

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 001

## 述评

**编者按** 2024年10月8日是第27个全国高血压日。为贯彻党中央关于实施健康中国战略的决策部署,落实《国务院关于实施健康中国行动的意见》《健康中国行动(2019—2030年)》《健康中国行动——心脑血管疾病防治行动实施方案(2023—2030年)》有关要求,持续推进心脑血管疾病防治工作,国家卫生健康委办公厅组织开展了2024年全国高血压日主题宣传活动,今年的宣传主题为“健康体重,理想血压”。本刊特刊发西安交通大学第一附属医院马爱群教授团队的述评文章,对高血压的治疗策略进行深入分析与探讨,以期为提高我国高血压预防、诊断、治疗水平提供可借鉴的理论依据。

## 高血压心率管理临床结果悖论 ——心率控制改善高血压治疗有结局吗?

张学丹,王西辉,马爱群

作者单位: 710038 西安, 西安医学院第二附属医院心血管内科(张学丹、王西辉); 710000 西安, 西安交通大学第一附属医院心血管内科(马爱群)

通信作者: 马爱群, E-mail: aiqun.ma@xjtx.edu.cn



**【摘要】** 流行病学研究证明心率增快是心血管疾病风险及死亡的独立危险因子,亦是高血压发病及死亡的独立危险因子。有效的心率控制(措施和目标)有望为高血压患者带来巨大获益。然而,使用 $\beta$ 受体阻滞剂降低心率并未能使得高血压患者获得额外收益。这一临床悖论值得深入探讨。

**【关键词】** 心率; 高血压病;  $\beta$ 受体阻滞剂; 伊伐布雷定

**【中图分类号】** R544.1      **【文献标识码】** A

**Paradox of clinical outcomes in hypertension heart rate management—Does controlled heart rate improve treatment outcomes for hypertension? Zhang Xuedan\*, Wang Xihui, Ma Aiqun. \*Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Shanxi Province, Xi'an 710000, China**

*Corresponding author: Ma Aiqun, 13709117138, E-mail: aiqun.ma@xjtx.edu.cn*

**【Abstract】** Epidemiological studies had shown that increased heart rate was an independent risk factor for cardiovascular disease risk and death, and an independent risk factor for hypertension and death. Effective heart rate control (measures and goals) is expected to bring significant benefits to hypertensive patients. However, using  $\beta$  receptor blockers that lower heart rate had not resulted in additional benefits for hypertensive patients. This clinical paradox deserves needs to further exploration.

**【Key words】** Heart rate; Hypertension;  $\beta$  receptor blockers; Ivabradine

20世纪40年代,美国首次报道快速心率是心血管疾病的危险因素。后续大型流行病学研究(Framingham研究)发现心率与心血管事件或全因死亡率之间存在显著关联。进一步研究数据显示,在心力衰竭(heart failure, HF)、冠心病(coronary heart disease, CHD)的心率增快人群中, $\beta$ 受体阻滞剂减慢心率可降低心血管病事件的发生,心率增快作为心血管事件治疗干预靶点一直受到人们的高度重视。

然而,使用 $\beta$ 受体阻滞剂降低心率并未能使得高

血压患者获得额外收益<sup>[1-3]</sup>。这一临床悖论是试验药物本身的问题还是控制心率不能作为高血压治疗靶点的问题,值得深入探讨。

### 1 流行病学研究

1.1 静息心率增快是心血管死亡和心血管病事件的独立危险因素  
1.1.1 心率增快是心血管死亡的独立因素:早在20世纪40年代,高心率和高血压被证明可以预测心血管疾病,但未得到重视。后续多项大样本、长时程随访

研究陆续证实静息心率 (resting heart rate, RHR) 与全因死亡率或心血管病死率之间存在正相关关系<sup>[4-5]</sup>。一项涉及 46 项研究的 Meta 分析显示<sup>[6]</sup>, 其中 40 项观察结果是全因死亡, 共纳入 1 246 203 例患者, 78 349 例死亡; 其中 29 项研究观察结果是心血管病死亡, 共纳入 848 320 例患者, 共 25 800 例出现心血管病死亡。分析显示: 较高的 RHR 与全因和心血管病死亡率的风险增加独立相关。这表明, 在一般人群中 RHR 是全因死亡率和心血管病死亡率的预测因子。人们对心率增快与心血管病死亡率之间关系的认识提高。

**1.1.2 心率增快是心血管事件的独立因素:** Mao 等<sup>[7]</sup>纳入 169 871 例年龄≥40 岁的患者, 平均随访 8.3 年, 分析发现: 男性心率≥75 次/min (beats per minute, bpm) 增加心脏疾病风险, 心率≥90 bpm 增加 CHD 和卒中风险; 女性心率≥90 bpm 增加 CHD 风险, 进一步支持心率升高与心血管疾病 (cardiovascular disease CVD, 包括 AMI、卒中、心血管疾病导致死亡) 的高发病率相关。2016 年的一篇 Meta 分析共纳入 45 项非随机前瞻性队列研究分析<sup>[8]</sup>: RHR 是 CHD、卒中、猝死和非心血管疾病的独立预测因子。当分析仅包括关于一般人群(排除高血压、糖尿病)时, RHR 是 CHD、卒中和非心血管疾病的独立预测因子, 在校正血压水平后, 这种风险仍存在。

## 1.2 静息心率与高血压及其合并症

**1.2.1 心率增快是高血压的危险因素和临床特征之一:** RHR 增快是高血压患者的常见特征, 是高血压独立预测因子。2014 年 Wang 等<sup>[9]</sup>研究纳入 101 510 例患者, 其中 31 507 例参与者无高血压、心律失常病史, 平均随访 (3.5 ± 0.9) 年, 这一组无高血压人群中发展为高血压 12 565 例 (39.88%)。在校正血压、血脂、糖尿病等因素后, RHR 增快仍然与高血压的发生率明显相关。2019 年一项涉及 9 969 例农村非高血压成人的研究<sup>[10]</sup>, 平均随访 6 年, 最终男性 797 例 (20.28%) 和女性 1 178 例 (19.51%) 发展为高血压, 分析发现高 RHR 与女性高血压发生相关, 排除性别和年龄影响, RHR 与高血压之间呈剂量反应关系, 即使剔除一些混杂因素, 如体质指数、年龄和代谢参数, 仍支持 RHR 增快增加患高血压的风险<sup>[11]</sup>。Shi 等<sup>[12]</sup>荟萃分析发现: RHR 增快与成人高血压发病风险之间存在线性正相关, RHR 每增加 10 bpm, RR 增加 9%; 与 55.5 bpm 人群比较, 符合指南建议的最低 RHR 60 bpm 和最高 RHR 100 bpm 的人患高血压的风险分别为 5% (RR, 1.05) 和 58% (RR, 1.58)。2020 年一项荟萃分析纳入 12 项独立临床研究<sup>[13]</sup>, 人群共入选 79 399 例, 其中高

血压 26 380 例, 分析发现, RHR 与高血压之间存在显著的正相关。因此降低 RHR 将使心率增快的高血压人群受益<sup>[14]</sup>。

**1.2.2 心率增快是高血压患者死亡率独立危险因素:** 在一项 29 640 例血压正常且不合并相关危险因素的男性和 60 343 例高血压男性人群的研究中<sup>[15]</sup>, 平均随访 14 年的死亡数据分析证实, 心率增快 (>80 bpm) 与心血管病死亡率之间具有显著相关性, <55 岁受试者的校正相对风险为 1.48, ≥55 岁受试者的校正相对风险为 1.32。Zhao 等<sup>[16]</sup>研究纳入高血压患者 46 561 例, 平均随访 (9.25 ± 1.63) 年, 死亡 4 751 例, 进一步支持心率增快与高血压患者死亡增加相关。事实上, 2021 年中国高血压患者心率管理多学科专家共识<sup>[17]</sup>和 2018 年 ESC/ESH 动脉高血压管理指南<sup>[18]</sup>指出, RHR >80 bpm 增加高血压患者心血管风险, 支持高血压患者的心率管理。

总之, 流行病学研究证明心率增快是心血管疾病风险及死亡的独立危险因子; 心率增快是高血压临床特征之一, 也是高血压死亡的危险因素, 且这两个因素似乎对心血管风险有叠加影响。有效的心率控制(措施和目标)有望为高血压患者带来巨大获益。

## 2 静息心率增快对心血管损害机制

最新的高血压指南已经认识到心率增快作为一个独立的心血管危险因素的重要性。一个不可回避的问题是: RHR 增快对疾病事件的影响是交感神经系统 (sympathetic nervous system, SNS) 激活间接引起, 还是 RHR 直接作用?

**2.1 心血管事件可能是 SNS 过度激活引起** 几项研究证明: 与健康组比较, 高血压患者心率增快与 SNS 过度驱动的程度平行<sup>[19]</sup>。Esler 等<sup>[20]</sup>采用同位素稀释法测定未服用药物的 30 例原发性高血压患者和 48 例血压正常的健康参与者局部去甲肾上腺素溢出率和肾上腺素分泌率, 发现高血压患者的心率与心脏去甲肾上腺素溢出直接相关 ( $r = 0.82$ )。Grassi 等<sup>[21]</sup>在未经治疗的 193 例高血压患者中, 测量血压、RHR、静脉血浆去甲肾上腺素(高效液相色谱法)和肌肉交感神经流量(显微神经造影法), 发现 RHR 与静脉血浆去甲肾上腺素或肌肉交感神经流量之间存在显著相关性, 证实了心率 >80 bpm 的高血压患者存在 SNS 过度兴奋, 心率增快因此被认为是 SNS 激活的一个指标。2021 年 Grassi<sup>[22]</sup>总结现有资料发现高血压状态下, 遗传、SNS 激活、免疫系统活动、炎性反应过程等存在相关性, SNS 活动是上述多种心血管损伤机制相互作用的桥梁和纽带, 以多种方式促进高血压和动脉粥样硬

化的发展。

**2.2 心率增快可能是动脉粥样硬化病变形成和心血管事件发生的直接因素** 心率增快直接引起心血管损伤,通过消融窦房结降低心率可延缓灵长类动物脂质诱导的动脉粥样硬化形成。研究发现:起搏引起心率增快会显著损害大鼠动脉顺应性和扩张性。在正常血压和自发性高血压大鼠中,使用伊伐布雷定(Ivabradine, IVA)选择性降低心率,可显著降低胸主动脉壁厚度<sup>[23]</sup>,表明心率增快可独立于 SNS 兴奋而引起血管损伤。慢性 HF 药物治疗的荟萃分析显示:心率降低的幅度与 HF 的预后直接相关<sup>[24]</sup>,进一步证实心率在 HF 的病理生理学中起着重要作用。BEAUTIFUL 试验<sup>[25]</sup>证实 IVA 可降低 CHD 患者主要终点事件发生率及心肌梗死再住院率,进一步证实心率的直接损伤。

### 3 降低心率治疗对心血管病事件的影响

$\beta$  受体阻滞剂和 IVA 在心血管疾病治疗中获得显著成效,可能与降低心率有关。大量研究证明  $\beta$  受体阻滞剂用于射血分数减低型 HF (heart failure of reduced ejection fraction, HFrEF)、CHD 均可减少死亡率和住院率。但是,在相同降压幅度的前提下,尽管  $\beta$  受体阻滞剂明显降低心率,高血压患者并未能从降低心率获益,甚至心血管病事件高于血管紧张素受体阻滞剂(angiotensin receptor blocker, ARB)、钙通道拮抗剂(calcium channel blockers, CCB)治疗组。因此, $\beta$  受体阻滞剂用于心率增快的高血压人群降低心率的治疗措施存在争议。同样,IVA 可通过降低心率改善 HFrEF、CHD 预后,但用 IVA 降低心率增快的正常人群及高血压人群心率是否获益,有待进一步研究。

**3.1  $\beta$  受体阻滞剂降低高血压患者心率,临床结果令人失望** 在 LIFE 研究<sup>[26]</sup>中(氯沙坦干预降低高血压终点,对照药物  $\beta$  受体阻滞剂,官方资助,无药物厂家参与),纳入高血压患者 9 193 例,平均随访 4.8 年发现:氯沙坦组和阿替洛尔组的血压分别下降( $30.2 \pm 18.5$ )/( $16.6 \pm 10.1$ ) mmHg 和( $29.1 \pm 19.2$ )/( $16.8 \pm 10.1$ ) mmHg。在随访结束时,氯沙坦组和阿替洛尔组平均血压分别为( $144.1 \pm 17.1$ )/( $81.3 \pm 9.6$ ) mmHg 和( $145.4 \pm 16.4$ )/( $80.9 \pm 9.6$ ) mmHg。阿替洛尔组患者的心率下降幅度大于氯沙坦组[分别为( $-7.7 \pm 12.8$ ) bpm 和( $-1.8 \pm 12.0$ ) bpm,  $P < 0.001$ ]。但氯沙坦治疗组发生主要终点事件(primary composite endpoint, CEP)包括非致死性心肌梗死、非致死性卒中和心血管疾病死亡的风险显著低于阿替洛尔治疗组。将年龄进一步细分为<60岁、60~65岁、>65~69岁、>69~74岁、≥74岁组分析发现:>69~74岁

和≥74岁,氯沙坦治疗组发生 CEP 的风险显著低于阿替洛尔治疗组<sup>[1]</sup>。尽管 2 组降低血压相同,阿替洛尔组平均心率下降幅度大于氯沙坦组 6 bpm,但阿替洛尔组未能从心率下降中获益,心血管事件反而增加,这是美国高血压指南将  $\beta$  受体阻滞剂从一线降压药移除的主要依据。

在 ASCOT-BPLA 研究中<sup>[2]</sup>,纳入 19 257 例年龄 40~79 岁高血压患者,且合并至少 3 个心血管危险因素(男性,年龄≥55 岁,微量白蛋白尿或蛋白尿,吸烟,总胆固醇与高密度脂蛋白比≥6,早发冠心病家族史,左心室肥厚,其他特定心电图异常,2 型糖尿病,外周动脉疾病,既往脑卒中或短暂性脑缺血发作),分析氨氯地平 5~10 mg 加培哚普利 4~8 mg( $n = 9\,639$ )或阿替洛尔 50~100 mg 加氢氟噻嗪 1.25~2.5 mg( $n = 9\,618$ ),主要终点是卒中、心血管事件和全因死亡,平均随访 5.5 年,共 106 153 人年的观察发现<sup>[3]</sup>:与氨氯地平组比较,尽管阿替洛尔治疗组总体心率平均下降大于 10 bpm 以上[分别为( $12.0 \pm 13.7$ ) bpm 和( $1.3 \pm 12.1$ ) bpm],但卒中、心血管事件发生率、心血管死亡和全因死亡均没有进一步改善,反而出现更多的新发糖尿病。

上述研究表明,心率增快的高血压人群不能从应用  $\beta$  受体阻滞剂降低心率中额外获益。其结果与临床流行病学相悖,可能的原因有两个:一是降低心率不能作为心率增快的高血压患者预防心血管事件的治疗靶点,但从临床医学治疗靶点选择来看,临床流行病学是最可靠的靶点选择依据。因此认为该原因的可能性很小;二是  $\beta$  受体阻滞剂不能作为心率增快的高血压患者降低心率的措施,其原因有待进一步研究。因此,寻找降低心率增快高血压患者心率的措施是临床亟待解决的问题。

### 3.2 IVA 有望作为高血压患者降低心率的候选措施

一种“纯降心率药物”对确定心率降低本身的益处非常有意义,而与交感神经活动无关。窦房结中肌细胞以动作电位缓慢舒张去极化为特征,该期负责窦房结自主性电活动。If 早在 1979 年被描述为内向电流,由  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  离子通过跨膜超极化激活环核苷酸(hyperpolarization activated cyclic nucleotide, HCN)通道产生,该通道在超极化时,在动作电位 -50~-40 mV 时被激活<sup>[27]</sup>。IVA 是 HCN 通道拮抗剂,特异性结合 HCN 通道内结合位点,控制“If”电流,抑制阳离子转运,但不影响其他电流 T 型和 L 型钙通道(肌力)及 IK1/K2(动作电位持续时间)<sup>[28]</sup>,通过降低动作电位去极化期斜率减慢心率,从而实现在不改变心肌收缩

力或心脏动作电位持续时间的情况下降低心率。IVA 降低 If 电流具有使用依赖性,即心率越快降低幅度越大<sup>[29]</sup>。因此,IVA 独立于交感神经系统,选择性降低 HR 可能具有治疗价值。

**3.2.1 心力衰竭:**β受体阻滞剂为慢性 HF 药物治疗的基石,然而在临床实践中,有 2/3~4/5 的 HF 患者 β受体阻滞剂的使用未能达到目标剂量<sup>[30]</sup>。

2010 年,首个单纯降低心率对 HF 人群结局影响试验——SHIFT 试验结果发布<sup>[31]</sup>,课题设计是在 β受体阻滞剂治疗背景下,分析 6 505 例窦性心律 ≥70 bpm, NYHA 心功能 II ~ IV 级, 左心室射血分数 (left-ventricular ejection fraction, LVEF) ≤35%, 分别用 IVA 和安慰剂干预,分析发现:使用 IVA 可使这类患者的主要终点事件(心血管病死亡)减少(HR 0.82,  $P < 0.001$ )和心力衰竭再住院率降低(HR 0.74,  $P < 0.001$ )。在 28 d 时,与安慰剂组相比较, IVA 组心率更低,发生主要复合终点事件更少<sup>[24]</sup>。J-SHIF 研究<sup>[32]</sup>(LVEF ≤35%、RHR ≥75 bpm)也显示 IVA 有改善心血管病死亡和 HF 复发率的优势, IVA 降低心率对改善 HF 临床结局的重要性,进一步支持 HR 降低的幅度决定结果<sup>[33]</sup>。鉴于这些发现,在更新的 HF 指南中<sup>[34]</sup>建议使用 IVA 减少 HF 患者(窦性心律 ≥70 bpm、NYHA II ~ III 级、LVEF ≤35%, 且正接受最大 β受体阻滞剂耐受剂量)住院率。2021 年 JCS/JHFS HF 诊断及治疗指南推荐<sup>[35]</sup>:对 LVEF <40% 和心率 ≥75 bpm 的急性和慢性 HF 患者推荐联合使用 IVA。

**3.2.2 冠状动脉疾病:**心率增快会增加心肌耗氧量,减少舒张期心肌灌注时间,进一步导致冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD) 患者心肌氧需求和供应失衡,导致缺血加剧,引起冠状动脉粥样硬化进展加速,也导致冠状动脉粥样硬化斑块破裂<sup>[36]</sup>。BEAUTIFUL 试验<sup>[25]</sup>(首个单纯降低心率对 CHD 人群结局影响试验)纳入 10 917 例左心室功能不全(LVEF ≤40%)的 CHD 患者,主要研究终点:心血管病死亡、急性心肌梗死入院及新发或恶化 HF 入院。在心率 ≥70 bpm 亚组中,使用 IVA( $n = 5\,479$ , 5.0 或 7.5 mg bid)治疗,急性心肌梗死住院率(HR 0.64,  $P = 0.001$ )、急性心肌梗死或不稳定型心绞痛住院率(HR 0.78,  $P = 0.023$ )和冠状动脉血运重建率(HR 0.70,  $P = 0.016$ )显著降低。平均随访 18 个月,712 例心率 ≥70 bpm: IVA 可降低主要终点事件发生率(HR 0.69,  $P = 0.06$ )及心肌梗死再住院率(HR 0.27,  $P = 0.002$ )。另一研究分析<sup>[37]</sup>:对已使用 β受体阻滞剂治疗,但心率仍 >70 bpm 的 CHD 患者, IVA 进一步降低心率,使 LVEF、舒张灌注

时间和心肌灌注指数显著改善。《2019 年 ESC 慢性冠状动脉综合征指南》推荐<sup>[38]</sup>: IVA 作为二线治疗药物用于减少心绞痛发作频率和提高运动耐力。

**3.2.3 高血压病:**心率降低有益于高血压患者降压及改善靶器官损害。Albaladejo 等<sup>[23]</sup>在高血压大鼠模型中首次证实:IVA 降低心率可逆转大动脉结构和功能,并降低舒张压。Jozwiak 等<sup>[39]</sup>用慢性血管紧张素Ⅱ诱导的 8 例高血压猪模型证明 IVA 降低 HR 改善高血压靶器官损伤。Simko 等<sup>[40]</sup>用 L-NAME 诱导 40 只高血压雄性 Wistar 鼠, IVA 降低收缩压和 HR, 改善左心室功能。Baka 等<sup>[41]</sup>研究也证实 IVA 具有降压作用。然而,目前缺乏关于 IVA 降压作用及降低心率后对高血压患者和正常人群心血管事件影响的临床研究。

#### 4 目标心率

心率降低会增加舒张末期容积,从而通过 Frank-Starling 机制增加每搏出量。由于心率降低,心肌能量消耗降低,逆转心脏重构,预防心力衰竭<sup>[42]</sup>;同时引起动脉血流及切变应力方向的变化,进而直接逆转心脏及血管损伤。理想心率是最小心肌耗氧量与最大心输出量的平衡。在 LIFE 等治疗心率增快高血压患者的试验中<sup>[29]</sup>, RHR 增快的临界值是基于上下限五分位数,从 79~84 bpm; 在许多其他临床研究中, 临界值 80 bpm 也是随意选择的<sup>[43]</sup>。Grassi 等<sup>[21]</sup>发现 RHR > 80 bpm 交感神经活动增加 30%~40%, 进而支持高血压患者 RHR 的临界值 80 bpm。根据最新的欧洲及中国指南<sup>[17-18]</sup>, 推荐 RHR > 80 bpm 作为心率增快高血压患者心血管疾病的干预切点,对于亚洲人群建议所有高血压患者的目标心率 <70 bpm, 合并 CHD 患者的目标心率 <65 bpm。但具体的干预切点及目标心率有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Ruwald ACH, Westgaard B, Sehestedt T, et al. Losartan versus atenolol-based antihypertensive treatment reduces cardiovascular events especially well in elderly patients: The losartan intervention for endpoint reduction in hypertension (LIFE) study [J]. Journal of Hypertension, 2012, 30(6):1252-1259. DOI:10.1097/HJH.0b013e328352f1f6.
- [2] Dahlöf B, Sever PS, Poulter NR, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): A multicentre randomised controlled trial [J]. The Lancet, 2005, 366 (9489):895-906. DOI:10.1016/S0140-6736(05)67185-1.
- [3] Poulter NR, Dobson JE, Sever PS, et al. Baseline heart rate, antihypertensive treatment, and prevention of cardiovascular outcomes in ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial) [J]. Journal

