鼠肝纤维化模型中 PI3K/Akt 信号通路和槲皮素的作用, 发现槲皮素显著降低自噬小体形成标志物 LC3、Beclin-1 mRNA 和蛋白质的表达, 这表明槲皮素通过 PI3K/Akt 途径减少自噬, 从而延缓肝纤维化进展。另外, Ji 等^[40]研究吉马酮 (GM) 在 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化模型和 TGF- β_1 诱导的肝纤维化细胞模型的抗纤维化作用, 发现 GM 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调节肝纤维化过程中 HSC 增殖、激活和上皮-间充质转化改善肝纤维化。因此, GM 可能作为一种有效的肝纤维化调节剂。现如今, 越来越多的证据表明, PI3K/Akt/mTOR 信号通路能够有效调节纤维化

反应,比如阻断 PI3K 信号通路可减少 I 型胶原蛋白和 mRNA 的表达^[41];抑制 Akt 可阻断肝细胞脂肪堆积、线粒体膜面积减少,并减少 Akt 蛋白质的表达^[42];机体缺乏营养下,mTOR 信号被抑制,从而允许自噬的启动加重肝纤维化^[43]。在肝纤维化的过程中,自噬参与 HSC 激活的机制引起了越来越多的关注。自噬在肝纤维化中扮演着一把双刃剑的角色,一方面自噬可通过降解 HSCs 中的脂滴为 HSCs 的活化提供能量而加剧肝纤维化;另一方面,过度自噬也可以诱导活化型 HSCs 衰老,改善肝纤维化的病理改变^[44-45]。因此,在治疗肝纤维化过程中,要充分衡量好自噬在肝纤维化的双向调节作用。

5 小结与展望

以 ECM 大量沉积为主要特征的肝纤维化是慢性肝损伤的重要病理生理结果。总而言之,肝纤维化过程十分复杂,从 HSC 活化、ECM 大量沉积到肝纤维化的发生发展均涉及了炎症反应、氧化应激、自噬等相关机制。针对这些过程中的一个环节可能不足以诱导其发生逆转。因此,掌握肝纤维化的发病机制,并将肝纤维化作为中心目标的联合治疗方法极其重要,如抗氧化剂、自噬抑制剂、免疫清除都可能成为抗纤维化的新策略。随着肝纤维化的分子机制日益阐明,针对肝纤维化发生进程的分子机制设计相应的靶向药物,有望逆转肝纤维化这一健康难题。

参考文献

- [1] Ganguly NN, Chakrabarti SS. Role of long non-coding RNAs and related epigenetic mechanisms in liver fibrosis (Review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2021, 47(3):4856. DOI: 10.3892/ijmm.2021.4856.
- [2] Wu Z, Huang S, Zheng X, et al. Regulatory long non-coding RNAs of hepatic stellate cells in liver fibrosis (Review)[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4):351. DOI:10.3892/etm.2021.9782.
- [3] Omar R, Yang J, Liu H, et al. Hepatic stellate cells in liver fibrosis and siRNA-based therapy[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2016, 172:1-37. DOI:10.1007/112_2016_6.
- [4] He Z, Yang D, Fan X, et al. The roles and mechanisms of lncRNAs in liver fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4):1482. DOI:10.3390/ijms21041482.
- [5] Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121:27-42. DOI:10.1016/j.addr.2017.05.007.
- [6] Ignat SR, Dinescu S, Hermenean A, et al. Cellular interplay as a consequence of inflammatory signals leading to liver fibrosis development[J]. Cells, 2020, 9(2):461. DOI:10.3390/cells9020461.
- [7] Xiang X, Feng D, Hwang S, et al. Interleukin-22 ameliorates acute-on-chronic liver failure by reprogramming impaired regeneration pathways in mice[J]. J Hepatol, 2020, 72(4):736-745. DOI:10.1016/j.jhep.2019.11.013.
- [8] Wu Y, Min J, Ge C, et al. Interleukin 22 in liver injury, inflammation and cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(13):2405-2413. DOI: 10.7150/ijbs.38925.
- [9] Su SB, Qin SY, Xian XL, et al. Interleukin-22 regulating Kupffer cell polarization through STAT3/Erk/Akt crosstalk pathways to attenuate