- of the American College of Cardiology, 2009, 54 ( 13 ) : 1154-1161. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.04.087.
- [4] Jensen MT, Suadicani P, Hein HO, et al. Elevated resting heart rate, physical fitness and all-cause mortality: A 16-year follow-up in the Copenhagen Male Study [ J ]. Heart, 2013, 99 ( 12 ) : 882-887. DOI: 10.1136/heartjnl-2012-303375.
- [5] Tverdal A, Hjelvik V, Selmer R. Heart rate and mortality from cardiovascular causes: A 12 year follow-up study of 379 843 men and women aged 40-45 years [ J ]. European Heart Journal, 2008, 29 ( 22 ) : 2772-2781. DOI: 10.1093/eurheartj/ehn435.
- [6] Zhang D, Shen X, Qi X. Resting heart rate and all-cause and cardiovascular mortality in the general population: A meta-analysis [ J ]. CMAJ, 2016, 188 ( 3 ) : E53-E63. DOI: 10.1503/cmaj.150535.
- [7] Mao Q, Huang JF, Lu X, et al. Heart rate influence on incidence of cardiovascular disease among adults in China [ J ]. International Journal of Epidemiology, 2010, 39 ( 6 ) : 1638-1646. DOI: 10.1093/ije/dyq119.
- [8] Zhang D, Wang W, Li F. Association between resting heart rate and coronary artery disease, stroke, sudden death and noncardiovascular diseases: A meta-analysis [ J ]. CMAJ, 2016, 188 ( 15 ) : E384-E392. DOI: 10.1503/cmaj.160050.
- [9] Wang A, Liu X, Guo X, et al. Resting heart rate and risk of hypertension: Results of the Kailuan cohort study [ J ]. Journal of Hypertension, 2014, 32 ( 8 ) : 1600-1605. DOI: 10.1097/HJH.000000000000230.
- [10] Zhao Y, Qin P, Sun H, et al. Resting heart rate and its dynamic change and the risk of hypertension: The Rural Chinese Cohort Study [ J ]. Journal of Human Hypertension, 2020, 34 ( 7 ) : 528-535. DOI: 10.1038/s41371-019-0259-y.
- [11] Aladin AI, Al Rifai M, Rasool SH, et al. The association of resting heart rate and incident hypertension: the Henry Ford Hospital Exercise Testing ( FIT ) Project [ J ]. American Journal of Hypertension, 2016, 29 ( 2 ) : 251-257. DOI: 10.1093/ajh/hpv095.
- [12] Shi Y, Zhou W, Liu X, et al. Resting heart rate and the risk of hypertension and heart failure: A dose-response meta-analysis of prospective studies [ J ]. Journal of Hypertension, 2018, 36 ( 5 ) : 995-1004. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001627.
- [13] Shen L, Wang Y, Jiang X, et al. Dose-response association of resting heart rate and hypertension in adults: A systematic review and meta-analysis of cohort studies [ J ]. Medicine, 2020, 99 ( 10 ) : e19401. DOI: 10.1097/MD.00000000000019401.
- [14] Palatini P. Resting heart rate as a cardiovascular risk factor in hypertensive patients: An update [ J ]. American Journal of Hypertension, 2021, 34 ( 4 ) : 307-317. DOI: 10.1093/ajh/hpaal187.
- [15] Thomas F, Rudnicki A, Bacri AM, et al. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors [ J ]. Hypertension, 2001, 37 ( 5 ) : 1256-1261. DOI: 10.1161/01.hyp.37.5.1256.
- [16] Zhao MX, Zhao Q, Zheng M, et al. Effect of resting heart rate on the risk of all-cause death in Chinese patients with hypertension: Analysis of the Kailuan follow-up study [ J ]. BMJ open, 2020, 10 ( 3 ) : e032699. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-032699.
- [17] 中国专家共识组. 中国高血压患者心率管理多学科专家共识 [ J ]. 中国全科医学, 2021, 24 ( 20 ) : 2501-2507, 2519. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2021.00.595.
- [18] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology ( ESC ) and the European Society of Hypertension ( ESH ) [ J ]. J Hypertens, 2018, 36 ( 10 ) : 1953-2041. DOI: 10.1097/JHH.0000000000001940.
- [19] Mancia G, Masi S, Palatini P, et al. Elevated heart rate and cardiovascular risk in hypertension [ J ]. Journal of Hypertension, 2021, 39 ( 6 ) : 1060-1069. DOI: 10.1097/JHH.0000000000002760.
- [20] Esler M, Lambert G, Esler D, et al. Evaluation of elevated heart rate as a sympathetic nervous system biomarker in essential hypertension [ J ]. Journal of Hypertension, 2020, 38 ( 8 ) : 1488-1495. DOI: 10.1097/JHH.0000000000002407.
- [21] Grassi G, Quartu-Trevano F, Seravalle G, et al. Association between the European Society of Cardiology/European Society of Hypertension heart rate thresholds for cardiovascular risk and neuroadrenergic markers [ J ]. Hypertension, 2020, 76 ( 2 ) : 577-582. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14804.
- [22] Grassi G. The sympathetic nervous system in hypertension: roadmap update of a long journey [ J ]. American Journal of Hypertension, 2021, 34 ( 12 ) : 1247-1254. DOI: 10.1093/ajh/hpab124.
- [23] Albaladejo P, Carusí A, Apartian A, et al. Effect of chronic heart rate reduction with ivabradine on carotid and aortic structure and function in normotensive and hypertensive rats [ J ]. Journal of Vascular Research, 2003, 40 ( 4 ) : 320-328. DOI: 10.1159/000072696.
- [24] Böhm M, Swedberg K, Komajda M, et al. Heart rate as a risk factor in chronic heart failure ( SHIFT ): The association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial [ J ]. The Lancet, 2010, 376 ( 9744 ) : 886-894. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61259-7.
- [25] Fox K, Ford I, Steg PG, et al. Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction ( BEAUTIFUL ): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [ J ]. The Lancet, 2008, 372 ( 9641 ) : 807-816. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61170-8.
- [26] Sica DA, Weber M. The losartan intervention for endpoint reduction ( LIFE ) trial—have angiotensin-receptor blockers come of age? [ J ]. The Journal of Clinical Hypertension, 2002, 4 ( 4 ) : 301-305. DOI: 10.1111/j.1524-6175.2002.01099.x.
- [27] Chen C, Kaur G, Mehta PK, et al. Ivabradine in cardiovascular disease management revisited: A review [ J ]. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2021, 35 ( 5 ) : 1045-1056. DOI: 10.1007/s10557-020-07124-4.
- [28] Ide T, Ohtani K, Higo T, et al. Ivabradine for the treatment of cardiovascular diseases [ J ]. Circulation Journal, 2019, 83 ( 2 ) : 252-260. DOI: 10.1253/circj.CJ-18-1184.
- [29] Postea O, Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets [ J ]. Nature Reviews Drug Discovery, 2011, 10 ( 12 ) : 903-914. DOI: 10.1038/nrd3576.
- [30] Maggioni AP, Dahlström U, Filippatos G, et al. EURObservational research programme: The heart failure pilot survey ( ESC-HF Pilot )

- [J]. European Journal of Heart Failure, 2010, 12 (10) :1076-1084. DOI:10.1093/eurjhf/hfq154.
- [31] Swedberg K, Komajda M, Böhm M, et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): A randomised placebo-controlled study [J]. The Lancet, 2010, 376 (9744) :875-885. DOI:10.1016/S0140-6736(10)61198-1.
- [32] Tsutsui H, Momomura S, Yamashina A, et al. Heart rate control with if inhibitor, ivabradine, in Japanese patients with chronic heart failure-a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study [J]. Circulation Journal, 2016, 80 (3) :668-676. DOI:10.1253/circj.CJ-15-1112.
- [33] Swedberg K, Komajda M, Böhm M, et al. Effects on outcomes of heart rate reduction by ivabradine in patients with congestive heart failure: is there an influence of beta-blocker dose? Findings from the SHIFT (Systolic Heart failure treatment with the If inhibitor ivabradine Trial) study [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2012, 59 (22) :1938-1945. DOI:10.1016/j.jacc.2012.01.020.
- [34] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America [J]. Circulation, 2017, 136 (6) :e137-e161. DOI:10.1161/CIR.0000000000000509.
- [35] Tsutsui H, Ide T, Ito H, et al. JCS/JHFS 2021 guideline focused update on diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. Circulation Journal, 2021, 85 (12) :2252-2291. DOI:10.1253/circj.CJ-21-0431.
- [36] Fox K, Ford I, Steg PG, et al. Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): A subgroup analysis of a randomised controlled trial [J]. The Lancet, 2008, 372 (9641) :817-821. DOI:10.1016/S0140-6736(08)61171-X.
- [37] Dillinger JG, Maher V, Vitale C, et al. Impact of ivabradine on central aortic blood pressure and myocardial perfusion in patients with stable coronary artery disease [J]. Hypertension, 2015, 66 (6) :1138-1144. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06091.
- [38] Saraste A, Barbato E, Capodanno D, et al. Imaging in ESC clinical guidelines: chronic coronary syndromes [J]. Eur Heart J Cardiovascular Imaging, 2019, 20 (11) :1187-1197. DOI:10.1093/ehjci/jez219.
- [39] Jozwiak M, Melka J, Rienzo M, et al. Ivabradine improves left ventricular twist and untwist during chronic hypertension [J]. International Journal of Cardiology, 2018, 252 :175-180. DOI:10.1016/j.ijcard.2017.11.049.
- [40] Simko F, Baka T, Poglitsch M, et al. Effect of ivabradine on a hypertensive heart and the renin-angiotensin-aldosterone system in L-NAME-induced hypertension [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 (10) :3017. DOI:10.3390/ijms19103017.
- [41] Baka T, Simko F. Ivabradine reversed nondipping heart rate in rats with l-NAME-induced hypertension [J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2019, 46 (6) :607-610. DOI:10.1111/1440-1681.13075.
- [42] Imamura T, Kinugawa K. Optimal heart rate modulation using ivabradine [J]. International Heart Journal, 2021, 62 (4) :717-721. DOI:10.1536/ihj.21-355.
- [43] Palatini P, Rosei EA, Casiglia E, et al. Management of the hypertensive patient with elevated heart rate: Statement of the Second Consensus Conference endorsed by the European Society of Hypertension [J]. Journal of Hypertension, 2016, 34 (5) :813-821. DOI:10.1097/HJH.0000000000000865.

(收稿日期:2024-04-01)

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》近年组织策划了“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。2024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。

投稿邮箱:ynbzz@163.com

投稿系统:<https://ynbz.cbpt.cnki.net>

联系电话:(0311)85901735

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 002

PCR 技术与肿瘤

# $\beta$ -氨基丙腈通过抑制赖氨酰氧化酶减弱低氧诱导的非小细胞肺癌转移侵袭

王楷, 王聪剑, 鞠雪涛, 焦振华, 喻钧

基金项目: 国家自然科学基金(81902347)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸外科

通信作者: 喻钧, E-mail: junyu2018@hotmail.com



**【摘要】 目的** 探讨  $\beta$ -氨基丙腈( $\beta$ -APN)通过抑制赖氨酰氧化酶(LOX)减弱低氧诱导的非小细胞肺癌(NSCLC)转移侵袭的作用及其机制。**方法** 低氧状态对 NSCLC 细胞 LOX 表达及催化活性的实验:将 A549、SPCA1 细胞系各分为常氧组、低氧 12 h 组、低氧 24 h 组; $\beta$ -APN 介导 LOX 失活导致 NSCLC 细胞迁移侵袭能力及上皮-间质转化(EMT)相关分子表达变化的实验:将 A549、SPCA1 细胞系分常氧组、低氧组、低氧 +  $\beta$ -APN 组。运用荧光法检测 2 种细胞 LOX 活性,采用逆转录及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、LOX、上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 基因表达情况,运用 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平。利用 Transwell 试验检测 NSCLC 细胞的转移侵袭能力。**结果** 与常氧组比较,低氧 12 h 组和低氧 24 h 组 A549 及 SPCA1 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、LOX mRNA 表达水平显著上调( $P < 0.01$ ),HIF-1 $\alpha$ 、LOX 蛋白水平显著上调( $P < 0.01$ ),LOX 酶活性显著增强( $P < 0.01$ )。与常氧组比较,低氧组 A549 及 SPCA1 细胞系的迁移能力和侵袭能力增强;与低氧组比较,低氧 +  $\beta$ -APN 组均显著减弱( $P < 0.01$ )。与常氧组比较,低氧组中 E-cadherin mRNA 的表达水平下降,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平上升;与低氧组比较,低氧 +  $\beta$ -APN 组 E-cadherin mRNA 的表达水平上升,N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 的表达水平下降( $P < 0.01$ )。与常氧组比较,低氧组 E-cadherin 蛋白水平下降及 N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平上升;与低氧组比较,低氧 +  $\beta$ -APN 组 E-cadherin 的蛋白水平上升,N-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白水平下降( $P < 0.01$ )。**结论**  $\beta$ -APN 可通过抑制 LOX 酶减弱低氧诱导的 NSCLC 转移侵袭。

**【关键词】** 非小细胞肺癌; $\beta$ -氨基丙腈;赖氨酰氧化酶;侵袭;迁移;作用机制

**【中图分类号】** R734.2

**【文献标识码】** A

**Lysyl oxidase inhibition via  $\beta$ aminopropionitrile attenuates hypoxia induced migration and invasion of non-small cell lung cancer cells** Wang Kai, Wang Congjian, Ju Xuetao, Jiao Zhenhua, Yu Jun. Department of Thoracic Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Province, Wuhan 430030, China

**Funding program:** National Natural Science Foundation of China(81902347)

**Corresponding author:** Yu Jun, E-mail: junyu2018@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and mechanism of aminopropionitrile ( $\beta$ APN) on hypoxia induced metastasis and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) by inhibiting lysyl oxidase (LOX). **Methods** Experiments on the expression and catalytic activity of LOX in NSCLC cells under hypoxia state: A549 and SPCA1 cell lines were divided into normal oxygen group, hypoxia 12h group and hypoxia 24h group. Experiments on changes of NSCLC cell migration and invasion ability and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecular expression induced by  $\beta$ APN mediated LOX inactivation: A549 and SPCA1 cell lines were divided into normal oxygen group, hypoxia group, hypoxia +  $\beta$ APN group. LOX activity of the two cells was detected by fluorescence assay. The expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ), LOX, epithelial cadherin (E-cadherin), neural cadherin (N-cadherin), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) genes were detected by reverse transcription and quantitative real time PCR (qRT PCR). The protein expression levels of E-cadherin, N-cadherin, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot. Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of NSCLC cells. **Results** Compared with normoxia group, the expression levels of HIF-1 $\alpha$

mRNA and LOX mRNA in A549 and SPCA1 cells in hypoxia 12h and hypoxia 24h group were significantly up regulated ( $P < 0.01$ ), HIF 1 $\alpha$  protein and LOX protein were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ), and LOX enzyme activity were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with normoxia group, the migration and invasion ability of A549 and SPCA1 cell lines in hypoxia group were enhanced, while all significantly decreased in hypoxia +  $\beta$ -APN group ( $P < 0.01$ ). Compared with normoxia group, the expression level of E cadherin mRNA in hypoxia group was decreased, and the expression levels of N cadherin mRNA, MMP-2 mRNA and MMP-9 mRNA were increased, while the expression level of E cadherin mRNA increased, and the expression levels of N cadherin mRNA, MMP-2 mRNA and MMP-9 mRNA decreased in hypoxia +  $\beta$ -APN group ( $P < 0.01$ ). Compared with normoxia group, the expression of E cadherin protein decreased and the expression of N cadherin, MMP2 and MMP9 protein increased in the hypoxia group, while the expression levels of N cadherin, MMP-2 and MMP-9 protein decreased, E cadherin protein was increased in hypoxia +  $\beta$ -APN group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion**  $\beta$ -APN can attenuate hypoxic induced migration and invasion of NSCLC by inhibiting LOX enzyme.

**[Key words]** Non small cell lung cancer;  $\beta$ -aminopropionitrile; Lysyl oxidase; Invasion; Migration; Mechanism

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 在全球范围内的癌症死因中长期居于首要位置<sup>[1]</sup>。尽管近几年外科手术、放化疗及靶向治疗在临床中有所突破,但 NSCLC 患者的 5 年生存率也仅有 15%<sup>[2]</sup>。治疗失败的常见原因是肿瘤的局部复发及远处转移。因此,阐明 NSCLC 转移侵袭机制、寻找改善 NSCLC 患者生存率的精确治疗目标是目前首要的工作。实体肿瘤的特征之一是低氧供状态,越来越多的证据表明肿瘤内部的低氧状态可促进包括肿瘤细胞侵袭、转移、附着及血管生成在内的肿瘤活动<sup>[3-4]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 是由低氧状态下诱导产生的一种关键转录因子,这种因子可通过激活多种下游基因如赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 而影响肿瘤生长过程<sup>[5]</sup>。LOX 是一种铜依赖性胺氧化酶,其主要作用是维系胞外基质结构稳定及保持结缔组织强度<sup>[6]</sup>。这种酶最初以 50 kD 的酶原形式分泌到细胞外环境中。随后在胞外经骨形态发生蛋白 1 (bone morphogenetic protein-1, BMP-1) 分解为成熟的 32 kD 的 LOX 蛋白和 18 kD 的前肽。除了胞外基质重塑功能外,许多研究报道低氧诱导产生的 LOX 酶也参与到肿瘤生成过程中,如介导肿瘤的转移侵袭及血管生成<sup>[7-8]</sup>。此前有报道在 NSCLC 中 LOX 的过表达会促进肿瘤发展, LOX 可作为 HIF-1 $\alpha$  信号通路上的下游信号分子而发挥促瘤作用<sup>[9]</sup>。在本研究中,假设在体外实验中低氧诱导的 LOX 上调会促进 NSCLC 转移与侵袭,同时进一步研究 LOX 酶抑制剂  $\beta$ -氨基丙腈 ( $\beta$ -APN) 的抗瘤机制,报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 (1) 细胞: 肺腺癌细胞系 A549、SPCA1 购自中国科学院细胞库。(2) 试剂: 胎牛血清、RPMI-1640 培养基、Fast SYBR 预混液购自美国赛默飞公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自中国武汉博

斯特生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶、 $\beta$ -APN 购自美国默克西格玛公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 抗体 HIF-1 $\alpha$ 、LOX、E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9、 $\beta$ -actin、辣根过氧化物酶结合二级抗体 (山羊抗兔和山羊抗小鼠) 购自 Jackson ImmunologResearch 实验室。(3) 仪器: Thermo-37 型 CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国赛默飞公司; Pro-Ox 110 精密三气培养箱购自美国 Biospherix 公司; 分光光度计购自美国 Nanodrop 公司; SuperScript 第一链合成系统购自美国 Invitrogen 公司; 荧光阅读器 ABI-steplate 系统购自美国 Applied Bio-systems 公司。

1.2 实验方法 本实验于 2023 年 9 月—2024 年 1 月在华中科技大学同济医学院科研大楼实验室完成。

1.2.1 细胞培养与氧气夺获:(1) 在探讨低氧状态对 NSCLC 细胞 LOX 表达及催化活性的实验中, 将 A549、SPCA1 细胞系分为常氧组、低氧 12 h 组、低氧 24 h 组, 常氧组细胞保存在含有 10% FCS 和 100 ng/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养基中, 于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养, 低氧 12 h 组和低氧 24 h 组细胞在上述培养基中于 37℃ 下, 在 1% 氧气、5% 二氧化碳和 94% 氮气下培养 12 h 和 24 h。(2) 在探讨  $\beta$ -APN 介导 LOX 失活导致 NSCLC 细胞迁移、侵袭能力及上皮—间质转化 (EMT) 相关分子表达变化的实验中, 将 A549、SPCA1 细胞系分为常氧组、低氧组、低氧 +  $\beta$ -APN 组, 低氧组仅置于低氧条件下培养, 低氧 +  $\beta$ -APN 组提前给予  $\beta$ -APN 然后置于低氧条件下培养。

1.2.2 LOX 活性测定: 用荧光法测定 LOX 的催化活性。无酚红 RPMI-1640 中的 NSCLC 细胞在常氧或缺氧条件下培养。收集条件培养基的上清液, 使用 Bradford 分析试剂盒测定上清液的蛋白质浓度。然后, 将 100  $\mu$ l 上清液与 400  $\mu$ l 反应缓冲液 [1.2 mol/L 尿素、0.05 mol/L 硼酸钠 (pH 8.2) 与 1 单位/ml 辣根过氧化

物酶、10 μmol/L Amplex red 和 10 mmol/L 二氨基戊烷]混合,并在37°C下培养30 min。为了抑制LOX活性,则在混合培养物中加入1 000 μmol/L β-APN。样品在37°C下孵育30 min,置于冰上,然后在560 nm的激发波长下记录,发射波长为590 nm。通过计算有无β-APN的样品之间荧光强度的差异来评估LOX催化活性,并将每个结果归一化为细胞总蛋白。

**1.2.3 RNA分离、逆转录及qRT-PCR检测:**用Trizol试剂提取各个细胞系总RNA。用分光光度计测量RNA浓度。使用1 μg RNA进行逆转录。使用Super-Script First Strand cDNA系统逆向转录RNA。HIF-1α、LOX、E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9基因在荧光阅读器ABI-steponeβ-actin系统中扩增。扩增体系总容积为10 μl,包括5 μl Fast SYBR Green Master Mix、3 μl 无菌水、1 μl cDNA和0.5 μl每个引物。循环条件:95°C下初始激活20 s,95°C变性3 s 40个周期,60°C退火/延伸30 s,每个基因的引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算mRNA的相对表达量,其中 $\Delta Ct = (Ct_{\text{靶基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}})$ 。每个实验分3次进行。

表1 qRT-PCR中使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequence used in qRT PCR

基因	上游	下游
HIF-1α	5'-TGAGCCAGAAGAACT-TTTAG-3'	5'-AGACATATCCACCT-CTTTG-3'
LOX	5'-CCTGGTTCCTGAATC-TGACT-3'	5'-CTTCAGAACACCAGG-CACTG-3'
E-cadherin	5'-AGGTACAGCCACAG-ACG-3'	5'-GCAGCTTGAACCACCA-GG-3'
N-cadherin	5'-AGGATCAACCCCATA-CAC-3'	5'-CTTGGCTAACGGCACT-TG-3'
MMP-2	5'-CTTCTTCCCTCGCAAG-CC-3'	5'-ATGGATTGAGAAAAC-CG-3'
MMP-9	5'-ACCGAGACATCGTCA-TCC-3'	5'-AACCGAGTTGGAACC-ACG-3'
β-actin	5'-GCAAATGCTCTAGG-CGGAC-3'	5'-GCTGTCACCTTCACC-GTTCC-3'

**1.2.4 免疫印迹分析:**用RIPA裂解缓冲液提取细胞蛋白,用BCA蛋白实验试剂加Bradford法测定蛋白浓度。采用免疫印迹法进行免疫印迹。实验中使用的一级抗体有:HIF-1α(1:1 000)、LOX(1:1 000)、E-cadherin(1:500)、N-cadherin(1:500)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)、β-actin(1:1 000)。辣根过氧化物酶结合二级抗体(山羊抗兔和山羊抗小鼠)。使用Quantity One软件对印迹带进行密度测定。

**1.2.5 体外侵袭迁移试验:**细胞侵袭试验在Transwell

小室中进行。8 μm孔径的过滤器涂有100 μl 1 mg/ml的基质凝胶,收集细胞,将均匀的单细胞悬浮液( $2 \times 10^5$ 个细胞/孔)加入上室,在常氧或缺氧条件下培养24 h。将含有10% FBS的500 μl RPMI 1640培养基添加到下室。在氧气剥夺前将β-APN加入培养基中,并在整个实验过程中持续。用类似的方法检测细胞迁移,而不使用基质凝胶包被。孵育24 h后,用棉签除去顶腔细胞,移行细胞固定于PBS、25% 戊二醛中,结晶紫染色,相差显微镜下观察、拍照。在醋酸和甲醇(1:1)中溶解结晶紫染色细胞,在595 nm处测定吸光度。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

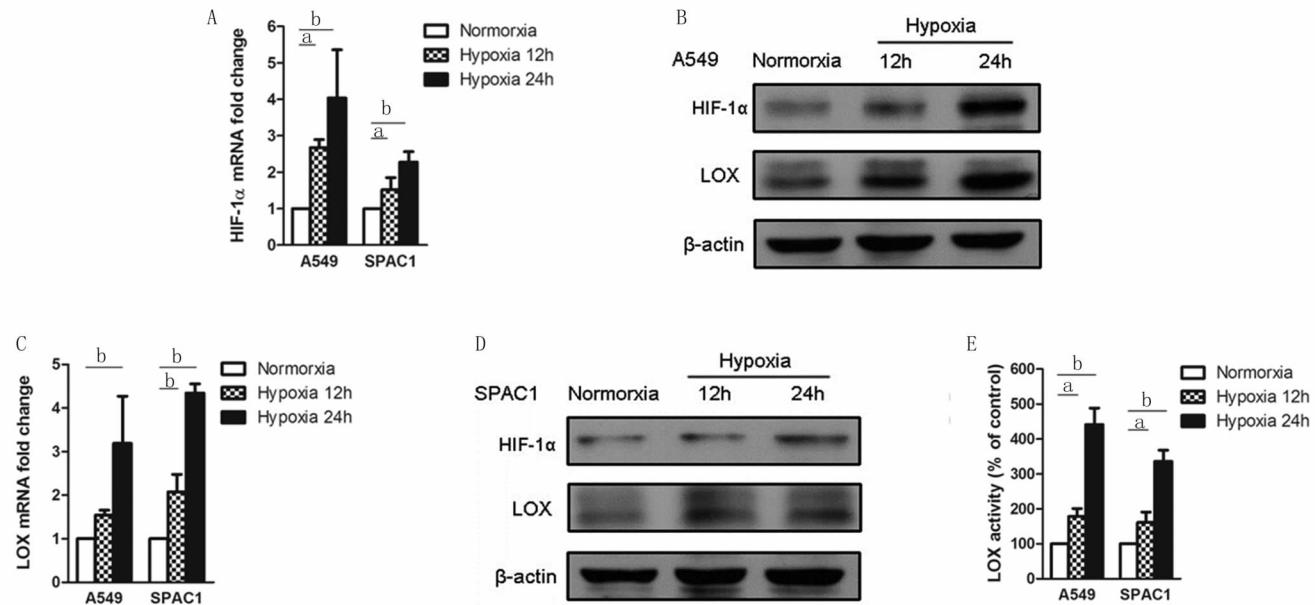
## 2 结 果

**2.1 低氧状态对LOX在NSCLC细胞中mRNA表达、蛋白水平及酶活性的影响** 与常氧组比较,低氧12 h组和低氧24 h组A549及SPCA1细胞HIF-1α、LOX mRNA表达水平显著上调( $P < 0.01$ ),见图1A、C。免疫印迹试验显示,与常氧组比较,低氧12 h组和低氧24 h组A549及SPCA1细胞HIF-1α、LOX蛋白水平显著上调( $P < 0.01$ ),见图1B、D。酶活性实验显示,与常氧组比较,低氧12 h组和低氧24 h组A549及SPCA1细胞的LOX酶活性显著增强( $P < 0.01$ ),见图1E。

**2.2 由β-APN介导的LOX失活对低氧状态诱导的NSCLC细胞转移侵袭的影响** 与常氧组比较,低氧组A549及SPCA1细胞系的迁移和侵袭能力均显著增强( $P < 0.01$ );与低氧组比较,低氧+β-APN组A549及SPCA1细胞系的迁移和侵袭能力均显著减弱( $P < 0.01$ ),见图2。

**2.3 各组A549及SPCA1细胞系EMT相关分子的表达比较** 与常氧组比较,低氧组中E-cadherin mRNA的表达水平下降,N-cadherin、MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平上升( $P < 0.05$ );与低氧组比较,低氧+β-APN组中E-cadherin mRNA的表达水平上升,N-cadherin、MMP-2及MMP-9 mRNA的表达水平下降( $P < 0.01$ ),见图3。

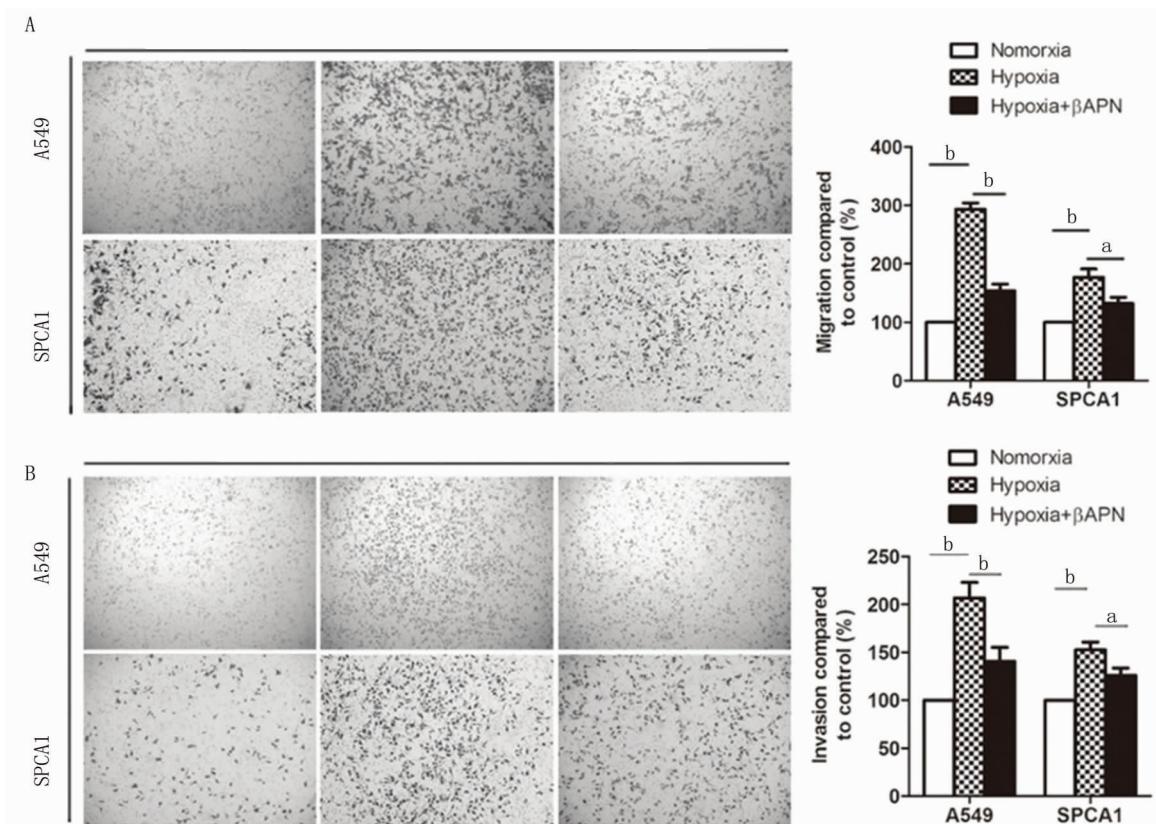
**2.4 各组A549、SPCA1细胞系EMT相关分子蛋白水平比较** 与常氧组比较,低氧组E-cadherin蛋白水平下降,N-cadherin、MMP-2、MMP-9蛋白水平上升( $P < 0.01$ );与低氧组比较,低氧+β-APN组N-cadherin、MMP-2、MMP-9蛋白水平下降,E-cadherin的蛋白水平上升( $P < 0.01$ ),见图4。



注: A. A549、SPCA1 细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达水平; B. A549 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、LOX 蛋白水平; C. A549、SPCA1 细胞 LOX mRNA 表达水平; D. SPCA1 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、LOX 蛋白水平; E. A549、SPCA1 细胞酶活性。细胞分别暴露于常氧状态及低氧 12、24 h。与常氧组比较, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01。

图 1 各组 A549、SPCA1 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、LOX 表达水平及 LOX 酶活性比较

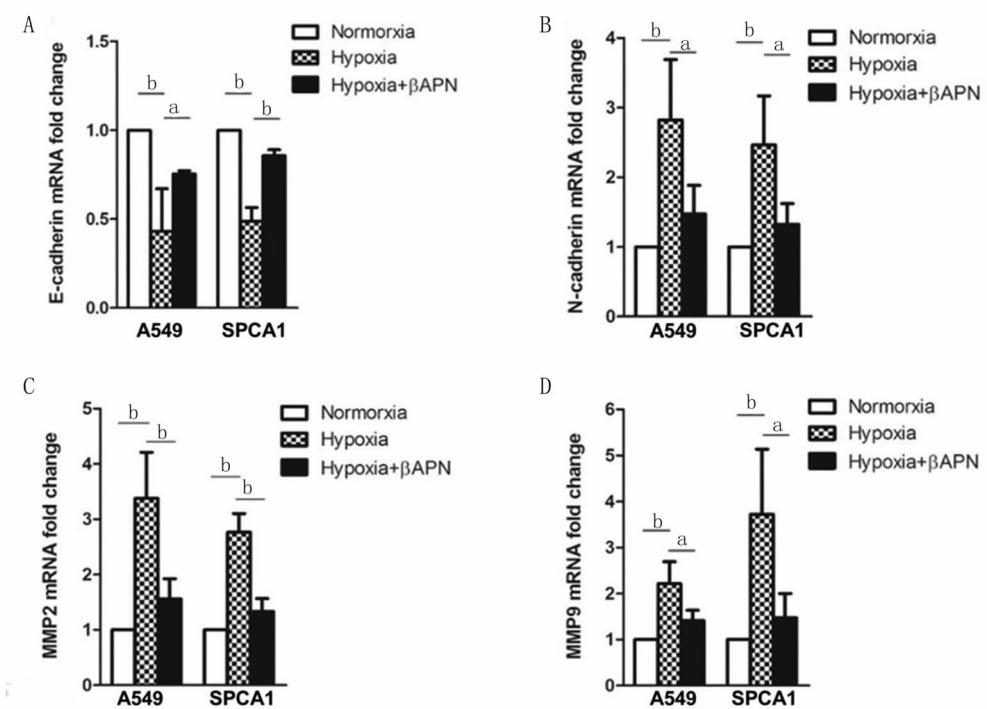
Fig. 1 Comparison of HIF-1 $\alpha$ , LOX expression levels and LOX enzyme activity in A549 and SPCA1 cells among different groups



注: A. 各组 A549、SPCA1 细胞转移能力比较; B. 各组 A549、SPCA1 细胞侵袭能力比较。细胞分别在常氧、低氧、低氧 +  $\beta$ -APN 的条件下培养。与低氧组比较, <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01。

图 2 各组 A549、SPCA1 细胞的迁移和侵袭能力比较

Fig. 2 Comparison of migration and invasion abilities of A549 and SPCA1 cells in different groups



注: A. A549、SPCA1 细胞中 E-cadherin mRNA 表达水平; B. A549、SPCA1 细胞中 N-cadherin mRNA 表达水平; C. A549、SPCA1 细胞中 MMP-2 mRNA 表达水平; D. A549、SPCA1 细胞中 MMP-9 mRNA 表达水平。细胞分别在常氧、低氧、低氧 + β-APN 的条件下培养。与低氧组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 3 各组 A549、SPCA1 细胞的 EMT 相关分子表达水平比较

Fig. 3 Comparison of EMT related molecular expression levels in A549 and SPCA1 cells among different groups

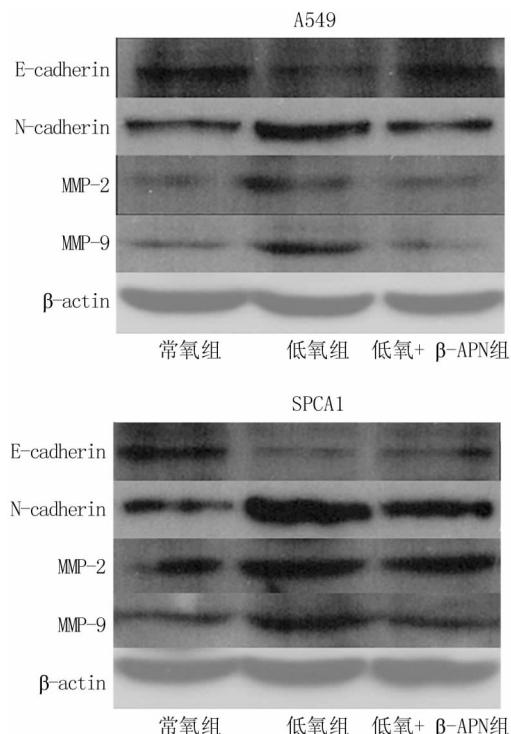


图 4 各组 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白电泳图

Fig. 4 E-cadherin, N-cadherin, MMP-2, and MMP-9 protein electrophoresis images of each group

### 3 讨 论

LOX 是一种低氧状态诱导的 ECM 蛋白,此前报道称在肝脏肿瘤转移及发展过程中该蛋白受 HIF-1 $\alpha$  调控<sup>[10]</sup>。在该研究中,笔者发现 LOX 的表达水平及酶活性在低氧状态下显著上调,并且由  $\beta$ -APN 介导的 LOX 活性抑制可下调低氧状态下 NSCLC 细胞的转移侵袭。更为重要的是,  $\beta$ -APN 起到的抑制作用是通过调控 EMT 分子而实现的。

为了验证上述理论,本研究首先在 A549 及 SPCA1 细胞系中测试了低氧状态对 LOX 表达水平的影响。与常氧状态比较,低氧状态下 A549 及 SPCA1 细胞 LOX mRNA 表达及蛋白水平显著上升与 HIF-1 $\alpha$  的表达一致。并且,LOX 酶活性在低氧状态下也有所上调。这些发现与之前在其他癌症中所描述的结果一致<sup>[11-13]</sup>。因此,笔者得出 LOX 是一种低氧应激基因的结论。

低氧应激原理被运用在肿瘤治疗的基因疗法领域<sup>[14-15]</sup>,但针对 HIF-1 $\alpha$  的治疗策略具有挑战性,因为这种分子在肿瘤微环境中具有多效调控作用<sup>[16-17]</sup>。以往的研究表明,在乳腺癌组织中可检测到 LOX 家族基因赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的过表达,并且与患

者的不良预后相关<sup>[18]</sup>。而在之前的一系列体内及体外研究中,β-APN 被证明在乳腺癌中可以减少肿瘤远处转移的几率,同时对已存在的转移肿瘤的生长没有影响<sup>[19]</sup>。然而也有研究指出 LOX 在癌症中具有抗肿瘤作用<sup>[20]</sup>。这种争议可能是因为 LOX 蛋白存在多种形式。有文献指出具有抑瘤作用的蛋白是 18 kD 的 LOX 前肽,而并非 32 kD 的 LOX 蛋白<sup>[21]</sup>。本研究发现体外低氧诱导的 LOX 上调可促进 NSCLC 的转移侵袭,β-APN 在低氧状态下可减弱肿瘤的转移能力。

在恶性肿瘤转移的起始阶段,会生成活动型肿瘤细胞,这一生成过程被称为 EMT,其是恶性肿瘤转移过程中的重要事件<sup>[22-23]</sup>,在这一过程中,上皮细胞失去极性与细胞间接触,随后经历了胞质骨架的明显变化<sup>[24]</sup>。肿瘤微环境中存在的成纤维细胞可分泌富含活化 LOX(α-LOX)的囊泡,这种囊泡可通过整合素 α2β1 检测基质胶原并诱导胶原交联。交联基质可活化 p-FAK/p-paxillin 通路介导 YAP 的核易位,从而促进 EMT<sup>[25]</sup>。在正常细胞及肿瘤细胞中,低氧状态下 LOX 会诱导 EMT 过程。本研究为了阐明 LOX 调控 NSCLC 细胞转移侵袭的机制,通过 qRT-PCR 和免疫印迹试验发现,低氧状态下 E-cadherin 的表达下调及 N-cadherin 的表达上调,这与之前文献报道的结果一致<sup>[26]</sup>。并且,本研究还发现 LOX 可能起到驱动 EMT 的作用,因为低氧诱导的间质细胞分子 N-cadherin 被 β-APN 阻截。除了低氧状态,EMT 还可被胞外基质的改变所诱导<sup>[27]</sup>。本研究数据显示,低氧状态下 LOX 的活性与 MMP-2、MMP-9 的表达关系密切。因此,LOX 通过 EMT 在肿瘤细胞转移的过程中起重要作用。

综上所述,在 NSCLC 细胞系中,低氧诱导的 LOX 表达与酶活性会促进肿瘤细胞的 EMT 过程,导致肿瘤细胞转移、侵袭能力增强。并且,β-APN 可通过调控 EMT 分子抑制低氧诱导的肿瘤细胞转移。因此,本研究在肿瘤治疗的干预措施中为 β-APN 提供了理论基础。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

王楷:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,论文修改;王聪剑、鞠雪涛:协作实施研究过程;焦振华:数据处理,统计学分析;喻钧:提出研究思路,论文审核

**参考文献**

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1):17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- [2] Kim SY, Gettinger S. First-line treatment of driver-negative non-small cell lung cancer [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2023, 37(3): 557-573. DOI: 10.1016/j.hoc.2023.02.008.
- [3] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5703. DOI: 10.3390/ijms22115703.
- [4] Wang Y, Yang Y, Yang Y, et al. Hypoxia induces hepatocellular carcinoma metastasis via the HIF-1alpha/METTL16/lnc-CSMD1-7/RB-FOX2 axis [J]. iScience, 2023, 26(12): 108495. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108495.
- [5] Xin Y, Zhao L, Peng R. HIF-1 signaling: An emerging mechanism for mitochondrial dynamics [J]. J Physiol Biochem, 2023, 79(3): 489-500. DOI: 10.1007/s13105-023-00966-0.
- [6] Anazco C, Riedelsberger J, Vega-Montoto L, et al. Exploring the interplay between polyphenols and lysyl oxidase enzymes for maintaining extracellular matrix homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10985. DOI: 10.3390/ijms241310985.
- [7] Setargew YFI, Wyllie K, Grant RD, et al. Targeting lysyl oxidase family-mediated matrix cross-linking as an anti-stromal therapy in solid tumours [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(3): 491. DOI: 10.3390/cancers13030491.
- [8] Wang W, Wang X, Yao F, et al. Lysyl oxidase family proteins: Prospective therapeutic targets in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12270. DOI: 10.3390/ijms232012270.
- [9] Tse AP, Sze KM, Shea QT, et al. Hepatitis transactivator protein X promotes extracellular matrix modification through HIF/LOX pathway in liver cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(5): 44. DOI: 10.1038/s41389-018-0052-8.
- [10] Lei Y, Xu X, Liu H, et al. HBx induces hepatocellular carcinogenesis through ARRB1-mediated autophagy to drive the G1/S cycle [J]. Autophagy, 2021, 17(12): 4423-4441. DOI: 10.1080/15548627.2021.1917948.
- [11] Li R, Li H, Zhu L, et al. Reciprocal regulation of LOXL2 and HIF1α drives the Warburg effect to support pancreatic cancer aggressiveness [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1106. DOI: 10.1038/s41419-021-04391-3.
- [12] Zhu G, Wang L, Meng W, et al. LOXL2-enriched small extracellular vesicles mediate hypoxia-induced premetastatic niche and indicates poor outcome of head and neck cancer [J]. Theranostics, 2021, 11(19): 9198-9216. DOI: 10.7150/thno.62455.
- [13] Gong L, Zhang Y, Yang Y, et al. Inhibition of lysyl oxidase-like 2 overcomes adhesion-dependent drug resistance in the collagen-enriched liver cancer microenvironment [J]. Hepatol Commun, 2022, 6(11): 3194-3211. DOI: 10.1002/hepc.1966.
- [14] Chen S, Liao C, Hu H, et al. Hypoxia-driven tumor stromal remodeling and immunosuppressive microenvironment in scirrhous HCC [J]. Hepatology, 2024, 79(4): 780-797. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000599.
- [15] Kheshtchin N, Hadjati J. Targeting hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 in the tumor microenvironment for optimal cancer immunotherapy [J]. J Cell Physiol, 2022, 237(2): 1285-1298. DOI: 10.1002/jcp.30643.

(下转 1170 页)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 003

PCR 技术与肿瘤

# 胃癌前病变患者病灶组织中 GLDC、TRAF-4 表达与内镜黏膜下剥离术后复发的关系

姜萌, 宋香妮, 党玲, 冯琼, 曾慧琳



基金项目: 陕西省卫生健康科研基金项目(2020D0005)

作者单位: 727031 陕西铜川, 铜川市人民医院消化内科

通信作者: 宋香妮, E-mail: 815593747@qq.com

**【摘要】 目的** 探讨胃癌前病变(GPL)患者病灶组织中甘氨酸脱羧酶(GLDC)、肿瘤坏死因子受体相关因子4(TRAF-4)表达与内镜黏膜下剥离术(ESD)后复发的关系。**方法** 选择2019年1月—2022年6月铜川市人民医院消化内科收治的GPL患者124例, 均行ESD手术, 取手术切除的胃癌前病变组织和病变旁组织, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测GLDC、TRAF-4表达, 术后随访1年统计ESD术后复发情况。多因素Logistic回归分析影响GPL患者ESD术后复发的因素, 受试者工作特征(ROC)曲线分析GLDC、TRAF-4预测GPL患者ESD术后复发的价值。**结果** GPL组织中GLDC、TRAF-4表达高于GPL旁组织( $t/P = 15.032 / < 0.001, 22.256 / < 0.001$ )。随访1年, 复发21例, 未复发103例, 复发组GPL组织中GLDC、TRAF-4表达高于未复发组GPL组织( $t/P = 6.368 / < 0.001, 13.834 / < 0.001$ )。Logistic回归分析表明, 切除不完整、非典型增生、高表达GLDC、高表达TRAF-4是GPL患者ESD术后复发的危险因素[ $OR(95\% CI) = 4.174 (1.668 \sim 10.445), 2.593 (1.227 \sim 5.483), 1.668 (1.114 \sim 2.499), 1.544 (1.092 \sim 2.186)$ ]。GLDC、TRAF-4及二者联合预测GPL患者ESD术后复发的曲线下面积(AUC)分别为0.830、0.810、0.933, 二者联合预测的AUC高于单独预测( $Z = 1.953, 2.599, P = 0.042, 0.015$ )。**结论** GPL组织中GLDC、TRAF-4高表达与ESD术后复发有关, 联合GLDC、TRAF-4可预测ESD术后复发风险。

**【关键词】** 胃癌前病变; 内镜黏膜下剥离术; 复发; 甘氨酸脱羧酶; 肿瘤坏死因子受体相关因子4

**【中图分类号】** R735.2      **【文献标识码】** A

**Relationship between GLDC and TRAF-4 expression in lesion tissues and recurrence after endoscopic submucosal dissection in patients with precancerous gastric cancer** Jiang Meng, Song Xiangni, Dang Ling, Feng Qiong, Zeng Huilin.