- liver fibrosis[J]. Life Sci, 2021, 264:118677. DOI:10.1016/j.lfs.2020.118677.
- [10] Kadrmas JL, Beckerle MC, Yoshigi M. Genetic analyses in mouse fibroblast and melanoma cells demonstrate novel roles for PDGF-AB ligand and PDGF receptor alpha[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):19303. DOI:10.1038/s41598-020-75774-3.
- [11] Zhang Z, Wen H, Weng J, et al. Silencing of EPCAM suppresses hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation in mice with alcoholic hepatitis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2019, 18(18):2239-2254. DOI:10.1080/15384101.2019.1642067.
- [12] Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, et al. beta-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis[J]. J Hepatol, 2015, 63(1):141-147. DOI:10.1016/j.jhep.2015.01.036.
- [13] Lv Y, Bing Q, Lv Z, et al. Imidacloprid-induced liver fibrosis in quails via activation of the TGF-beta1/Smad pathway[J]. Sci Total Environ, 2020, 705:135915. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135915.
- [14] Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-Null mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6):2061. DOI:10.3390/ijms21062061.
- [15] Yu Q, Cheng P, Wu J, et al. PPARγ/NF-κB and TGF-β1/Smad pathway are involved in the anti-fibrotic effects of levo-tetrahydropalmatine on liver fibrosis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(3):1645-1660. DOI:10.1111/jcmm.16267.
- [16] Gallego P, Luque-Sierra A, Falcon G, et al. White button mushroom extracts modulate hepatic fibrosis progression, inflammation, and oxidative stress in vitro and in LDLR-/-mice[J]. Foods, 2021, 10(8):1788. DOI:10.3390/foods10081788.
- [17] Rodriguez MJ, Sabaj M, Tolosa G, et al. Maresin-1 prevents liver fibrosis by targeting Nrf2 and NF-kappaB, reducing oxidative stress and inflammation[J]. Cells, 2021, 10(12):3406. DOI: 10.3390/cells10123406.
- [18] Li Z, Chen B, Dong W, et al. The chromatin remodeler Brg1 integrates ROS production and endothelial-mesenchymal transition to promote liver fibrosis in mice[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019, 7:245. DOI:10.3389/fcell.2019.00245.
- [19] Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) and NADPH oxidase 4 (NOX4) in the pathogenesis of the fibrotic process in systemic sclerosis: A promising therapeutic target[J]. J Clin Med, 2021, 10(20):4791. DOI: 10.3390/jcm10204791.
- [20] Chen Y, Li R, Hu N, et al. Baihe Wuyao decoction ameliorates CCl4-induced chronic liver injury and liver fibrosis in mice through blocking TGF-beta1/Smad2/3 signaling, anti-inflammation and anti-oxidation effects[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 263:113227. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113227.
- [21] Yang L, Bi L, Jin L, et al. Geniposide ameliorates liver fibrosis through reducing oxidative stress and inflammatory response, inhibiting apoptosis and modulating overall metabolism[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:772635. DOI:10.3389/fphar.2021.772635.