*Department of Gastroenterology, Tongchuan People's Hospital, Shaanxi Province, Tongchuan 727031, China*

*Funding program: Shaanxi Provincial Health Research Fund Project (2020D0005)*

*Corresponding author: Song Xiangni, E-mail: 815593747@qq.com*

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between the expression of glycine decarboxylase (GLDC) and tumor necrosis factor receptor related factor 4 (TRAF-4) in lesion tissues of patients with gastric pre-lesions (GPL) and the recurrence after endoscopic submucosal dissection (ESD). **Methods** A total of 124 GPL patients admitted to the Gastroenterology Department of Tongchuan People's Hospital from January 2019 to June 2022 were selected. The pre-cancerous tissues and adjacent tissues of gastric cancer were removed and GLDC and TRAF-4 expression were detected by real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT PCR). The postoperative recurrence of ESD was analyzed at 1 year follow up. Multivariate Logistic regression analysis was conducted to analyze the factors affecting ESD recurrence in GPL patients, and the value of GLDC and TRAF-4 in predicting ESD recurrence in GPL patients was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The expressions of GLDC and TRAF-4 in GPL tissues were higher than those in adjacent GPL tissues ( $t/P = 15.032 / < 0.001, 22.256 / < 0.001$ ), and those in relapsed GPL tissues were higher than those in non-relapsed GPL tissues ( $t/P = 6.368 / < 0.001, 13.834 / < 0.001$ ). Incomplete resection, atypical hyperplasia, high expression of GLDC and high expression of TRAF-4 were risk factors for postoperative recurrence in GPL patients [ $OR(95\% CI) = 4.174 (1.668 \sim 10.445), 2.593 (1.227 \sim 5.483), 1.668 (1.114 \sim 2.499), 1.544 (1.092 \sim 2.186)$ ]. The area under the curve of GLDC, TRAF-4 and combined prediction of ESD recurrence in GPL patients was 0.830, 0.810 and 0.933, respectively. The area under the curve of GLDC, TRAF-4 and combined prediction of GPL patients was higher than that of single prediction ( $Z = 1.953, 2.599$ ,

$P < 0.05$ ). **Conclusion** The high expression of GLDC and TRAF-4 in GPL tissue is associated with postoperative recurrence of ESD, and the combination of GLDC and TRAF-4 can predict the risk of postoperative recurrence of ESD.

**[Key words]** Gastric precancerous lesions; Endoscopic submucosal dissection; Recrudescence; Glycine decarboxylase; Tumor necrosis factor receptor associated factor 4

胃癌前病变(gastric precancerous lesions, GPL)是胃癌发生的关键阶段,对癌前病变个体进行筛查和积极治疗可降低胃癌的发病率和病死率<sup>[1-2]</sup>。内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)可去除胃黏膜上的癌前病变组织,临床效果确切,但术后仍有部分患者复发,增加胃癌进展风险<sup>[3]</sup>。甘氨酸脱羧酶(glycine decarboxylase, GLDC)是甘氨酸代谢的核心酶之一,支持肿瘤细胞生长、侵袭和迁移,在前列腺癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。肿瘤坏死因子受体相关因子4(tumor necrosis factor receptor-associated factor 4, TRAF-4)是一种环域E3泛素连接酶,在肺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中过表达,并与肿瘤恶性进展有关<sup>[6-7]</sup>。本研究拟探讨GPL患者病灶组织中GLDC、TRAF-4基因表达与ESD术后复发的关系,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** 选择2019年1月—2022年6月铜川市人民医院消化内科收治的行ESD手术GPL患者124例,男76例,女48例,年龄40~77(53.35±6.98)岁;病变直径0.5~3.0(1.46±0.39)cm。病变部位:位于胃上1/3者18例,位于胃中1/3者38例,位于胃下1/3者68例。本研究获得医院伦理委员会批准(20190301),患者及其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经内镜及病理检查确诊为GPL;②行ESD治疗,符合ESD指征;③病理切缘阴性;④术后配合随访。(2)排除标准:①仅进行胃镜检查,未进行ESD治疗;②胃癌或其他恶性肿瘤;③合并血液异常、全身性炎性反应疾病、自身免疫性疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、甲状腺疾病。

## 1.3 检测指标与方法

**1.3.1 组织GLDC、TRAF-4表达检测:**取ESD手术切除的GPL组织和GPL旁组织(距GPL2cm以上),实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测GLDC、TRAF-4表达。Trizol法提取总RNA,PrimeScript RT Reagent Kit(日本Takara公司)将总RNA逆转录为cDNA,取1μl cDNA采用7500实时荧光定量PCR系统(美国赛默飞公司)进行RT-PCR反应。PCR条件:95℃预变性5min,95℃30s、60℃34s、72℃

30s,共计40个循环。反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)12.5 μl,dNTP 1.6 μl,Taq DNA聚合酶1 μl,上下游引物10 μmol/L各1 μl,加反应缓冲液至25 μl。引物设计如下(由上海三工生物科技有限公司合成):GLDC上游,5'-CTGCTGCTACTGACCTTT-3';下游,5'-CCAGGCATCATTCTCACCAAG-3';TRAF-4上游,5'-AGGAGTCCTCTTGTACACCATC-3';下游5'-CTTT-GAATGGGCAGAGCACC-3';β-actin(内参),上游,5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3';下游,5'-CTCCTTA-ATGTCACGCCAGAT-3'。以β-actin为内对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。

**1.3.2 随访:**患者ESD术后采用电话及门诊复诊方式随访12个月,每3~6个月复查一次胃镜,记录患者复发情况。以随访期间胃镜检查提示胃黏膜不典型增生和肠上皮化生(IM)为复发。根据ESD术后复发情况将患者分为复发组和未复发组。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS 25.0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,比较采用student-t检验;计数资料以频数或率(%)表示,比较采用 $\chi^2$ 检验;多因素Logistic回归分析GPL患者ESD术后复发的因素;受试者工作特征(ROC)曲线分析GLDC、TRAF-4预测GPL患者ESD术后复发的价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GLDC、TRAF-4基因表达比较** GPL组织中GLDC、TRAF-4表达均高于GPL旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表1。

表1 GPL组织和GPL旁组织中GLDC、TRAF-4基因表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of GLDC and TRAF-4 expression in GPL organizations and GPL affiliated organizations

组别	例数	GLDC	TRAF-4
GPL旁组织	124	1.52±0.32	0.95±0.26
GPL组织	124	3.16±1.06	2.67±0.74
<i>t</i> 值		15.032	22.256
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

**2.2 复发组和未复发组GLDC、TRAF-4基因表达比较** 术后随访12个月,复发21例,未复发103例,复

发组 GPL 组织中 GLDC、TRAF4 表达高于未复发组 GPL 组织( $P < 0.01$ )，见表 2。

表 2 复发组和未复发组 GPL 组织中 GLDC、TRAF4 基因表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 2** Comparison of GLDC and TRAF-4 expression in GPL tissues between recurrent and non recurrent groups

组别	例数	GLDC	TRAF-4
未复发组	103	3.08 ± 0.29	2.56 ± 0.21
复发组	21	3.53 ± 0.32	3.21 ± 0.10
t 值		6.368	13.834
P 值		<0.001	<0.001

2.3 不同结局 GPL 患者临床资料比较 与未复发组比较,复发组病变直径大、手术时间长、切除不完整比例高、非典型增生比例高及血小板(PLT)、白蛋白(Alb)水平低( $P < 0.05$ ),其他资料 2 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

#### 2.4 多因素 Logistic 回归分析 GPL 患者 ESD 术后复

发的因素 以 GPL 患者 ESD 术后复发为因变量(赋值:是为“1”;否为“0”),以上述结果中  $P < 0.05$  项目为自变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示:切除不完整、非典型增生、高表达 GLDC、高表达 TRAF4 是 GPL 患者 ESD 术后复发的危险因素( $P < 0.01$ ),见表 4。

表 4 GPL 患者 ESD 术后复发的多因素 Logistic 回归分析

**Tab. 4** Multivariate logistic regression analysis of ESD recurrence in GPL patients after surgery

变量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
常量	12.352	4.023	9.427	<0.001	-	-
病变直径大	0.106	0.091	1.356	0.352	1.111	0.930 ~ 1.329
手术时间长	0.205	0.113	3.291	0.093	1.227	0.934 ~ 1.532
血小板计数低	0.177	0.105	2.841	0.104	1.193	0.972 ~ 1.466
白蛋白低	0.187	0.173	1.168	0.675	1.205	0.859 ~ 1.692
切除不完整	1.429	0.468	9.323	<0.001	4.174	1.668 ~ 10.445
非典型增生	0.953	0.382	6.223	<0.001	2.593	1.227 ~ 5.483
GLDC 高	0.512	0.206	6.177	0.001	1.668	1.114 ~ 2.499
TRAF4 高	0.435	0.177	6.039	0.003	1.544	1.092 ~ 2.186

表 3 未复发组与复发组 GPL 患者临床资料比较

**Tab. 3** Clinical data comparison of GPL patients in the non-recurrence group and recurrence group

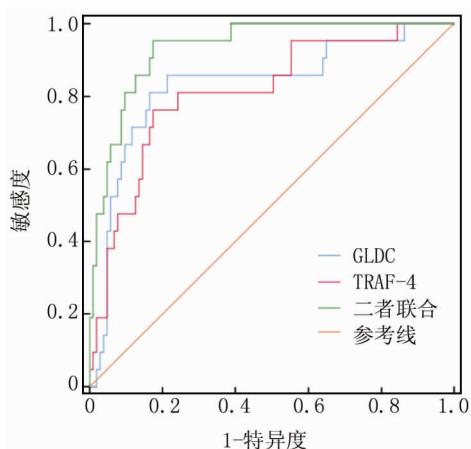
项目	未复发组( $n = 103$ )	复发组( $n = 21$ )	$\chi^2$ 值	P 值
性别[例(%)]	男 女	62(60.19) 41(39.81)	14(66.67) 7(33.33)	0.308 0.579
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		53.02 ± 5.16	54.95 ± 6.09	1.514 0.133
病变直径( $\bar{x} \pm s$ ,cm)		1.32 ± 0.27	2.12 ± 0.35	11.738 <0.001
病变位置[例(%)]	胃上 1/3 胃中 1/3 胃下 1/3	15(14.56) 32(31.07) 56(54.37)	3(14.29) 6(28.57) 12(57.14)	0.061 0.970
病变形态[例(%)]	凸起 平坦 凹陷	36(34.95) 14(13.59) 53(51.46)	6(28.57) 2(9.52) 13(61.91)	0.791 0.673
ASA 分级[例(%)]	I 级 II 级 III 级	42(40.78) 32(31.07) 29(28.15)	9(42.86) 7(33.33) 5(23.81)	0.167 0.920
手术时间( $\bar{x} \pm s$ ,min)		28.12 ± 5.43	37.26 ± 6.09	6.886 <0.001
完整切除[例(%)]	是 否	86(83.50) 17(16.50)	12(57.14) 9(42.86)	7.310 0.007
病理诊断[例(%)]	MAG IM 非典型增生	37(35.92) 47(45.63) 19(18.45)	4(19.05) 6(28.57) 11(52.38)	10.993 0.004
内镜下萎缩性胃炎分级[例(%)]	轻度 中度 重度	29(28.16) 53(51.46) 21(20.38)	6(28.57) 11(52.38) 4(19.05)	0.020 0.990
溃疡[例(%)]		16(15.53)	3(14.29)	0.021 0.885
疤痕[例(%)]		21(20.39)	4(19.05)	0.020 0.889
幽门螺杆菌感染[例(%)]		78(75.73)	15(71.43)	0.172 0.678
WBC( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		7.81 ± 2.06	8.12 ± 2.03	0.630 0.530
NEUT( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		6.95 ± 1.42	7.12 ± 1.32	0.506 0.614
LYM( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		2.95 ± 0.51	3.02 ± 0.65	0.546 0.586
PLT( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		142.65 ± 30.49	112.32 ± 21.06	4.345 <0.001
Alb( $\bar{x} \pm s$ ,g/L)		37.15 ± 3.65	35.26 ± 2.06	2.295 0.024

**2.5 GLDC、TRAF4 预测 GPL 患者 ESD 术后复发的价值** 绘制 GLDC、TRAF4 预测 GPL 患者 ESD 术后复发价值的 ROC 曲线，并计算曲线下面积(AUC)，结果显示：GLDC、TRAF4 及二者联合预测 GPL 患者 ESD 术后复发的 AUC 分别为 0.830、0.810、0.933，二者联合预测 GPL 患者 ESD 术后复发的 AUC 高于单独预测( $Z = 1.953, 2.599, P = 0.042, 0.015$ )，见表 5 和图 1。

**表 5 GLDC、TRAF4 预测 GPL 患者 ESD 术后复发的价值分析**

**Tab. 5 Value analysis of GLDC and TRAF-4 in predicting postoperative recurrence of ESD in GPL patients**

指 标	截断值	AUC	95% CI	敏感度	特异度	约登指数
GLDC	3.31	0.830	0.752 ~ 0.892	0.810	0.825	0.635
TRAF4	2.96	0.810	0.730 ~ 0.875	0.762	0.806	0.568
二者联合		0.933	0.874 ~ 0.970	0.952	0.786	0.739



**图 1 GLDC、TRAF4 预测 GPL 患者 ESD 术后复发的 ROC 曲线**

**Fig. 1 ROC curves of GLDC and TRAF-4 predicting postoperative recurrence of ESD in GPL patients**

### 3 讨 论

胃癌的发展经历癌前级联过程，癌前病变指已被证实与胃癌发生密切相关的病理改变，即上皮内瘤变，分为低级别上皮内瘤变和高级别上皮内瘤变。约有 25.0% 的高级别上皮内瘤变患者会在发病 1 年内进展为胃癌，随着内镜及治疗设备的更新和手术技术的提高，GPL 的内镜治疗已经广泛普及，ESD 具有完全切除率高、创伤小、恢复快、费用低等优点，是胃癌前病变治疗的标准方案<sup>[8]</sup>。但 ESD 治疗后仍有一定的局部复发风险<sup>[9]</sup>，据统计 ESD 治疗后 5 年、7 年和 10 年早期胃癌的累积发病率分别为 9.5%、13.1% 和 22.7%<sup>[10]</sup>。

因此有必要探讨 GPL 患者 ESD 术后复发的标志物，有助于建立预防机制，降低复发风险和胃癌发生率。

GLDC 属于甘氨酸裂解系统，分解甘氨酸生成 5,10-亚甲基四氢叶酸，5,10-亚甲基四氢叶酸是核苷酸合成中一种重要的单碳代谢底物。GLDC 功能异常可引起非酮症性高血糖症，与肿瘤的发生和发展也有密切的关系，在肺癌、前列腺癌和脑肿瘤等多种癌细胞中 GLDC 呈过表达，并通过增强糖酵解和嘧啶代谢，为癌细胞生物代谢和恶性增殖提供能量，增强癌症干细胞的致瘤能力<sup>[11-12]</sup>。既往研究显示，非小细胞肺癌中 GLDC 表达上调，促使肿瘤启动细胞的激活，增强致瘤能力<sup>[13]</sup>，GLDC 过表达与较差的肿瘤相关生存率显著相关<sup>[14]</sup>。GLDC 在神经母细胞瘤肿瘤组织和细胞系中显著升高，与瘤细胞增殖和致瘤性增强有关<sup>[15]</sup>。本研究发现，GPL 组织中 GLDC 表达显著高于 GPL 旁组织，提示 GLDC 可能也参与 GPL 过程。既往研究认为，磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路是凋亡调控的经典信号通路，该通路异常激活可促进肿瘤细胞异常增殖和分化，抑制细胞凋亡，增强细胞对缺氧和营养不良的耐受性，促进肿瘤细胞转移，而 GPL 存在 PI3K/Akt/mTOR 通路异常激活，提示其与 GPL 发生密切相关<sup>[16]</sup>。GLDC 可激活 PI3K/Akt/mTOR 通路，促使癌细胞增殖并抑制其凋亡<sup>[17]</sup>。推测 GLDC 可能通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导胃上皮内瘤变和 GPL 的发生。另外，糖酵解异常影响 GPL 的进展，研究表明 GPL 阶段的胃壁细胞具有高水平的糖酵解，糖酵解加速三磷酸腺苷的产生，促进胃黏膜发育不良细胞的增殖和乳酸的积累，加剧胃黏膜酸性微环境的形成，促进 GPL 的发生和发展<sup>[18]</sup>。GLDC 是调节恶性肿瘤细胞糖酵解的关键因子之一，在肿瘤环境中 GLDC 维持在非乙酰化和酶活性状态，导致甘氨酸代谢增加，并增强糖酵解<sup>[19]</sup>，进而导致 GPL 的发生。本研究 Logistic 回归分析显示，GLDC 高表达与 GPL 患者 ESD 术后复发也有关，表明 GLDC 可能是 GPL 复发的驱动因素，这与 GLDC 致瘤性有关，提示 GLDC 可作为 GPL 患者 ESD 术后复发风险评估的指标，对临床预防和治疗策略完善有着重要意义。

TRAF4 是一种有丝分裂相关蛋白，编码一个含有 E3 泛素连接酶的环结构域，通过肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 和白介素 (IL-1)/Toll 样受体介导信号传导调控免疫和炎性反应过程。TRAF4 还通过介导泛素化和激活 Akt 参与细胞转化，促进细胞增殖，与肿瘤发生进展有关<sup>[20]</sup>。研究显示 TRAF4 在乳腺癌中表达上

调,通过锌指结构域与乳腺癌细胞质中 Eg5 结合并调节其泛素化,促进 Eg5 介导的乳腺癌细胞增殖,抑制乳腺癌细胞凋亡<sup>[21]</sup>。TRAF-4 在转移性前列腺癌中高表达,通过靶向泛素化底物 TrkA,上调侵袭相关基因表达,促进癌细胞的侵袭<sup>[22]</sup>。本研究显示 GPL 组织中 TRAF-4 表达显著高于 GPL 旁组织,TRAF-4 高表达可能与 GPL 有关。既往研究显示泛素化是程序性细胞死亡动态调控的关键,TNF 信号通路由竞争的泛素结合和去泛素化控制,参与蛋白酶体降解和信号复合物的形成,异常的泛素调节与包括胃癌在内的癌症发生有关<sup>[23-24]</sup>。而 TRAF-4 通过介导靶蛋白的泛素化促进细胞恶变和增殖<sup>[25]</sup>,推测 TRAF-4 也可能通过介导泛素化促使 GPL 发生。另外,TRAF-4 过表达还可促使 Akt 和 PI3K 的磷酸化,激活 PI3K/AKT 信号通路,增强癌细胞干性,促使细胞恶变和增殖<sup>[26]</sup>。进一步 Logistic 回归分析显示 TRAF-4 高表达是 GPL 患者 ESD 术后复发的危险因素,表明 TRAF-4 高表达可能加剧 ESD 术后 GPL 的复发风险,这与 TRAF-4 的致癌作用有关。TRAF-4 有望作为 GPL 患者 ESD 术后复发的潜在标志物,对临床治疗具有指导意义。

ROC 曲线分析显示,GLDC、TRAF-4 预测 GPL 患者 ESD 术后复发均具有较高的价值,联合 GLDC、TRAF-4 预测效能更高,说明临床可通过检测 GLDC、TRAF-4 表达预测 ESD 术后复发风险,以针对性调整治疗策略,加强随访,降低复发风险。回归分析显示切除不完整、非典型增生与 GPL 患者 ESD 术后复发也有关,若 ESD 术后提示病变组织未被完整切除提示可能存在较大复发风险,非典型增生上皮细胞的增生程度较高,且细胞异型性明显增加,病变处可能伴癌细胞,癌变和复发风险更大。

综上,GPL 组织中 GLDC、TRAF-4 表达增高,GLDC、TRAF-4 高表达是 GPL 患者 ESD 术后复发的危险因素。联合 GLDC、TRAF-4 可预测 GPL 患者 ESD 术后复发的风险,对临床防治具有重要价值。本研究样本数量较少,且 GLDC、TRAF-4 在 GPL 中的机制尚不明确,仍需扩大样本例数,开展基础研究进一步证实本研究结论的可靠性。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

姜萌、宋香妮:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;党玲:提出研究思路,分析试验数据,论文审核,论文修改;冯琼、曾慧琳:实施研究过程,资料搜集整理,进行统计学分析

## 参考文献

- [1] 陈明干,龚庆豪,戴刚,等. 血清胃泌素含量与胃癌患者病灶内上皮间质转化特征、JAK2/STAT3 信号通路活化的相关性[J]. 疑

- 难病杂志,2022,21(4):333-337. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.04.001
- [2] Pimentel-Nunes P, Libanio D, Marcos-Pinto R, et al. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II); European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019[J]. Endoscopy, 2019, 51(4):365-388. DOI:10.1055/a-0859-1883.
- [3] Manta R, Galloro G, Pugliese F, et al. Endoscopic submucosal dissection of gastric neoplastic lesions: An Italian, Multicenter Study[J]. J Clin Med, 2020, 9(3):737. DOI:10.3390/jcm9030737.
- [4] Zhuang H, Wu F, Wei W, et al. Glycine decarboxylase induces autophagy and is downregulated by miRNA-30d-5p in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3):192. DOI:10.1038/s41419-019-1446-z.
- [5] Chen MK, Xiao ZY, Huang ZP, et al. Glycine decarboxylase (GLDC) plays a crucial role in regulating energy metabolism, invasion, metastasis and immune escape for prostate cancer[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(15):4726-4743. DOI:10.7150/ijbs.85893. eCollection 2023.
- [6] He S, Dong D, Lin J, et al. Overexpression of TRAF-4 promotes lung cancer growth and EGFR-dependent phosphorylation of ERK5[J]. FEBS Open Bio, 2022, 12(10):1747-1760. DOI:10.1002/2211-5463.13458.
- [7] Luo X, Cao J, Zhang C, et al. TRAF-4 promotes the malignant progression of high-grade serous ovarian cancer by activating YAP pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 627:68-75. DOI:10.1016/j.bbrc.2022.07.114.
- [8] 邓柯,刘琦,彭湃澜. 外泌 RNA 作为胃癌诊断生物标志物的研究进展[J]. 疑难病杂志,2023,22(7):767-771. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.07.020.
- [9] Hong Y, Chen X, Li G. Prognostic factors in the treatment of gastric mucosal atypical hyperplasia by endoscopic submucosal dissection [J]. BMC Surg, 2022, 22(1):382. DOI:10.1186/s12893-022-01832-4.
- [10] Abe S, Oda I, Suzuki H, et al. Long-term surveillance and treatment outcomes of metachronous gastric cancer occurring after curative endoscopic submucosal dissection [J]. Endoscopy, 2015, 47(12):1113-1118. DOI:10.1055/s-0034-1392484.
- [11] Mukha D, Fokra M, Feldman A, et al. Glycine decarboxylase maintains mitochondrial protein lipoylation to support tumor growth[J]. Cell Metab, 2022, 34(5):775-782.e9. DOI:10.1016/j.cmet.2022.04.006.
- [12] Woo CC, Kaur K, Chan WX, et al. Inhibiting glycine decarboxylase suppresses pyruvate-to-lactate metabolism in lung cancer cells[J]. Front Oncol, 2018, 8:196. DOI:10.3389/fonc.2018.00196.
- [13] Lin J, Lee JHJ, Paramasivam K, et al. Induced-decay of glycine decarboxylase transcripts as an anticancer therapeutic strategy for non-small-cell lung carcinoma[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 9:263-273. DOI:10.1016/j.omtn.2017.10.001.
- [14] Berezowska S, Galván JA, Langer R, et al. Glycine decarboxylase and

HIF-1 $\alpha$  expression are negative prognostic factors in primary resected early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Virchows Arch*, 2017, 470 (3): 323-330. DOI: 10.1007/s00428-016-2057-z.

- [15] Alptekin A, Ye B, Yu Y, et al. Glycine decarboxylase is a transcriptional target of MYCN required for neuroblastoma cell proliferation and tumorigenicity [J]. *Oncogene*, 2019, 38 (50): 7504-7520. DOI: 10.1038/s41388-019-0967-3.
- [16] Zhu F, Xu Y, Pan J, et al. Epigallocatechin gallate protects against MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma in rats via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8846813. DOI: 10.1155/2021/8846813.
- [17] 李哲丰, 李洁, 赵晓婷, 等. GLDC 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控卵巢癌细胞的增殖与凋亡 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2021, 48 (12): 716-722. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20210514-00142.
- [18] Zhang JX, Bao SC, Chen J, et al. Xiaojianzhong decoction prevents gastric precancerous lesions in rats by inhibiting autophagy and glycolysis in gastric mucosal cells [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2023, 15 (3): 464-489. DOI: 10.4251/wjgo.v15.i3.464.
- [19] Liu R, Zeng LW, Gong R, et al. mTORC1 activity regulates post-translational modifications of glycine decarboxylase to modulate glycine metabolism and tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 4227. DOI: 10.1038/s41467-021-24321-3.
- [20] Li Y, Wang T, Wan Q, et al. TRAF-4 maintains deubiquitination of Caveolin-1 to drive glioblastoma stemness and temozolomide resistance [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (19): 3573-3587. DOI: 10.1158/

(上接 1164 页)

- [16] Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. HIF-1-Independent mechanisms regulating metabolic adaptation in hypoxic cancer cells [J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2371. DOI: 10.3390/cells10092371.
- [17] Zohar Y, Mabjeesh NJ. Targeting HIF-1 for prostate cancer: A synthesis of preclinical evidence [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2023, 27 (8): 715-731. DOI: 10.1080/14728222.2023.2248381.
- [18] Ramos S, Ferreira S, Fernandes AS, et al. Lysyl oxidases expression and breast cancer progression: A bioinformatic analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 883998. DOI: 10.3389/fphar.2022.883998.
- [19] Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Retraction note: Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis [J]. *Nature*, 2020, 579 (7799): 456. DOI: 10.1038/s41586-020-2112-4.
- [20] Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101 (6): 1338-54. DOI: 10.1002/jcb.21371.
- [21] Bais MV, Ozdener GB, Sonenshein GE, et al. Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways [J]. *Oncogene*, 2015, 34 (15): 1928-1937. DOI: 10.1038/onc.2014.147.
- [22] Wang Y, He J, Liang Y, et al. Hsa\_circ\_0102899 promotes epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25 (11): 3252-3262. DOI: 10.1007/s12094-023-03220-7.

0008-5472. CAN-21-3882.

- [21] Hao M, Zhang J, Sun M, et al. TRAF-4 inhibits the apoptosis and promotes the proliferation of breast cancer cells by inhibiting the ubiquitination of spindle assembly-associated protein Eg5 [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 855139. DOI: 10.3389/fonc.2022.855139.
- [22] Singh R, Karri D, Shen H, et al. TRAF-4-mediated ubiquitination of NGF receptor TrkA regulates prostate cancer metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (7): 3129-3143. DOI: 10.1172/JCI96060.
- [23] Cockram PE, Kist M, Prakash S, et al. Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28 (2): 591-605. DOI: 10.1038/s41418-020-00708-5.
- [24] Zhao R, He B, Bie Q, et al. AQP5 complements LGR5 to determine the fates of gastric cancer stem cells through regulating ULK1 ubiquitination [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 (1): 322. DOI: 10.1186/s13046-022-02532-w.
- [25] Singh R, Meng H, Shen T, et al. TRAF-4-mediated nonproteolytic ubiquitination of androgen receptor promotes castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120 (20): e2218229120. DOI: 10.1073/pnas.2218229120.
- [26] Wang Y, Luo X, Wu N, et al. SRC-3/TRAF-4 facilitates ovarian cancer development by activating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Med Oncol*, 2023, 40 (2): 76. DOI: 10.1007/s12032-022-01944-0.

(收稿日期:2024-01-22)

- [23] Bodén E, Sverús F, Olm F, et al. A Systematic review of mesenchymal epithelial transition factor (MET) and its impact in the development and treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (15): 3827. DOI: 10.3390/cancers15153827.
- [24] Azadi S, Torkashvand E, Mohammadi E, et al. Analysis of EMT induction in a non-invasive breast cancer cell line by mesenchymal stem cell supernatant: Study of 2D and 3D microfluidic based aggregate formation and migration ability, and cytoskeleton remodeling [J]. *Life Sci*, 2023, 320: 121545. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121545.
- [25] Liu X, Li J, Yang X, et al. Carcinoma-associated fibroblast-derived lysyl oxidase-rich extracellular vesicles mediate collagen crosslinking and promote epithelial-mesenchymal transition via p-FAK/p-paxillin/YAP signaling [J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15 (1): 32. DOI: 10.1038/s41368-023-00236-1.
- [26] Huang J, Yao X, Zhang J, et al. Hypoxia-induced downregulation of miR-30c promotes epithelial-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104 (12): 1609-1617. DOI: 10.1111/cas.12291.
- [27] Yao T, Hu W, Chen J, et al. Collagen XV mediated the epithelial-mesenchymal transition to inhibit hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2022, 13 (5): 2472-2484. DOI: 10.21037/jgo-22-299.

(收稿日期:2024-04-20)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 004

PCR 技术与肿瘤

# 结直肠癌组织 PHGDH、APOL3 表达及临床预后价值

潘艳, 王蕾, 洪佳, 薛建波

基金项目: 北京市医院管理中心“登峰”人才培养计划项目(DFL20220101)

作者单位: 102600 北京, 首都医科大学大兴教学医院消化内科

通信作者: 薛建波, E-mail: 13811610848@126.com



**【摘要】 目的** 研究结直肠癌(CRC)中3-磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)、载脂蛋白L3(APOL3)表达,分析两者对CRC患者的预后评估价值。**方法** 回顾性收集2018年3月—2021年2月首都医科大学大兴教学医院消化内科收治的CRC患者112例临床资料。采用实时荧光定量PCR(qPCR)和免疫组织化学法检测癌组织及癌旁组织中PHGDH、APOL3 mRNA和蛋白表达;Kaplan-Meier法分析PHGDH、APOL3 mRNA表达对CRC患者生存预后的影响;Cox回归分析CRC预后的影响因素;受试者工作特征(ROC)曲线评价PHGDH、APOL3 mRNA表达水平对CRC患者预后的评估价值。**结果** CRC患者癌组织中PHGDH mRNA相对表达量高于癌旁组织,APOL3 mRNA相对表达量低于癌旁组织( $t/P = 52.982 / < 0.001, 35.679 / < 0.001$ );CRC患者癌组织中PHGDH、APOL3蛋白阳性率分别为78.10%(90/112)、8.57%(10/112),与癌旁组织的7.62%(8/112)、76.19%(88/112)比较,差异有统计学意义( $\chi^2/P = 123.722 / < 0.001, 110.367 / < 0.001$ );TNM分期Ⅲ期、有淋巴结转移的CRC癌组织中PHGDH mRNA表达水平高于TNM分期Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴结转移,而APOL3 mRNA表达水平低于TNM分期Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴结转移(PHGDH: $t/P = 52.268 / < 0.001, 51.315 / < 0.001$ ;APOL3: $t/P = 15.873 / < 0.001, 14.769 / < 0.001$ )。PHGDH mRNA高表达组3年总生存率为50.00%(26/52),低于低表达组的73.33%(44/60)(Log rank  $\chi^2 = 4.169, P = 0.041$ );APOL3 mRNA低表达组3年总生存率为46.30%(25/54),低于高表达组的77.59%(45/58)(Log rank  $\chi^2 = 10.650, P = 0.001$ )。TNM分期Ⅲ期、淋巴结转移、PHGDH mRNA高为影响CRC患者预后的独立危险因素[ $OR(95\% CI) = 1.465 (1.172 \sim 1.832), 1.501 (1.159 \sim 1.944), 1.384 (1.088 \sim 1.761)$ ],APOL3 mRNA高为独立保护因素[ $OR(95\% CI) = 0.775 (0.617 \sim 0.924)$ ];PHGDH、APOL3 mRNA表达水平及二者联合评估CRC患者预后的曲线下面积(AUC)分别为0.830、0.816、0.922,二者联合的AUC大于PHGDH、APOL3 mRNA表达水平单独评估( $Z = 4.482, 4.130, P$ 均<0.001)。**结论** CRC中PHGDH表达上调,APOL3表达下调,在CRC中均发挥重要的促癌作用,联合检测PHGDH、APOL3的表达有助于评估CRC的预后。

【关键词】 结直肠癌;3-磷酸甘油酸脱氢酶;载脂蛋白L3;预后

【中图分类号】 R735.34

【文献标识码】 A

**The expression and clinical prognostic value of PHGDH and APOL3 in colorectal cancer tissues** Pan Yan, Wang Lei, Hong Jia, Xue Jianbo. Department of Gastroenterology, Daxing Teaching Hospital of Capital Medical University, Beijing 102600, China

**Funding program:** Beijing Hospital Management Center "Ascending the Peak" Talent Training Program Project(DFL20220101)

**Corresponding author:** Xue Jianbo, E-mail: 13811610848@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the expression of 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) and apolipoprotein L3 (APOL3) in colorectal cancer (CRC), and to analyze their prognostic value.**Method** A total of 112 patients with CRC admitted to the Department of Gastroenterology, Daxing Teaching Hospital of Capital Medical University from March 2018 to February 2021 were retrospectively collected. The expressions of PHGDH and APOL3 mRNA and protein in cancer tissues and adjacent tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry. Kaplan-Meier method was used to analyze the effect of PHGDH and APOL3 mRNA expression on the survival prognosis of CRC patients. Cox regression analysis was used to analyze the prognostic factors of CRC. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the prognostic value of PHGDH and APOL3 mRNA expression levels in CRC patients.**Results** The relative expression of PHGDH mRNA in cancer tissues of CRC patients was higher than that in adjacent tis-

sues, and the relative expression of APOL3 mRNA was lower than that in adjacent tissues ( $t/P = 52.982 / < 0.001, 35.679 / < 0.001$ ); The positive rates of PHGDH and APOL3 protein in cancer tissues of CRC patients were 78.10% (90/112) and 8.57% (10/112), respectively, compared with 7.62% (8/112) and 76.19% (88/112) in adjacent tissues, the difference was statistically significant ( $\chi^2/P = 123.722 / < 0.001, 110.367 / < 0.001$ ); The expression level of PHGDH mRNA in CRC tissues with TNM stage III and lymph node metastasis was higher than that in TNM stage I-II and no lymph node metastasis, while the expression level of APOL3 mRNA was lower than that in TNM stage I-II and no lymph node metastasis ( $t/P = 52.268 / < 0.001, 51.315 / < 0.001, 15.873 / < 0.001, 14.769 / < 0.001$ ). The 3-year overall survival rate of PHGDH mRNA high expression group was 50.00% (26/52), which was lower than that of low expression group 73.33% (44/60) (Log rank  $\chi^2 = 4.169, P = 0.041$ ). The 3-year overall survival rate of APOL3 mRNA low expression group was 46.30% (25/54), which was lower than that of high expression group 77.59% (45/58) (Log rank  $\chi^2 = 10.650, P = 0.001$ ). TNM stage III, lymph node metastasis, and high PHGDH mRNA were independent risk factors affecting the prognosis of CRC patients [ $OR(95\% CI) = 1.465(1.172 - 1.832), 1.501(1.159 - 1.944), 1.384(1.088 - 1.761)$ ], and high APOL3 mRNA was an independent protective factor [ $OR(95\% CI) = 0.775(0.617 - 0.924)$ ]. The area under the curve (AUC) of PHGDH, APOL3 mRNA expression levels and the combination of the two in evaluating the prognosis of CRC patients were 0.830, 0.816 and 0.922, respectively. The AUC of the combination of the two was greater than that of PHGDH and APOL3 mRNA expression levels alone ( $Z = 4.482, 4.130, P < 0.001$ ).

**Conclusion** The expression of PHGDH is up-regulated and the expression of APOL3 is down-regulated in CRC, which plays an important role in promoting cancer in CRC. The combined detection of PHGDH and APOL3 expression is helpful to evaluate the prognosis of CRC.

**【Key words】** Colorectal cancer; 3-phosphoglycerate dehydrogenase; Apolipoprotein L3; Prognosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界上第三大常见的癌症,也是癌症相关死亡的第二大原因,全球每年新增病例约 180 万例,死亡约 88.1 万例<sup>[1]</sup>。CRC 的治疗包括手术、放化疗等,免疫及靶向治疗的发展改善了 CRC 的疗效,但中晚期患者的预后仍然较差<sup>[2]</sup>。3-磷酸甘油酸脱氢酶 (3-phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH) 是细胞中 L-丝氨酸合成早期的关键酶,可形成具有生物学活性的同源四聚体,参与 D-丝氨酸和其他氨基酸合成过程<sup>[3]</sup>。研究表明,肿瘤中 PHGDH 表达升高,其能与糖醇解酶磷酸果糖激酶相互作用,促进整合素  $\alpha v \beta 3$  的唾液酸化修饰,激活己糖胺唾液酸途径,促进癌细胞迁移和侵袭<sup>[4]</sup>。载脂蛋白 L3 (apolipoprotein L3, APOL3) 属于载脂蛋白 L 基因家族的成员,参与细胞内胆固醇等脂质的转运过程,与动脉粥样硬化、肿瘤等疾病关系密切<sup>[5]</sup>。研究表明,膀胱癌中 APOL3 表达下调,导致肿瘤细胞外基质重构,抑制免疫细胞浸润,促进肿瘤免疫逃逸,导致肿瘤进展<sup>[6]</sup>。目前 CRC 中 PHGDH、APOL3 的表达及意义尚不清楚。本研究旨在分析 CRC 中 PHGDH、APOL3 的基因表达及其预后价值,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 回顾性收集 2018 年 3 月—2021 年 2 月首都医科大学大兴教学医院消化内科收治的 CRC 患者 112 例临床资料,男 74 例、女 38 例;年龄 30~79 (66.12 ± 7.13) 岁;结肠癌 65 例,直肠癌 47 例;病理类型:腺癌 70 例,黏液腺癌及其他 42 例;低分化 40 例,中高分化 72 例;TNM 分期:Ⅰ~Ⅱ 期 81 例,Ⅲ 期 31

例;淋巴结转移:有 31 例,无 81 例。本研究已获得医院伦理委员会审核批准 (20220306008),患者或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术后病理确诊为 CRC;②均为初次治疗;③临床资料及术后随访资料完善;④身体状况良好, Karnofsky 功能状态 (KPS) 评分 >80 分。(2)排除标准:①肿瘤已出现远处转移;②术后 1 个月内因手术并发症死亡;③合并其他器官的恶性肿瘤;④合并出凝血疾病、心肺功能衰竭及自身免疫性疾病等;⑤接受内镜下黏膜切除术、姑息性切除等治疗。

## 1.3 检测指标与方法

**1.3.1 PHGDH、APOL3 mRNA 检测及分组:**于术中留取 CRC 患者部分癌组织及癌旁组织,提取组织总 RNA 并反转录合成 cDNA,实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 PHGDH、APOL3 表达水平。qPCR 仪器购自美国赛默飞公司 (型号 Quant Studio 5)。PHGDH、APOL3 mRNA 的上下游引物由上海生工公司设计合成,引物序列见表 1。反应体系:cDNA 0.5 μl, 2 × SYBR Green 5 μl, 正反向引物各 0.5 μl, 双蒸水 3.5 μl。反应程序:94℃ 5 min, 1 个循环;94℃ 35 s, 60℃ 30 s, 70℃ 30 s, 共计 40 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法表示 PHGDH、APOL3 mRNA 的相对表达量。以 PHGDH、APOL3 mRNA 的平均值 3.15、1.87 为界,分为 PHGDH mRNA 高表达组 52 例 (>3.15) 和低表达组 60 例 (<3.15), APOL3 mRNA 高表达组 58 例 (>1.87) 和低表达组 54 例 (<1.87)。

**1.3.2 PHGDH、APOL3 蛋白检测:**采用免疫组织化学

表 1 PHGDH 和 APOL3 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for PHGDH and APOL3

基 因	上游引物	下述引物
PHGDH	5' - CTGGCGAAACTGCT-CATCACT - 3'	5' - TGGCAGAGCGAACAA-TAAGGC - 3'
APOL3	5' - GCAGGATTGGGAG-AGAGGTAG - 3'	5' - CAGCAAGCCTGTCGTG-GAG - 3'
β-actin	5' - CACGACAGGCTTGC-CTGAATGA - 3'	5' - CTTCCGTAACACACGTC-CAGTG - 3'

检测 CRC 患者癌组织及癌旁组织中 PHGDH、APOL3 表达。将术中获取的癌组织及癌旁组织固定后石蜡包埋切片。PHGDH 兔多克隆抗体购自上海爱必信生物科技公司(货号 abs106252), APOL3 兔多克隆抗体购自武汉生物科技公司(货号 A-AF1085a)。抗体稀释比分别为 1:100、1:200。依次经显色及脱水、二甲苯透明化后树胶封片。显微镜下观察染色情况。阳性细胞百分比评分:≤25% 计 1 分;26%~50% 计 2 分;51%~75% 计 3 分;76%~100% 计 4 分。染色深度评分:无染色 0 分,浅黄色 1 分,黄褐色 2 分,棕褐色 3 分。两项评分乘积>2 分为阳性,≤2 分为阴性。

1.3.3 术后随访:患者术后病理组织确诊后开始进行随访,通过电话、门诊方式进行随访,随访 3 年,随访间隔时间 6~12 个月,随访截至 2024 年 3 月 1 日。随访终点为 CRC 患者发生死亡或随访终止。总生存时间定义为首次确诊至患者死亡的时间。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件分析数据。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用卡方检验;正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验;采用 Kaplan-Meier 曲线分析 PHGDH、APOL3 mRNA 表达对 CRC 患者生存预后的影响;Cox 回归模型分析影响 CRC 患者预后的危险因素;受试者工作特征(ROC)曲线评价 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平对 CRC 患者预后的评估价值。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

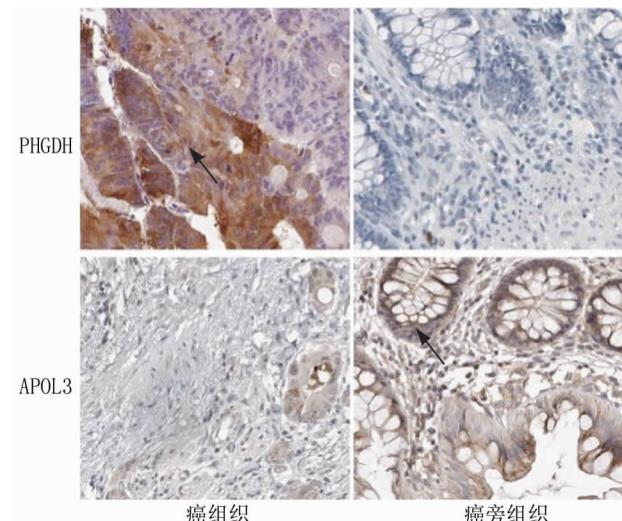
2.1 CRC 癌组织及癌旁组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 表达比较 CRC 患者癌组织中 PHGDH mRNA 相对表达量高于癌旁组织,APOL3 mRNA 相对表达量低于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。

2.2 CRC 癌组织及癌旁组织中 PHGDH、APOL3 蛋白表达比较 CRC 患者癌组织中 PHGDH、APOL3 蛋白阳性率分别为 78.10%(90/112)、8.57%(10/112),与癌旁组织的 7.62%(8/112)、76.19%(88/112)比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 123.722, 110.367, P$  均 < 0.001),见图 1。

表 2 CRC 癌组织及癌旁组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of PHGDH and APOL3 mRNA expression in CRC cancer tissues and adjacent tissues

组 别	例数	PHGDH	APOL3
癌旁组织	112	$0.77 \pm 0.18$	$3.94 \pm 0.53$
癌组织	112	$3.15 \pm 0.44$	$1.87 \pm 0.31$
t 值		52.982	35.679
P 值		<0.001	<0.001

图 1 CRC 癌组织及癌旁组织中 PHGDH、APOL3 蛋白表达(免疫组化染色,  $\times 200$ )Fig. 1 Expression of PHGDH and APOL3 proteins in CRC cancer tissue and adjacent tissues (immunohistochemistry staining,  $\times 200$ )

2.3 CRC 癌组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 表达在不同临床病理特征中的差异 CRC 癌组织 PHGDH、APOL3 表达水平在不同性别、年龄、病理类型、肿瘤部位、分化程度中比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );TNM 分期 III 期、有淋巴结转移的 CRC 癌组织中 PHGDH mRNA 表达水平高于 TNM 分期 I~II 期、无淋巴结转移,而 APOL3 mRNA 表达水平低于 TNM 分期 I~II 期、无淋巴结转移( $P < 0.01$ ),见表 3。