- [22] Mousavi K, Niknahad H, Li H, et al. The activation of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling blunts cholestasis-induced liver and kidney injury[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2021, 10(4):911-927. DOI:10.1093/toxres/tfab073.
- [23] He L, Guo C, Peng C, et al. Advances of natural activators for Nrf2 signaling pathway on cholestatic liver injury protection: A review[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 910:174447. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.174447.
- [24] Zhao J, Ran M, Yang T, et al. Bicyclol alleviates signs of BDL-induced cholestasis by regulating bile acids and autophagy-mediated HMGB1/p62/Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 686502. DOI:10.3389/fphar.2021.686502.
- [25] Khadrawy SM, Mohamed HM, Mahmoud AM. Mesenchymal stem cells ameliorate oxidative stress, inflammation, and hepatic fibrosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(2):2019-2030. DOI:10.1007/s11356-020-10637-y.
- [26] Dewidar B, Meyer C, Dooley S, et al. TGF-beta in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-Updated 2019[J]. *Cells*, 2019, 8(11):1419. DOI:10.3390/cells8111419.
- [27] Su J, Morgani SM, David CJ, et al. TGF-beta orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1[J]. *Nature*, 2020, 577(7791):566-571. DOI:10.1038/s41586-019-1897-5.
- [28] Gupta P, Sata TN, Yadav AK, et al. TGF-beta induces liver fibrosis via miRNA-181a-mediated down regulation of augmentor of liver regeneration in hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e214534. DOI:10.1371/journal.pone.0214534.
- [29] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 14(7):397-411. DOI:10.1038/nrgastro.2017.38.
- [30] Yang Y, Sun M, Li W, et al. Rebalancing TGF-beta/Smad7 signaling via compound kushen injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(7):e410. DOI:10.1002/ctm2.410.
- [31] Mu M, Zuo S, Wu RM, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF-beta/Smad signaling pathway [Corrigendum][J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1819. DOI:10.2147/DDDT.S215949.
- [32] Liu N, Feng J, Lu X, et al. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation via the TGF-beta1/Smad3 and TGF-beta1/p38 MAPK Pathways[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019:6175091. DOI:10.1155/2019/6175091.
- [33] Tao Y, Wang N, Qiu T, et al. The role of autophagy and NLRP3 inflammasome in liver fibrosis[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020:7269150. DOI:10.1155/2020/7269150.
- [34] Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4):938-946. DOI:10.1053/j.gastro.2011.12.044.
- [35] 刘曼, 何月, 张吉翔. 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤对肝星状细胞增殖活化的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(8):809-812, 817. DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.008214.
- Liu M, He Y, Zhang J. Effect of autophagy inhibitor 3-methyladenine on proliferation and activation of hepatic stellate cells[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2013, 29(8):809-812. DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.008214.
- [36] Ruat M, Chavarria L, Camprecios G, et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3):458-469. DOI:10.1016/j.jhep.2018.10.015.
- [37] Tran SC, Pham TM, Nguyen LN, et al. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus modulates the tribbles homolog 3/Akt signaling pathway for persistent viral infection[J]. *J Virol*, 2016, 90(16):7231-7247. DOI:10.1128/JVI.00326-16.
- [38] Zhang X, Zhou J, Peng D, et al. Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5):782-796. DOI:10.1080/15548627.2019.1635383.
- [39] Wu L, Zhang Q, Mo W, et al. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF-beta1/Smads and PI3K/Akt pathways[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):9289. DOI:10.1038/s41598-017-09673-5.
- [40] Ji D, Zhao Q, Qin Y, et al. Germacrone improves liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. *Cell Biology International*, 2021, 45(9):1866-1875. DOI:10.1002/cbin.11607.
- [41] Huang Y, Liu C, Zeng W, et al. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation, migration and metastasis of Hep3B cells via suppressing cyclin D1 and PI3K/AKT pathway[J]. *Bioscience Reports*, 2020, 40(1):BSR20192727. DOI:10.1042/BSR20192727.
- [42] Jung KH, Ryu Y, Lee H, et al. A novel PI3K inhibitor alleviates fibrotic responses in fibroblasts derived from Peyronie's plaques[J]. *International Journal of Oncology*, 2013, 42(6):2001-2008. DOI:10.3892/ijo.2013.1905.
- [43] Wang H, Liu Y, Wang D, et al. The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases[J]. *Cells*, 2019, 8(12):1597. DOI:10.3390/cells8121597.
- [44] Bai F, Huang Q, Nie J, et al. Trolline ameliorates liver fibrosis by inhibiting the NF-kappaB pathway, promoting HSC apoptosis and suppressing autophagy[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 44(2):436-446. DOI:10.1159/000485009.
- [45] Zhang Z, Yao Z, Zhao S, et al. Interaction between autophagy and senescence is required for dihydroartemisinin to alleviate liver fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6):e2886. DOI:10.1038/cddis.2017.255.

(收稿日期:2022-12-16)