2.4 癌组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 表达不同对 CRC 患者生存预后的影响 CRC 患者 112 例至随访结束时死亡 42 例,3 年总生存率为 62.50%(70/112)。PHGDH mRNA 高表达组 3 年总生存率为 50.00%(26/52),低于低表达组的 73.33%(44/60)(Log-rank  $\chi^2 = 4.169, P = 0.041$ );APOL3 mRNA 低表达组 3 年总生存率为 46.30%(25/54),低于高表达组的 77.59%(45/58)(Log-rank  $\chi^2 = 10.650, P = 0.001$ ),见图 2。

表 3 不同临床/病理特征 CRC 癌组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of ACLP and COL11A1 mRNA expression in CRC cancer tissues with different clinical/pathological features

项目		例数	PHGDH ( $n=112$ )	t 值	P 值	APOL3 ( $n=112$ )	t 值	P 值
性别	男	74	$3.19 \pm 0.46$	1.345	0.181	$1.89 \pm 0.30$	0.957	0.340
	女	38	$3.07 \pm 0.42$			$1.83 \pm 0.34$		
年龄	<60岁	45	$3.08 \pm 0.38$	1.427	0.156	$1.81 \pm 0.30$	1.630	0.106
	≥60岁	67	$3.20 \pm 0.47$			$1.91 \pm 0.33$		
病理类型	腺癌	70	$3.11 \pm 0.41$	1.288	0.200	$1.84 \pm 0.29$	1.342	0.182
	黏液腺癌及其他	42	$3.22 \pm 0.48$			$1.92 \pm 0.33$		
肿瘤部位	结肠	65	$3.13 \pm 0.43$	0.590	0.557	$1.91 \pm 0.34$	1.613	0.110
	直肠	47	$3.18 \pm 0.46$			$1.81 \pm 0.30$		
分化程度	高中分化	72	$3.12 \pm 0.40$	1.071	0.287	$1.90 \pm 0.33$	1.295	0.198
	低分化	40	$3.21 \pm 0.47$			$1.82 \pm 0.28$		
TNM 分期	I ~ II 期	81	$2.01 \pm 0.34$	52.268	<0.001	$2.16 \pm 0.33$	15.873	<0.001
	III 期	31	$6.13 \pm 0.45$			$1.12 \pm 0.22$		
淋巴结转移	有	31	$6.05 \pm 0.46$	51.315	<0.001	$1.20 \pm 0.23$	14.769	<0.001
	无	81	$2.04 \pm 0.33$			$2.13 \pm 0.32$		

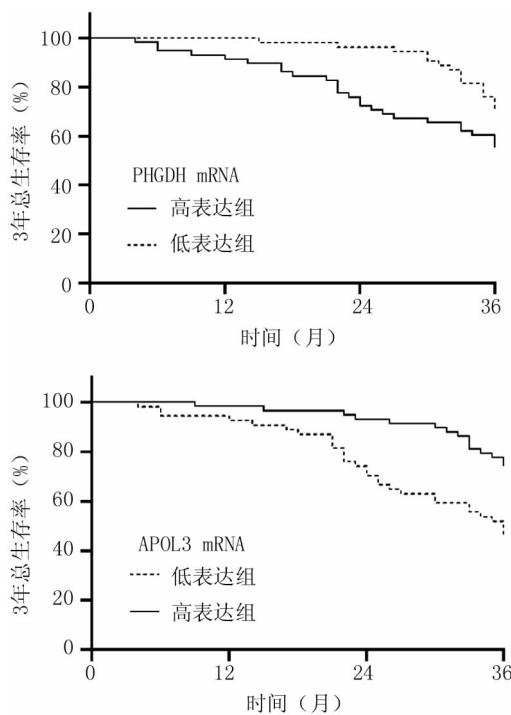


图 2 Kaplan-Meier 曲线分析 PHGDH、APOL3 mRNA 表达对 CRC 患者生存预后的影响

Fig. 2 Kaplan Meier curve analysis of the impact of PHGDH and APOL3 mRNA expression on the survival prognosis of CRC patients

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(死亡 = 1, 生存 = 0), 以表 3 中  $P < 0.05$  的项目为自变量进行多因素 Cox 分析, 结果显示: TNM 分期 III 期、淋巴结转移、PHGDH mRNA 高为影响 CRC 患者预后的独立危险因素, APOL3 mRNA 高为独立保护因素( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 4。

2.6 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平对 CRC 患者预后的评估价值 绘制 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水

平单独及联合评估 CRC 患者预后的 ROC 曲线, 并计算曲线下面积(AUC), 结果显示: PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平及二者联合评估 CRC 患者预后的 AUC 分别为 0.830、0.816、0.922, 二者联合的 AUC 大于 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平单独评估( $Z = 4.482, 4.130, P$  均  $< 0.001$ ), 见表 5、图 3。

表 4 多因素 Cox 回归分析 CRC 预后影响因素

Tab. 4 Multivariate Cox regression analysis of factors influencing CRC prognosis

因 素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
TNM 分期 III 期	0.382	0.114	11.228	<0.001	1.465	1.172 ~ 1.832
淋巴结转移	0.406	0.132	9.460	<0.001	1.501	1.159 ~ 1.944
PHGDH mRNA 高	0.325	0.123	6.982	<0.001	1.384	1.088 ~ 1.761
APOL3 mRNA 高	-0.281	0.103	7.443	<0.001	0.775	0.617 ~ 0.924

表 5 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平对 CRC 患者预后的评估价值

Tab. 5 The prognostic value of PHGDH and APOL3 mRNA expression levels in CRC patients

指 标	截断值	AUC	95% CI	敏 感 度	特 异 度	约登指数
PHGDH mRNA	3.43	0.830	0.791 ~ 0.868	0.712	0.821	0.533
APOL3 mRNA	1.57	0.816	0.780 ~ 0.849	0.654	0.850	0.504
二者联合		0.922	0.878 ~ 0.959	0.882	0.805	0.687

### 3 讨 论

CRC 是我国常见的恶性肿瘤, 2020 年新发 55.5 万例, 死亡 28.6 万例, 并且其发病率和病死率呈逐渐上升的趋势<sup>[7]</sup>。但由于医疗资源不均衡及肿瘤本身的异质性, 不同 CRC 患者预后存在较大差异。TNM 分期是临床评估 CRC 预后的主要指标, 但由于肿瘤的高异质性及个体差异性, 相同分期患者的病死率也存

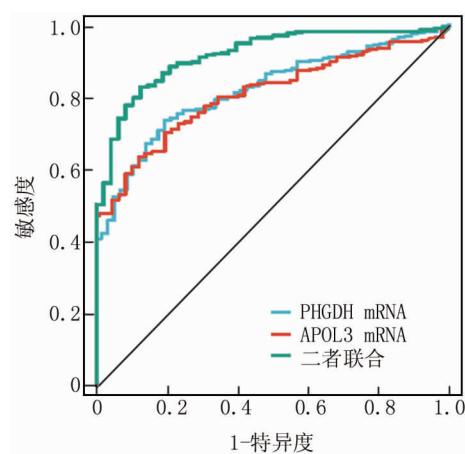


图 3 PHGDH、APOL3 mRNA 表达水平评估 CRC 患者预后的 ROC 曲线

**Fig. 3** ROC curve for evaluating the prognosis of CRC patients based on the expression levels of PHGDH and APOL3 mRNA

在较大差异<sup>[8]</sup>。因此,研究影响 CRC 预后的风险因素,针对不同预后风险的患者进行分层管理,有助于改善患者预后。

PHGDH 是丝氨酸代谢的关键酶,分子量约为 56 kDa,能够催化 3-磷酸甘油酸生成丝氨酸前体物质 3-磷酸脱氢丙酮酸,后者在酶促反应催化下生成丝氨酸。研究表明,膀胱癌、宫颈癌等肿瘤中 PHGDH 高表达,其与聚胞嘧啶结合蛋白 2 相互作用,上调胱氨酸/谷氨酸转运蛋白的表达,抑制铁死亡,促进肿瘤的恶性进展<sup>[9]</sup>。本研究中,CRC 中 PHGDH 表达升高,这与既往学者研究结果一致<sup>[10]</sup>,但该研究仅纳入 59 例 CRC 患者,样本量较小,结果可能存在偏倚。本研究在较大样本量基础上进一步证实 CRC 中 PHGDH 表达升高,其原因可能是缺氧微环境能够激活 CRC 中 PHGDH 的表达。研究表明,肿瘤的快速增殖导致肿瘤处于缺血缺氧的微环境,诱导 AMP 活化蛋白激酶活化,进而增加缺氧诱导因子-1 $\alpha$  蛋白的稳定性,缺氧诱导因子-1 $\alpha$  能够在转录水平上调 PHGDH 的表达,促进癌细胞中的丝氨酸合成途径和糖酵解,促进肿瘤过度增殖<sup>[11]</sup>。本研究中,PHGDH 表达升高与 TNM 分期Ⅲ期、淋巴结转移有关。分析其机制,PHGDH 的天冬氨酸激酶结构域能够结合细胞核中的 c-Myc, c-Myc 激活趋化因子 CXCL1 和白介素 8 表达,促进肿瘤微环境中性粒细胞的募集,增强肿瘤相关巨噬细胞的浸润,促进肿瘤免疫逃逸<sup>[12]</sup>。另外,有学者报道在食管癌中,PHGDH 的表达升高能够激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路,促进癌细胞的侵袭和转移,同时促进脐静脉血管内皮细胞的增殖,

诱导血管及淋巴管新生,促进癌细胞的血管及淋巴管转移<sup>[13]</sup>。本研究中,CRC 中 PHGDH 表达升高增加 CRC 不良预后的风险。分析其原因,一方面 PHGDH 的表达能够促进 CRC 肿瘤细胞侵袭和转移,增加患者术后复发转移的风险。另一方面 PHGDH 的表达能够增强癌细胞对化疗治疗的耐药性,降低辅助治疗的疗效,导致患者不良预后。研究表明,乳腺癌细胞中蛋白质精氨酸甲基转移酶-1 能够促进 PHGDH 的甲基化修饰,导致丝氨酸合成途径中的代谢产物  $\alpha$ -酮戊二酸和柠檬酸盐的水平升高,促进癌细胞中 S 腺苷甲硫氨酸的合成,清除放化疗过程中细胞产生的大量氧自由基,增强癌细胞对铂类化疗药物的抵抗性,导致患者不良预后<sup>[14]</sup>。另有研究表明,PHGDH 能与 E1A 结合蛋白 p300 和热休克蛋白家族 A 成员 8 结合,导致顺铂化疗耐药性形成,而利用 PHGDH 的特异性抑制剂处理胃癌细胞后,癌细胞中的丝氨酸合成代谢显著受到抑制,增强顺铂化疗诱导的癌细胞凋亡,克服胃癌对顺铂的耐药性<sup>[15]</sup>。

APOL3 是载脂蛋白家族成员,位于人类 22q12.3 染色体,作为编码蛋白质存在于细胞质中,调节细胞内脂质的转移及脂质与细胞器的结合过程。研究表明,APOL3 能在髓过氧化物酶及血管内皮生长因子诱导下,激活血管内皮细胞中细胞外细胞激酶 1/2,促进血管生成并增加血管内皮通透性,是参与促进肿瘤转移的重要调控因子<sup>[16]</sup>。本研究中,CRC 中 APOL3 表达降低,这与既往学者在 CRC 肿瘤组织中利用二代转录组测序发现 APOL3 mRNA 降低的结果一致<sup>[17]</sup>,但该研究未能在蛋白水平进行验证。本研究在蛋白水平进一步证实 CRC 中 APOL3 蛋白表达降低。既往有学者报道,APOL3 的表达受 p53 表达调控,CRC 中 P53 基因突变导致 p53 蛋白功能缺失,使癌细胞中 APOL3 的表达下调,引起下游 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路的激活,促进癌细胞的侵袭和迁移<sup>[17]</sup>。本研究中,APOL3 的表达降低参与 CRC 的恶性进展,表现为 TNM 分期升高及淋巴结转移。分析其机制,APOL3 作为一种载脂蛋白,其表达降低能够调控脂质转运信号抑制机体的抗肿瘤免疫能力,发挥肿瘤促进作用。CRC 中 APOL3 的表达降低能够抑制乳酸脱氢酶 A 的泛素蛋白酶体途径的降解,促进肿瘤微环境中乳酸生成,抑制癌细胞铁死亡的发生,同时降低  $\gamma$  干扰素水平,抑制抗肿瘤免疫的 CD8 $^+$  T 细胞的浸润和细胞毒性,促进肿瘤进展<sup>[18]</sup>。此外,有学者利用单细胞测序的方法进一步证实 APOL3 的表达下调能够促进肿瘤相关巨噬细胞的浸润,并抑制 CD8 $^+$  T 淋巴细胞的浸润,导致肿瘤免疫逃逸<sup>[19]</sup>。本研究中,CRC 中 APOL3 表达下调与患者

不良临床预后相关,表明 APOL3 是新的评估 CRC 患者预后的标志物。分析其原因,APOL3 的表达降低能够抑制癌细胞铁死亡,降低癌细胞对 5-氟尿嘧啶辅助化疗和靶向治疗的有效性,导致患者不良预后。有学者通过 APOL3 信号激活剂上调 APOL3 的表达后,肿瘤免疫微环境中巨噬细胞降低,CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润增加,抑制肿瘤增殖,是潜在的 CRC 治疗策略<sup>[20]</sup>。本研究通过 ROC 曲线分析发现,PHGDH、APOL3 mRNA 联合对 CRC 患者的预后具有较高的评估价值,表明联合检测 PHGDH、APOL3 mRNA 的表达能够指导临床治疗和早期评估预后。

综上所述,CRC 中 PHGDH 升高、APOL3 降低,与 TNM 分期升高及淋巴结转移相关,联合检测 PHGDH、APOL3 mRNA 的表达有助于评估 CRC 患者的预后。临床医生可根据 CRC 组织中 PHGDH、APOL3 mRNA 的表达情况,对不同预后风险的 CRC 患者进行风险分层,对于高危患者积极辅助放化疗,以改善患者预后。本研究的不足是样本含量较少,未能利用外部数据进一步验证 PHGDH、APOL3 对 CRC 预后评估的价值,未来将设计前瞻性多中心临床试验进一步探索。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

潘艳:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王蕾:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;洪佳:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;薛建波:实施研究过程,资料搜集整理,进行统计学分析

## 参考文献

- [1] Baidoun F, Elshiw 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] 周钰杰,杨芳,严晶,等. 结直肠癌组织 miR-330-5p、PTBP1 的表达与病理参数和预后的关系 [J]. 疑难病杂志, 2024, 23(1): 68-72. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450. 2024.01.012.
- [3] 金英花,季宪锋. 3-磷酸甘油酸脱氢酶在宫颈鳞状细胞癌中高表达 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(8): 1370-1373. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992. 2022.08.006.
- [4] Rossi M, Altea-Manzano P, Demicco M, et al. PHGDH heterogeneity potentiates cancer cell dissemination and metastasis [J]. Nature, 2022, 605(7911): 747-753. DOI: 10.1038/s41586-022-04758-2.
- [5] 刘蓓,高泓浩,程莉,等. 干扰素-γ 刺激人巨噬细胞后的转录组变化与细胞内信号调控机制研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(5): 1590-1595. DOI: 10.19746/j.cnki. issn1009-2137. 2022.05.045.
- [6] Wang Z, Li X, Wang X, et al. Classification of muscle invasive bladder cancer to predict prognosis of patients treated with immunotherapy [J]. J Immunol Res, 2022, 20(2): 6737-6741. DOI: 10.1155/2022/6737241.
- [7] 国家卫生健康委员会医政司,中华医学会肿瘤学分会. 中国结直
- [8] 李雯雯,骆子荣,余卫锋,等. 结直肠癌预后相关铁死亡基因筛选及预后预测模型构建 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2024, 29(2): 160-167. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460. 2024.02.012.
- [9] Shen L, Zhang J, Zheng Z, et al. PHGDH inhibits ferroptosis and promotes malignant progression by upregulating SLC7A11 in bladder cancer [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5459-5474. DOI: 10.7150/ijbs.74546.
- [10] Zhang Y, Yu H, Zhang J, et al. Cul4A-DDB1-mediated monoubiquitination of phosphoglycerate dehydrogenase promotes colorectal cancer metastasis via increased S-adenosylmethionine [J]. J Clin Invest, 2021, 131(21): 1461-1487. DOI: 10.1172/JCI146187.
- [11] Yun HJ, Li M, Guo D, et al. AMPK-HIF-1alpha signaling enhances glucose-derived de novo serine biosynthesis to promote glioblastoma growth [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 340-352. DOI: 10.1186/s13046-023-02927-3.
- [12] Zhu H, Yu H, Zhou H, et al. Elevated nuclear PHGDH synergistically functions with cMyc to reshape the immune microenvironment of liver cancer [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(17): 2205-2213. DOI: 10.1002/advs.202205818.
- [13] Duan X, Chen Y, Zhang K, et al. PHGDH promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via Wnt/beta-catenin pathway [J]. Cell Signal, 2023, 109(8): 1107-1116. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110736.
- [14] Yamamoto T, Hayashida T, Masugi Y, et al. PRMT1 sustains de novo fatty acid synthesis by methylating PHGDH to drive chemoresistance in triple-negative breast cancer [J]. Cancer Res, 2024, 84(7): 1065-1083. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-23-2266.
- [15] Pan K, Zhao X, Xu W. The global mRNA expression profiles of inhibiting PHGDH induced cisplatin resistance in gastric cancer [J]. Cell J, 2022, 24(9): 531-539. DOI: 10.22074/cellj.2022.8046.
- [16] Khalil A, Poelvoorde P, Fayyad-Kazan M, et al. Apolipoprotein L3 interferes with endothelial tube formation via regulation of ERK1/2, FAK and Akt signaling pathway [J]. Atherosclerosis, 2018, 279(9): 73-87. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.023.
- [17] Lasut-Szyszka B, Gdowicz-Klosok A, Malachowska B, et al. Transcriptomic and proteomic study of cancer cell lines exposed to actinomycin D and nutlin-3a reveals numerous, novel candidates for p53-regulated genes [J]. Chem Biol Interact, 2024, 392(6): 1109-1116. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.110946.
- [18] Lv Y, Tang W, Xu Y, et al. Apolipoprotein L3 enhances CD8<sup>+</sup> T cell antitumor immunity of colorectal cancer by promoting LDHA-mediated ferroptosis [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(4): 1284-1298. DOI: 10.7150/ijbs.74985.
- [19] Lv Y, Zheng P, Mao Y, et al. Intratumor APOL3 delineates a distinctive immunogenic ferroptosis subset with prognosis prediction in colorectal cancer [J]. Cancer Sci, 2024, 115(1): 257-269. DOI: 10.1111/cas.16009.
- [20] Feng Y, Dai Y. APOL3-LDHA axis related immunity activation and cancer ferroptosis induction [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(5): 1401-1402. DOI: 10.7150/ijbs.83342.

肠癌诊疗规范(2023 版) [J]. 协和医学杂志, 2023, 14(4): 706-733. DOI: 10.12290/xhyxzz.2023-0315.

[8] 李雯雯,骆子荣,余卫锋,等. 结直肠癌预后相关铁死亡基因筛选及预后预测模型构建 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2024, 29(2): 160-167. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460. 2024.02.012.

[9] Shen L, Zhang J, Zheng Z, et al. PHGDH inhibits ferroptosis and promotes malignant progression by upregulating SLC7A11 in bladder cancer [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5459-5474. DOI: 10.7150/ijbs.74546.

[10] Zhang Y, Yu H, Zhang J, et al. Cul4A-DDB1-mediated monoubiquitination of phosphoglycerate dehydrogenase promotes colorectal cancer metastasis via increased S-adenosylmethionine [J]. J Clin Invest, 2021, 131(21): 1461-1487. DOI: 10.1172/JCI146187.

[11] Yun HJ, Li M, Guo D, et al. AMPK-HIF-1alpha signaling enhances glucose-derived de novo serine biosynthesis to promote glioblastoma growth [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 340-352. DOI: 10.1186/s13046-023-02927-3.

[12] Zhu H, Yu H, Zhou H, et al. Elevated nuclear PHGDH synergistically functions with cMyc to reshape the immune microenvironment of liver cancer [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(17): 2205-2213. DOI: 10.1002/advs.202205818.

[13] Duan X, Chen Y, Zhang K, et al. PHGDH promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via Wnt/beta-catenin pathway [J]. Cell Signal, 2023, 109(8): 1107-1116. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110736.

[14] Yamamoto T, Hayashida T, Masugi Y, et al. PRMT1 sustains de novo fatty acid synthesis by methylating PHGDH to drive chemoresistance in triple-negative breast cancer [J]. Cancer Res, 2024, 84(7): 1065-1083. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-23-2266.

[15] Pan K, Zhao X, Xu W. The global mRNA expression profiles of inhibiting PHGDH induced cisplatin resistance in gastric cancer [J]. Cell J, 2022, 24(9): 531-539. DOI: 10.22074/cellj.2022.8046.

[16] Khalil A, Poelvoorde P, Fayyad-Kazan M, et al. Apolipoprotein L3 interferes with endothelial tube formation via regulation of ERK1/2, FAK and Akt signaling pathway [J]. Atherosclerosis, 2018, 279(9): 73-87. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.023.

[17] Lasut-Szyszka B, Gdowicz-Klosok A, Malachowska B, et al. Transcriptomic and proteomic study of cancer cell lines exposed to actinomycin D and nutlin-3a reveals numerous, novel candidates for p53-regulated genes [J]. Chem Biol Interact, 2024, 392(6): 1109-1116. DOI: 10.1016/j.cbi.2024.110946.

[18] Lv Y, Tang W, Xu Y, et al. Apolipoprotein L3 enhances CD8<sup>+</sup> T cell antitumor immunity of colorectal cancer by promoting LDHA-mediated ferroptosis [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(4): 1284-1298. DOI: 10.7150/ijbs.74985.

[19] Lv Y, Zheng P, Mao Y, et al. Intratumor APOL3 delineates a distinctive immunogenic ferroptosis subset with prognosis prediction in colorectal cancer [J]. Cancer Sci, 2024, 115(1): 257-269. DOI: 10.1111/cas.16009.

[20] Feng Y, Dai Y. APOL3-LDHA axis related immunity activation and cancer ferroptosis induction [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(5): 1401-1402. DOI: 10.7150/ijbs.83342.

(收稿日期:2024-06-25)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 005

PCR 技术与肿瘤

# 喉癌肿瘤组织 NOC2L、p53 表达及其临床价值研究

凡丹丹, 高芳芳, 邹婧, 李鹏程

基金项目: 湖北省科技厅基金项目(2020CFA767)

作者单位: 430074 武汉大学附属同仁医院/武汉市第三医院耳鼻喉科(凡丹丹、高芳芳、邹婧); 430022 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心(李鹏程)

通信作者: 李鹏程, E-mail: lipc1981@163.com



**【摘要】 目的** 检测喉癌肿瘤组织中 NOC2L、p53 mRNA 表达并研究其临床价值。**方法** 选取 2020 年 1 月—2022 年 1 月武汉大学附属同仁医院诊治的喉癌患者 103 例(喉癌组)和喉良性疾病患者 57 例(对照组)。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测组织 NOC2L、p53 mRNA 表达。比较喉癌不同临床病理特征中肿瘤组织 NOC2L、p53 mRNA 表达差异。受试者工作特征(ROC)曲线分析肿瘤组织 NOC2L、p53 表达预测喉癌患者预后不良的价值;多因素 Cox 回归模型分析喉癌预后不良的危险因素;Kaplan-Meier 模型分析 NOC2L、p53 表达对喉癌生存期的影响。**结果** 与对照组比较,喉癌组患者 NOC2L 表达升高, p53 表达降低( $t/P = 19.307/ < 0.001, 13.726/ < 0.001$ )。组织学分级 3 级、原发肿瘤大小  $\geq 3$  cm、转移淋巴结数 N2 ~ 3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III ~ IV 期喉癌患者肿瘤组织 NOC2L mRNA 表达高于组织学分级 1 ~ 2 级、原发肿瘤大小  $< 3$  cm、转移淋巴结数 N0 ~ 1、远处转移 M0 及 TNM 分期 I ~ II 期患者( $t/P = 3.681/0.001, 4.167/ < 0.001, 2.554/0.012, 4.005/ < 0.001, 3.228/ < 0.001$ ), p53 mRNA 表达低于组织学分级 1 ~ 2 级、原发肿瘤大小  $< 3$  cm、转移淋巴结数 N0 ~ 1、远处转移 M0 及 TNM 分期 I ~ II 期患者( $t/P = 4.162/ < 0.001, 4.789/ < 0.001, 4.053/ < 0.001, 3.492/ < 0.001, 3.724/ < 0.001$ );NOC2L、p53 及二者联合预测喉癌预后不良的 AUC 分别为 0.756、0.712、0.917, 二者联合优于各自单独预测效能( $Z = 7.238, 8.102, P < 0.001$ )。NOC2L  $\geq 0.73$ , p53  $\leq 0.65$ 、组织学分级 3 级、原发肿瘤大小  $\geq 3$  cm、转移淋巴结数 N2 ~ 3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III ~ IV 期为喉癌预后不良的独立危险因素 [ $HR(95\% CI) = 5.328 (1.455 \sim 9.201), 4.200 (1.279 \sim 7.122), 1.992 (1.127 \sim 2.857), 2.164 (1.099 \sim 3.299), 2.228 (1.304 \sim 3.152), 2.406 (1.131 \sim 3.681), 2.514 (1.278 \sim 3.762)$ ]; NOC2L  $\geq 0.81$  且 p53  $\leq 0.54$  喉癌患者中位生存期显著低于 NOC2L  $< 0.81$  或 p53  $> 0.54$  患者中位生存期 ( $\text{Log Rank } \chi^2 = 9.033, P < 0.001$ )。**结论** 喉癌患者 NOC2L 及 p53 表达与病情严重程度及生存期显著相关, 可为喉癌病情及预后评估提供客观证据, NOC2L 及 p53 联合检测可显著提高其临床价值。

【关键词】 喉癌; NOC2L; p53; 肿瘤组织; 临床价值

【中图分类号】 R739.65

【文献标识码】 A

**Expression of NOC2L and p53 in laryngeal carcinoma tumor tissue and its clinical value** Fan Dandan\*, Gao Fangfang, Zou Jing, Li Pengcheng. \*Department of Otolaryngology, Wuhan Third Hospital, Hubei, Wuhan 430074, China

**Funding program:** Hubei Provincial Science and Technology Department Project (2020CFA767)

**Corresponding author:** Li Pengcheng, E-mail: lipc1981@163.com

**[Abstract]** **Objective** To detect the NOC2L and p53 gene mRNA expression in laryngeal cancer tumor tissues and study their clinical value. **Methods** A total of 103 patients with laryngeal cancer (laryngeal cancer group) and 57 patients with benign laryngeal diseases (control group) from January 2020 to January 2022 were selected as the research subjects. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of NOC2L and p53 in tissues. The differences in the expression of NOC2L and p53 in tumor tissues of laryngeal carcinoma with different clinical pathological characteristics were compared. The ROC curve was used to analyze the sensitivity and specificity of NOC2L and p53 expression in predicting the poor prognosis of laryngeal cancer patients; the multivariate Cox regression model was used to analyze the risk factors for poor prognosis of laryngeal cancer; the Kaplan Meier model was used to analyze the effect of NOC2L and p53 expression on the survival of laryngeal cancer. **Results** Compared with the control group, NOC2L expression was increased and p53 expression was decreased in the laryngeal cancer group ( $t/P = 19.307/ < 0.001, 13.726/ < 0.001$ ). NOC2L expression was higher in laryngeal cancer patients with histological grade 3, primary tumor diameter  $\geq 3$  cm,

number of metastatic lymph nodes N2~N3, distant metastasis M1 and TNM stage III~IV than in patients with histological grade 1~2, primary tumor diameter <3 cm, number of metastatic lymph nodes N0~N1, distant metastasis M0 and TNM stage I~II ( $t/P = 3.681 / <0.001, 4.167 / <0.001, 2.554 / 0.012, 4.005 / <0.001, 3.228 / <0.001$ ), while p53 expression was lower in patients with histological grade 1~2, primary tumor diameter <3 cm, number of metastatic lymph nodes N0~N1, distant metastasis M0 and TNM stage I~II patients ( $t/P = 4.162 / <0.001, 4.789 / <0.001, 4.053 / <0.001, 3.492 / <0.001, 3.724 / <0.001$ ); the AUCs of NOC2L, p53 and their combination for predicting poor prognosis of laryngeal cancer were 0.756, 0.712 and 0.917, respectively, and the combination of the two was superior to the single prediction efficiency ( $Z = 7.238, 8.102, P < 0.001$ ). NOC2L  $\geq 0.73$ , p53  $\leq 0.65$ , histological grade 3, primary tumor diameter  $\geq 3$  cm, number of metastatic lymph nodes N2~N3, distant metastasis M1 and TNM stage III~IV were independent risk factors for poor prognosis of laryngeal cancer [ $HR(95\% CI) = 5.328(1.455 - 9.201), 4.200(1.279 - 7.122), 1.992(1.127 - 2.857), 2.164(1.099 - 3.299), 2.228(1.304 - 3.152), 2.406(1.131 - 3.681), 2.514(1.278 - 3.762)$ ]; The median survival of laryngeal cancer patients with NOC2L  $\geq 0.81$  and p53  $\leq 0.54$  was significantly lower than that of patients with NOC2L  $< 0.81$  or p53  $> 0.54$  (median survival  $24.61 \pm 4.39$  months vs.  $30.57 \pm 5.08$  months, Log Rank = 9.033,  $P < 0.001$ ).

**Conclusion** The expression of NOC2L and p53 in patients with laryngeal cancer is significantly related to the severity of the disease and survival time, which can provide objective evidence for the evaluation of the condition and prognosis of laryngeal cancer. The combination of NOC2L and p53 can significantly improve its clinical value.

**[Key words]** Laryngeal cancer; NOC2L; p53; Tumor tissue; Clinical value

基因表达异常与喉癌病情严重程度及生存期等显著相关,可为喉癌病情及预后评估提供基因水平的客观证据<sup>[1]</sup>。p53 具有调控细胞周期、基因转录及翻译等功能,其表达下降与多种恶性肿瘤发病机制紧密相关<sup>[2]</sup>。研究发现,p53 与喉癌病情及预后存在关联,评估喉癌病情及预后的临床价值高于传统的 TNM 分期,但因存在敏感度及特异度不高等缺点而限制其临床广泛应用<sup>[3]</sup>。NOC2 类核仁相关转录阻遏物(NOC2L)为具有组蛋白乙酰转移酶抑制因子活性的转录辅抑制因子,可与靶基因 p53 结合后抑制 p300/CBP 对组蛋白的乙酰化修饰,最终抑制 p53 依赖的下游基因激活而发挥调控功能<sup>[4~5]</sup>。NOC2L 作为新近发现的类抑癌基因,在恶性肿瘤发病机制中的作用研究极少,尤其在喉癌中尚无研究。研究发现,NOC2L 在肝癌中表达显著升高,体外实验促进 NOC2L 表达后肝癌细胞增殖及迁移能力恶性生物学行为增强<sup>[6]</sup>。本研究旨在检测喉癌患者肿瘤组织 NOC2L、p53 mRNA 表达并研究其在喉癌病情及预后评估中的临床价值,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 1 月—2022 年 1 月武汉大学附属同仁医院诊疗的喉癌患者 103 例(喉癌组)和喉良性疾病患者 57 例(对照组),2 组患者一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性,见表 1。本研究经医院医学伦理委员会审核批准(YLL092),患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 喉癌组病例选择标准 (1)纳入标准:①喉镜活检或术后病理检查确诊,符合《喉癌外科手术及综合治疗专家共识》诊断标准<sup>[7]</sup>;②首次起病且既往未行

表 1 对照组与喉癌组患者临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical data between control group and laryngeal cancer group patients

项 目	对照组 (n=57)		喉癌组 (n=103)		$t/\chi^2$ 值	P 值
性别[例(%)]	男	35(61.40)	67(65.05)	0.211	0.646	
	女	22(38.60)	36(34.95)			
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)	$57.11 \pm 8.27$		$57.25 \pm 8.34$		0.102	0.919
BMI( $\bar{x} \pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	$22.47 \pm 4.22$		$22.62 \pm 4.19$		0.216	0.829
KPS 评分( $\bar{x} \pm s$ ,分)	$95.06 \pm 3.83$		$95.18 \pm 3.76$		0.192	0.848
吸烟史[例(%)]	31(54.39)		58(56.31)		0.055	0.814
饮酒史[例(%)]	8(14.04)		11(10.68)		0.395	0.529
糖尿病史[例(%)]	10(17.54)		17(16.50)		0.028	0.867
高血压史[例(%)]	12(21.05)		19(18.45)		0.159	0.689

相关治疗;③可配合本研究;④临床病理资料完整;⑤可取得明确病理组织,有明确的 TNM 分期。(2)排除标准:①合并其他喉良恶性肿瘤,喉转移瘤;②严重心、脑、肺血管疾病;③预计生存期 <3 个月者。

### 1.3 观测指标与方法

1.3.1 组织 NOC2L 及 p53 检测:喉癌组和对照组患者均取病理活检组织,采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 NOC2L 及 p53 基因 mRNA 表达。RNA 提取试剂盒购自武汉基因美公司;实时荧光定量 PCR 检测试剂购自武汉菲恩公司;PCR 扩增仪器购自美国 Bio-Rad 公司(CFXOpus96)。根据操作说明书提取活检组织总 RNA,逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增,NOCL2 上游引物为 5'-CCTTCCTCTACATCCGACAGCT-3',下游引物为 5'-GCAGGATCTCACTGGAACCAAG-3';p53 上游引物为 5'-CCTCAGCATCTTATCCGACTG-3',下

游引物为 5'-TGGATGCTCGTACACTCAGACC-3'； GAPDH 上游引物为 5'-GTCTCCCTCTGACTTCAA-CAGCG-3'，下游引物为 5'-ACCACCCCTGTTGCTG-TAGCCAA-3'。扩增总体积为 25 μl，循环反应条件设置：56℃下 18 min, 95℃ 预变性 60 s, 56℃ 退火 60 s, 63℃ 延伸 30 s, 28 个扩增循环后结束。分别以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 NOC2L 及 p53 相对 GAPDH 表达量。

1.3.2 随访及预后观察：对喉癌患者每 3 个月门诊复查随访 1 次，随访截止时间为 2024 年 4 月。根据随访复查结果分析患者生存期并评估预后状况，随访过程中出现喉癌复发转移、严重肿瘤相关并发症等表示喉癌预后不良。

1.4 统计学方法 采用 OriginPro 2020 软件统计分析数据。符合正态分布计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示，组间均数比较采用独立样本 *t* 检验；计数资料以频数或率（%）表示，比较采用  $\chi^2$  检验；受试者工作特征（ROC）曲线分析 NOC2L、p53 表达在喉癌预后不良预测中的敏感度及特异度，并采用 DeLong 法比较差异；对单因素分析中有统计学差异的指标纳入多因素 Cox 回归模型分析喉癌预后不良的危险因素；Kaplan-Meier 生存模型分析 NOC2L、p53 表达与喉癌生存期的关系，并行 Log Rank 检验比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 2 组 NOC2L、p53 表达比较 与对照组比较，喉癌组患者 NOC2L 表达升高，p53 表达降低，差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见表 2。

表 2 对照组和喉癌组患者 NOC2L 和 p53 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of NOC2L and p53 expression between control group and laryngeal cancer group patients

组别	例数	NOC2L	p53
对照组	57	0.41 ± 0.08	0.89 ± 0.13
喉癌组	103	0.73 ± 0.11	0.65 ± 0.09
<i>t</i> 值		19.307	13.726
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 肿瘤组织 NOC2L、p53 表达在喉癌不同临床/病理特征中差异比较 喉癌组患者肿瘤组织中 NOC2L、p53 基因 mRNA 表达在不同性别、年龄、病灶部位及病理活检分型中比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，在组织学分级 3 级、原发肿瘤大小  $\geq 3$  cm、转移淋巴结数 N2 ~ 3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III ~ IV 期患者肿瘤组织中 NOC2L 表达高于组织学分级 1 ~ 2 级、原发肿瘤大小  $< 3$  cm、转移淋巴结数 N0 ~ 1、远处转移 M0 及 TNM 分期 I ~ II 期患者，而 p53 表达则降低，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见表 3。

2.3 NOC2L、p53 预测喉癌预后不良效能分析 绘制肿瘤组织 NOC2L、p53 预测喉癌预后不良效能 ROC 曲线，并计算曲线下面积 (AUC)，结果显示：肿瘤组织 NOC2L、p53 及二者联合预测喉癌预后不良的 AUC 分别为 0.756、0.712、0.917，二者联合优于各自单独预测效能 ( $Z = 7.238, 8.102, P < 0.001$ )，见表 4、图 1。

2.4 多因素 Cox 回归分析喉癌预后不良危险因素 以喉癌预后不良为因变量（赋值：是为“1”；否为“0”），以 2.2 结果中  $P < 0.05$  项目 (NOC2L、p53、组织

表 3 喉癌肿瘤组织 NOC2L、p53 基因 mRNA 表达在不同临床/病理特征中差异比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of mRNA expression of NOC2L and p53 genes in different clinical/pathological features of laryngeal cancer tumor tissues

项 目		例数	NOC2L	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	p53	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别	男	67	0.74 ± 0.13	0.822	0.413	0.64 ± 0.08	1.058	0.293
	女	36	0.72 ± 0.09			0.66 ± 0.11		
年龄	≥60 岁	41	0.72 ± 0.12	0.788	0.433	0.67 ± 0.12	1.488	0.151
	<60 岁	62	0.74 ± 0.13			0.64 ± 0.09		
病灶部位	声门上或声门型	85	0.74 ± 0.09	1.208	0.231	0.63 ± 0.09	1.234	0.221
	声门下型	18	0.71 ± 0.12			0.66 ± 0.11		
病理分型	鳞癌	91	0.72 ± 0.13	0.497	0.621	0.64 ± 0.08	0.791	0.432
	其他	12	0.74 ± 0.14			0.66 ± 0.10		
组织学分级	1 ~ 2 级	74	0.69 ± 0.07	3.681	0.001	0.66 ± 0.11	4.162	<0.001
	3 级	29	0.76 ± 0.12			0.57 ± 0.06		
原发肿瘤大小	<3 cm	48	0.67 ± 0.08	4.167	<0.001	0.68 ± 0.11	4.789	<0.001
	≥3 cm	55	0.75 ± 0.11			0.59 ± 0.08		
转移淋巴结数	N0 ~ 1	40	0.70 ± 0.09	2.554	0.012	0.69 ± 0.13	4.053	<0.001
	N2 ~ 3	63	0.76 ± 0.13			0.61 ± 0.07		
远处转移	M0	84	0.68 ± 0.08	4.005	<0.001	0.67 ± 0.12	3.492	<0.001
	M1	19	0.77 ± 0.12			0.57 ± 0.07		
TNM 分期	I ~ II 期	43	0.68 ± 0.09	3.228	<0.001	0.68 ± 0.12	3.724	<0.001
	III ~ IV 期	60	0.75 ± 0.12			0.61 ± 0.07		

学分级、原发肿瘤大小、转移淋巴结数、远处转移、TNM 分期)为自变量进行多因素 Cox 回归分析,结果显示:NOC2L $\geq 0.73$ 、p53 $\leq 0.65$ 、组织学分级 3 级、原发肿瘤大小 $\geq 3$  cm、转移淋巴结数 N2~3、远处转移 M1 及 TNM 分期 III~IV 期为喉癌预后不良的独立危险因素( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 4 肿瘤组织 NOC2L、p53 表达预测喉癌不良预后效能分析

**Tab. 4** Analysis of the predictive efficacy of NOC2L and p53 expression in predicting poor prognosis of laryngeal cancer in tumor tissue

指 标	截断值	AUC	95% CI	敏感度	特异度	约登指数
NOC2L	0.81	0.756	0.511~1.061	0.746	0.764	0.511
p53	0.54	0.712	0.462~0.962	0.712	0.701	0.413
二者联合		0.917	0.583~1.369	0.877	0.892	0.779

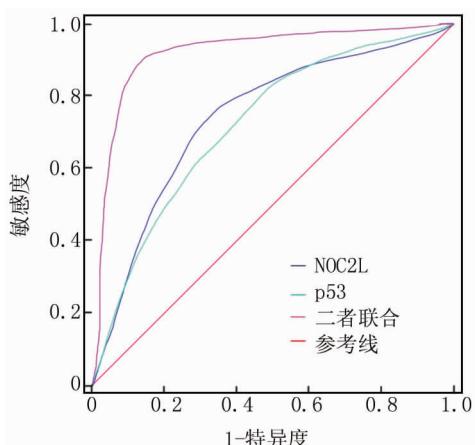


图 1 肿瘤组织 NOC2L、p53 预测喉癌预后不良效能 ROC 分析

**Fig. 1** ROC analysis of the predictive efficacy of NOC2L and p53 in predicting poor prognosis of laryngeal cancer in tumor tissue

表 5 多因素 Cox 回归分析喉癌患者预后不良危险因素

**Tab. 5** Multivariate Cox regression analysis of risk factors for poor prognosis in laryngeal cancer patients

变 量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	HR 值	95% CI
NOC2L $\geq 0.73$	1.673	0.125	16.981	0.005	5.328	1.455~9.201
p53 $\leq 0.65$	1.435	0.117	15.024	0.008	4.200	1.279~7.122
组织学分级 3 级	0.689	0.083	11.145	0.016	1.992	1.127~2.857
原发肿瘤 $\geq 3$ cm	0.772	0.094	9.701	0.027	2.164	1.099~3.299
转移淋巴结数 N2~3	0.801	0.087	9.344	0.029	2.228	1.304~3.152
远处转移 M1	0.878	0.091	11.256	0.014	2.406	1.131~3.681
TNM 分期 III~IV 期	0.922	0.082	10.124	0.021	2.514	1.278~3.762

2.5 NOC2L、p53 表达与喉癌生存期分析 喉癌患者 103 例随访结束时存活 38 例(36.89%),死亡 65 例(63.11%)。NOC2L $\geq 0.81$  且 p53 $\leq 0.54$  喉癌患者中位生存期为(24.61 ± 4.39)月,而 NOC2L < 0.81 或

p53 > 0.54 喉癌患者中位生存期为(30.57 ± 5.08)月,NOC2L $\geq 0.81$  且 p53 $\leq 0.54$  喉癌患者中位生存期显著低于 NOC2L < 0.81 或 p53 > 0.54 患者(Log Rank  $\chi^2 = 9.033, P < 0.001$ )。

### 3 讨 论

p53 为目前研究最深入的“广谱”抑癌基因,在正常细胞的细胞核内与 E3 泛素连接酶相互作用,被泛素化后转运到细胞质中由蛋白酶体降解,在癌基因激活及细胞乏氧等因素时 p53 水平显著升高,可将细胞周期阻滞在 G1 期并促进细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。作为最早发现的抑癌基因,p53 在多种恶性肿瘤中可被检测到基因突变导致的表达异常,基因突变导致肿瘤抑制功能下调,引起肿瘤细胞恶性生物学行为及局部微环境、肿瘤免疫等失去调控<sup>[10-11]</sup>。目前研究证实,p53 与喉癌的发病机制、病情及预后密切相关,p53 自身或作为其他基因靶标调控喉癌细胞的恶性生物学行为<sup>[12-13]</sup>。谷佳<sup>[14]</sup>发现 miR-552 通过介导 p53 基因表达促进喉癌细胞增殖及侵袭。Niu 等<sup>[15]</sup>发现 USP7 通过靶向调控 p53 基因可促进喉癌细胞对放疗的敏感性。Kara 等<sup>[16]</sup>检测喉癌组织 p53 表达,发现其水平显著降低且为预后不良的标志物。越来越多的研究证实,p53 可为喉癌病情及预后评估提供基因水平的客观证据,但单独 p53 预测喉癌预后不良的敏感度及特异度较低而限制其临床应用<sup>[17]</sup>。本研究中,喉癌组织 p53 表达显著降低,且与组织学分级、原发肿瘤大小、转移淋巴结数、远处转移及 TNM 分期相关,证实 p53 在喉癌中扮演抑癌基因功能。

NOC2L 可阻断 p53 与 MDM2 的乙酰化,导致去乙酰化的 p53 更易与抑制性 MDM2 结合而抑制其抑癌基因功能,研究证实 NOC2L/p53 信号通路在肿瘤能量代谢、增殖迁移及上皮间质转化中扮演关键角色<sup>[18-19]</sup>。Aurora B 在细胞分裂过程中对维持细胞完整性起着不可或缺的作用,通过指导有丝分裂过程中的染色体和细胞骨架运动来调节细胞周期,NOC2L、Aurora B 与 p53 形成复合物,在 Ser183、Ser269 和 Thr284 位点对 p53 进行磷酸化而抑制 p53 活性<sup>[18]</sup>。Chen 等<sup>[20]</sup>发现敲低 NOC2L 表达后可通过介导 FOXO3 基因抑制乳腺癌细胞增殖。NOC2L 在喉癌中的表达尚无研究,基于 NOC2L/p53 信号通路功能推测 NOC2L 可能在喉癌中具有促癌作用。本研究中,喉癌组织 NOC2L 表达显著增高且与组织学分级、原发肿瘤大小、转移淋巴结数、远处转移及 TNM 分期相关,提示 NOC2L 在喉癌发病机制中具有促癌基因功能,同时与喉癌病情及预后密切相关。

目前喉癌患者病情及预后评估主要依赖于术前喉

部增强 MR 及术后病理组织学检测,前者易受检查机器精度及影像科医生临床经验的影响,后者依赖于病理标本获取而导致其普适性差,因两者敏感度及特异度低而影响其临床应用,随着喉癌相关的新型抑癌基因或促癌基因发现,越来越多的研究证实基因检测的倍增放大优势在临床上的应用价值更高,敏感度及特异度高于传统的临床评价方法及检测指标<sup>[21-22]</sup>。既往研究证实,p53 基因在喉癌中表达显著下调,评估喉癌预后不良的效能高于传统的 TNM 分期,但单独 p53 检测仍存在敏感度及特异度低的缺点。随着基因检测技术和仪器精密度的提高,多个标志物联合检测具有更高的敏感度及特异度,避免了单一标志物检测敏感度及特异度低的缺点<sup>[23]</sup>。基于 NOC2L/p53 信号通路功能推测 NOC2L、p53 联合检测可能更具有临床应用价值。本研究中,NOCL 及 p53 二者联合优于各自单独预测效能,表明 NOC2L 联合 p53 检测可显著提高在喉癌预后不良预测中的临床价值,提示实际临床应用中应将 NOC2L、p53 两者相结合以提高喉癌诊疗水平。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

凡丹丹:标本收集检测,论文撰写;高芳芳、邹婧:数据收集与统计分析、论文修改;李鹏程:研究方案提出及设计,标本检测,论文审核,经费支持

#### 参考文献

- [1] Migliorelli A, Caranti A, Ferrarini L, et al. Oncological features and outcomes of laryngeal cancer surgery: A multicentric study [J]. *Mi-nerva Surg*, 2024, 79 (2) : 140-146. DOI: 10. 23736/S2724-5691. 23. 09950-1.
- [2] 黄超,方兴刚,陈璐,等.益母草碱调节 Akt/MDM2/p53 信号通路对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J].疑难病杂志,2023,22(10):1090-1097. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 10. 015.
- [3] Tan A, Eskizmir G, Kamiloglu U, et al. p53 and PTEN expression evaluation with molecular evident recent criteria in laryngeal carcinoma [J]. *Medicine ( Baltimore )*, 2023, 102 (19) : e33676. DOI: 10. 1097/MD. 0000000000033676.
- [4] Lu S, Chen Z, Liu Z, et al. Unmasking the biological function and regulatory mechanism of NOC2L: A novel inhibitor of histone acetyltransferase [J]. *J Transl Med*, 2023, 21 (1) : 31. DOI: 10. 1186/s12967-023-03877-2.
- [5] Abdalla Abdelaziz MA, Nelson VK, Kumarasamy M, et al. Anticancer effect of polyphenolic acid enriched fractions from *Grewia bracteata* Roth on tumor cells and their p53 gene independent ROS mediated apoptosis in colon cancer cells [J]. *Toxicon*, 2023, 233 (7) : 107243. DOI: 10. 1016/j. toxicon. 2023. 107243.
- [6] 王玲. NOC2L 在肝细胞癌中的作用和分子机制研究 [D]. 北京:北京大学医学部,2022.
- [7] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会头颈学组,李晓明. 喉癌外科手术及综合治疗专家共识 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,49(8) : 620-626. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-0860. 2014. 08. 002.
- [8] 翟海晖,刘元祺,张从政,等. P53 与肿瘤代谢的最新研究进展 [J]. 中国癌症杂志,2023,33 (11) : 1032-1040. DOI: 10. 19401/j. cnki. 1007-3639. 2023. 11. 009.
- [9] Singh D. Graphene oxide (GO) layered bioconjugates: An effective strategy for delivering p53 Gene for adenocarcinoma [J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2024 (1) : 35-51. DOI: 10. 2174/0118722105290129240122104901.
- [10] Ooi YJ, Wen Y, Zhu J, et al. Codelivery of doxorubicin and p53 Gene by  $\beta$ -cyclodextrin-based supramolecular nanoparticles formed via host-guest complexation and electrostatic interaction [J]. *Biomacromolecules*, 2024, 25 (5) : 2980-2989. DOI: 10. 1021/acs.biomac. 4c00123.
- [11] Dokunmu TM, Opara SC, Imaga NA, et al. P53 Gene expression and nitric oxide levels after artemisinin-caffeine treatment in breast, lungs and liver of DMBA-induced tumorigenesis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24 (2) : 451-458. DOI: 10. 31557/APJCP. 2023. 24. 2. 451.
- [12] Cheng F, Zhao S, Li J, et al. Enhanced effect of recombinant adenoviruses co-expression of ING4 and OSM on anti-tumour activity of laryngeal cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26 (5) : 1556-1566. DOI: 10. 1111/jcmm. 17192.
- [13] Wu Z, Zhu Z, Fu L. Integrating GEO, network pharmacology, and in vitro assays to explore the pharmacological mechanism of *Bruceae Fructus* against laryngeal cancer [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397 (1) : 4165-4181. DOI: 10. 1007/s00210-023-02869-9.
- [14] 谷佳. miR-552 通过靶向 p53 调控喉癌细胞生长、转移和干性的研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2022.
- [15] Niu H, Zhu Y, Wang J, et al. Effects of USP7 on radiation sensitivity through p53 pathway in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2022, 22 (9) : 101466. DOI: 10. 1016/j. tranon. 2022. 101466.
- [16] Kara A, Turan G, Guven M, et al. Ki-67, p-53, E-Cadherin, and  $\beta$ -Catenin expression of advanced glotto-subglottic and supraglottic larynx carcinomas [J]. *Niger J Clin Pract*, 2022, 25 (9) : 1424-1429. DOI: 10. 4103/njcp. njcp\_1693\_21.
- [17] 艾合买提江·艾力江. 喉癌患者中 P16、P53 和 Ki-67 表达与临床病理特征及预后的关系 [D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2022.
- [18] Li Y, Wang L, Liu X, et al. NIR promotes progression of colorectal cancer through regulating RB [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868 (1) : 118856. DOI: 10. 1016/j. bbamcr. 2020. 118856.
- [19] Wu L, Ma CA, Zhao Y, et al. Aurora B interacts with NIR-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (3) : 2236-2244. DOI: 10. 1074/jbc. M110. 174755.
- [20] Chen B, Dong C, Wang F, et al. Knockdown of NIR suppresses breast cancer cell proliferation via promoting FOXO3 [J]. *Oncotargets Ther*, 2021, 14 (6) : 637-651. DOI: 10. 2147/OTT. S287464.
- [21] Woodley N, Rogers A, Turnbull K, et al. Prognostic scores in laryngeal cancer [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2022, 279 (7) : 3705-3715. DOI: 10. 1007/s00405-021-07233-2.
- [22] Itamura K, Hsue VB, Barbu AM, et al. Diagnostic assessment (imaging) and staging of laryngeal cancer [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2023, 56 (2) : 215-231. DOI: 10. 1016/j. otc. 2022. 12. 006.
- [23] 曾妮,高芳芳,王爱华,等. miR-552 和 HSP90 $\alpha$  与喉癌临床病理因素及预后的相关性研究 [J]. 疑难病杂志,2024,23 (1) : 57-62. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2024. 01. 010.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 006

PCR 技术与肿瘤

# 肿瘤组织 miR-23a 联合 MELK 检测在骨肉瘤病情及预后评估中的临床价值

杨琼, 李健伟, 曾寒, 欧阳柳, 郑冲



基金项目: 湖北省自然科学基金(WJ2019A167)

作者单位: 430081 武汉科技大学附属普仁医院骨科(杨琼、曾寒), 手足显微外科(李健伟); 430022 武汉, 华中科技大学

同济医学院附属协和医院(欧阳柳); 441000 襄阳, 湖北文理学院附属襄阳市中心医院(郑冲)

通信作者: 郑冲, E-mail: 1750851815@qq.com

**【摘要】 目的** 分析肿瘤组织微小核糖核酸-23a(miR-23a)联合母体胚胎亮氨酸拉链激酶(MELK)水平对骨肉瘤病情及预后评估的临床价值。**方法** 选择2019年1月—2022年1月武汉科技大学附属普仁医院骨科诊治的骨肉瘤患者93例为研究组, 骨良性疾病患者53例为对照组。采用实时荧光定量PCR法检测组织miR-23a、MELK表达水平; 采用受试者工作特征(ROC)曲线分析肿瘤组织miR-23a、MELK水平预测骨肉瘤患者预后不良的价值; 多因素Cox回归分析骨肉瘤患者预后不良的危险因素; Kaplan-Meier模型分析miR-23a、MELK表达对骨肉瘤患者生存期的影响。**结果** 研究组肿瘤组织miR-23a、MELK表达水平显著高于对照组( $t/P = 12.127 / < 0.001, 11.291 / < 0.001$ ); 肿瘤最大径 $\geq 5$  cm、有远处转移、Enneking分期Ⅲ期的骨肉瘤患者miR-23a、MELK表达高于肿瘤最大径 $< 5$  cm、无远处转移、Enneking分期Ⅰ~Ⅱ期患者(miR-23a:  $t/P = 8.357 / < 0.001, 9.112 / < 0.001, 6.531 / < 0.001$ ; MELK:  $t/P = 11.265 / < 0.001, 9.787 / < 0.001, 10.462 / < 0.001$ ); miR-23a、MELK水平及二者联合预测骨肉瘤患者预后不良的AUC分别为0.781、0.773、0.901, 二者联合的AUC大于单独预测的AUC( $Z/P = 6.431 / < 0.001, 0.705 / < 0.001$ ); Cox回归分析显示, miR-23a高表达、MELK高表达、肿瘤最大径 $\geq 5$  cm、有远处转移、Enneking分期Ⅲ期为骨肉瘤患者预后不良的独立危险因素[ $OR(95\%CI) = 4.100(1.426 \sim 6.774), 4.023(1.279 \sim 6.767), 2.250(1.041 \sim 3.459), 2.396(1.117 \sim 3.675), 2.489(1.028 \sim 3.951)$ ]; miR-23a $\geq 1.14$ 且MELK $\geq 0.73$ 的骨肉瘤患者中位生存期显著低于miR-23a $< 1.14$ 或MELK $< 0.73$ 的患者(中位生存期24.38月 $\pm 4.52$ 月 vs. 32.74月 $\pm 5.16$ 月, Log Rank  $\chi^2 = 9.821, P < 0.001$ )。**结论** 骨肉瘤患者miR-23a和MELK表达与临床病理特征密切相关, 可为骨肉瘤病情及预后评估提供基因水平的客观证据, 二者联合检测可提高预测骨肉瘤预后不良的敏感度及特异度。

【关键词】 骨肉瘤; 微小核糖核酸-23a; 母体胚胎亮氨酸拉链激酶; 临床病理特征; 预后评估

【中图分类号】 R738.1

【文献标识码】 A

## Clinical value of miR-23a combined with MELK detection in the evaluation of osteosarcoma disease and prognosis

Yang Qiong\*, Li Jianwei, Zeng Han, Ouyang Liu, Zheng Chong. \* Department of Orthopedics, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Hubei Province, Wuhan 430081, China

Funding program: Hubei Natural Science Foundation (WJ2019A167)

Corresponding author: Zheng Chong, E-mail: 1750851815@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To analyze the clinical value of micrornucleic acid 23a (miR-23a) combined with maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) levels in assessing the condition and prognosis of osteosarcoma. **Methods** Ninety-three patients with osteosarcoma (study group) and 53 patients with benign bone diseases (control group) from Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology between January 2019 and January 2022 were selected as study. The real time fluorescence quantitative PCR method was used to detect the expression levels of tissue miR-23a and MELK; the receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the value of tumor tissue miR-23a and MELK levels in predicting the poor prognosis of patients with osteosarcoma; Multivariate Cox regression analysis of risk factors for poor prognosis in patients with osteosarcoma; Kaplan-Meier model analyzed the impact of miR-23a and MELK expression on the survival of patients with osteosarcoma. **Results** The expression levels of miR-23a and MELK in tumor

tissues of the study group were significantly higher than those of the control group ( $t/P = 12.127 / < 0.001, 11.291 / < 0.001$ ); tumors with maximum diameter  $\geq 5\text{cm}$ , distant metastasis, and Enneking stage III. The expression of miR-23a and MELK in patients with osteosarcoma were higher than that in patients with tumors with a maximum diameter  $< 5\text{cm}$ , no distant metastasis, and Enneking stage I to II ( $t/P = 8.357 / < 0.001, 11.265 / < 0.001, 9.112 / < 0.001, 9.787 / < 0.001, 6.531 / < 0.001, 10.462 / < 0.001$ ); the AUCs of miR-23a, MELK levels and their combination in predicting poor prognosis in patients with osteosarcoma are 0.781, 0.773, and 0.901 respectively, and the AUC of their combination was greater than that of miR-23a, MELK level alone ( $Z/P = 6.431 / < 0.001, 0.705 / < 0.001$ ); Cox regression analysis showed that high expression of miR-23a, high expression of MELK, maximum tumor diameter  $\geq 5\text{cm}$ , distant metastasis, Enneking stage III were independent risk factors for poor prognosis of osteosarcoma [ $OR(95\% CI) = 4.100 (1.426 - 6.774), 4.023 (1.279 - 6.767), 2.250 (1.041 - 3.459), 2.396 (1.117 - 3.675), 2.489 (1.028 - 3.951)$ ]; the median survival time of osteosarcoma patients with miR-23a  $\geq 1.14$  and MELK  $\geq 0.73$  was significantly lower than that of patients with miR-23a  $< 1.14$  or MELK  $< 0.73$  (median survival time  $24.38 \pm 4.52$  months vs.  $32.74 \pm 5.16$  months, Log Rank  $\chi^2 = 9.821, P < 0.001$ ). **Conclusion** The expression of miR-23a and MELK in patients with osteosarcoma is closely related to the clinicopathological characteristics, which can provide objective evidence at the gene level for the assessment of osteosarcoma disease and prognosis. The combined detection of the two can improve the sensitivity and specificity in predicting poor prognosis of osteosarcoma.

**【Key words】** Osteosarcoma; MicroRNA-23a; Maternal embryonic leucine zipper kinase; Clinicopathological features; Prognosis evaluation

骨肉瘤主要好发于青少年,起病隐匿且确诊时往往处于进展期,导致目前骨肉瘤近远期预后极差,提高骨肉瘤诊疗水平、改善预后为临幊上亟待解决的重大问题<sup>[1-2]</sup>。骨肉瘤的发病机制主要与基因表达异常有关,且与骨肉瘤临床病理特征及生存期直接关联,可能在骨肉瘤病情及预后评估中的临床价值高于传统的Enneking分期<sup>[3-4]</sup>。微小核糖核酸-23a(microRNA-23a, miR-23a)具有调控细胞分化、细胞周期及物质能量代谢等多种功能,可促进肿瘤细胞迁移侵袭等恶性生物学行为,在多种恶性肿瘤中表达升高且与临床病理特征相关,为其预后不良的标志物<sup>[5-6]</sup>。母体胚胎亮氨酸拉链激酶(maternal embryonic leucine zipper kinase, MELK)为多种恶性肿瘤的癌基因,参与细胞周期、细胞增殖、肿瘤生成和细胞凋亡等过程,在多种恶性肿瘤中可检测到表达异常<sup>[7-8]</sup>。目前miR-23a和MELK作为新近发现的类促癌基因,在骨肉瘤中的表达及其临床价值尚未完全明确。本研究检测骨肉瘤患者miR-23a、MELK表达并研究其临床价值,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选择2019年1月—2022年1月武汉科技大学附属普仁医院骨科诊治的骨肉瘤患者93例为研究组,另以同期诊治的骨良性疾病(取得病理组织;包括骨折36例、骨髓炎7例、骨巨细胞瘤4例、骨囊肿4例)患者51例为对照组。2组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性,见表1。本研究经武汉科技大学附属普仁医院医学伦理委员会审核通过(2019-031),患者或家属知情

同意并签署知情同意书。

表1 对照组与研究组患者临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical data between control group and study group patients

项 目	对照组 (n=51)	研究组 (n=93)	t/χ <sup>2</sup>	值 P 值
性别[例(%)]	男 28(54.90) 女 23(45.10)	52(55.91) 41(44.09)	0.014	0.907
年龄(岁)	$25.78 \pm 5.53$	$25.16 \pm 5.22$	0.667	0.506
体质量指数( $\bar{x} \pm s, \text{kg}/\text{m}^2$ )	$22.29 \pm 3.18$	$22.17 \pm 3.04$	0.223	0.824
糖尿病史[例(%)]	4(7.84)	7(7.53)	0.067	0.735
高血压史[例(%)]	6(11.76)	9(9.68)	0.154	0.695
卡氏评分( $\bar{x} \pm s$ , 分)	$22.29 \pm 3.18$	$22.17 \pm 3.04$	0.147	0.883

**1.2 研究组病例选择标准** (1)纳入标准:①经术前或术后病理组织学检查确诊,符合《骨肉瘤临床循证诊疗指南》<sup>[9]</sup>诊断标准;②临床资料完整;③术前影像学检查(CT、MR)或术后病理检查有明确的Enneking分期。(2)排除标准:①合并其他良恶性肿瘤、骨转移瘤;②无法配合本研究及失访患者;③合并神经精神疾病;④既往行相关治疗(包括手术、放化疗、免疫治疗、靶向治疗等)。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 组织miR-23a、MELK表达水平检测:**收集研究组骨肉瘤患者肿瘤组织、对照组骨良性疾病患者骨组织。提取各组组织总RNA后纯化并定量,采用实时荧光定量PCR法检测miR-23a、MELK表达水平。RNA提取试剂盒购自武汉塞维尔公司;实时荧光定量PCR检测试剂盒购自武汉爱普蒂公司;PCR扩增仪器为美国

Blue-Ray 公司 TurboCycler3。miR-23a 选择 U6 为参照,MELK 选择  $\beta$ -actin 为参照,引物序列见表 2。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分别计算 miR-23a、MELK 相对表达水平。

表 2 miR-23a 和 MELK 引物序列

Tab. 2 miR-23a and MELK Primer Sequence

基 因	上游引物	下游引物
miR-23a	5'-TTCTGGGGATGGGA-TT-3'	5'-GAACATGTCTGCGTAT-CTC-3'
MELK	5'-TCCTGTGGACAAGCC-AGTGCTA-3'	5'-GGGAGTAGCAGCACCT-GTTGAT-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CAT-3'	5'-TTTGCCTGTCATCCTTG-CG-3'
$\beta$ -actin	5'-GGGAGCCAAAAGGG-TCAT-3'	5'-GAGTCCTCCACGATAC-CAA-3'

1.3.2 随访及预后评估:研究组骨肉瘤患者每 3 个月门诊复查,随访时间 2019 年 4 月—2024 年 3 月。统计患者预后状况(存活、肿瘤复发、死亡等),其中出现骨肉瘤进展(复发或转移)、严重并发症(病理性骨折、肿瘤相关性截肢)、死亡等为预后不良。

1.4 统计学方法 采用 MedCalc 20.1 软件行统计学分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  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,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验;受试者工作特征(ROC)曲线分析 miR-23a、MELK 水平在骨肉瘤患者预后不良预测中的价值并采用 DeLong 法比较其差异;多因素 Cox 回归分析骨肉瘤患者预后不良影响因素;Kaplan-Meier 模型分析 miR-23a、MELK 表达对患者生存期的影响。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 2 组患者组织 miR-23a、MELK 表达水平比较 研究组患者 miR-23a、MELK 表达水平显著高于对照组患者,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 3。

表 3 对照组和研究组受试者组织 miR-23a、MELK 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Comparison of miR-23a and MELK expression in the tissues of control group and study group subjects

组 别	例数	miR-23a	MELK
对照组	51	0.68 ± 0.14	0.46 ± 0.08
研究组	93	1.14 ± 0.25	0.73 ± 0.16
$t$ 值		12.127	11.291
$P$ 值		<0.001	<0.001

2.2 骨肉瘤患者肿瘤组织中 miR-23a、MELK 表达在不同临床病理特征中的差异 研究组骨肉瘤患者肿瘤组织 miR-23a、MELK 表达水平在不同性别、年龄、肿瘤位置、病理类型中比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),肿瘤最大径  $\geq 5$  cm、有远处转移及 Enneking 分期 III 期患者 miR-23a、MELK 表达高于肿瘤最大径  $< 5$  cm、无远处转移及 Enneking 分期 I ~ II 期患者( $P < 0.01$ ),见表 4。

2.3 miR-23a、MELK 水平预测骨肉瘤患者预后不良的价值 绘制 miR-23a、MELK 水平单独与联合预测骨肉瘤患者预后不良的 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC),结果显示:miR-23a、MELK 水平及二者联合预测骨肉瘤患者预后不良的 AUC 分别为 0.781、0.773、0.901,二者联合的 AUC 大于单独预测的 AUC( $Z/P = 6.431 / <0.001, 0.705 / <0.001$ ),见表 5、图 1。

表 4 骨肉瘤患者肿瘤组织中 miR-23a、MELK 表达在不同临床病理特征中差异比较

Tab. 4 Comparison of miR-23a and MELK expression in tumor tissues of osteosarcoma patients with different clinical pathological features

项 目		例数	miR-23a	$t$ 值	$P$ 值	MELK	$t$ 值	$P$ 值
性 别	男	52	1.12 ± 0.23	0.578	0.564	0.75 ± 0.11	1.112	0.269
	女	41	1.15 ± 0.27			0.72 ± 0.15		
年 龄	≥20 岁	62	1.11 ± 0.22	1.166	0.247	0.71 ± 0.14	1.585	0.116
	<20 岁	31	1.17 ± 0.26			0.76 ± 0.15		
肿 瘤 位 置	四肢	80	1.13 ± 0.21	0.472	0.638	0.72 ± 0.11	0.889	0.376
	其他	13	1.16 ± 0.23			0.75 ± 0.13		
病 理 类 型	成骨型	73	1.12 ± 0.24	0.643	0.522	0.76 ± 0.14	1.456	0.149
	其他	20	1.16 ± 0.27			0.71 ± 0.12		
肿 瘤 最 大 径	<5 cm	60	0.87 ± 0.18	8.357	<0.001	0.61 ± 0.09	11.265	<0.001
	≥5 cm	33	1.28 ± 0.21			0.86 ± 0.15		
远 处 转 移	无	81	0.82 ± 0.16	9.112	<0.001	0.62 ± 0.11	9.787	<0.001
	有	12	1.34 ± 0.29			0.85 ± 0.13		
Enneking 分 期	I ~ II 期	59	0.93 ± 0.23	6.531	<0.001	0.58 ± 0.07	10.462	<0.001
	III 期	34	1.29 ± 0.26			0.87 ± 0.12		

表 5 miR-23a、MELK 水平预测骨肉瘤患者预后不良的价值

**Tab. 5** The value of miR-23a and MELK levels in predicting poor prognosis in patients with osteosarcoma

指标	Cut-off 值	AUC	95% CI	敏感度	特异度	约登指数
miR-23a	1.23	0.781	0.511 ~ 1.051	0.746	0.728	0.474
MELK	0.81	0.773	0.464 ~ 1.089	0.725	0.707	0.432
二者联合		0.901	0.642 ~ 1.161	0.886	0.894	0.780

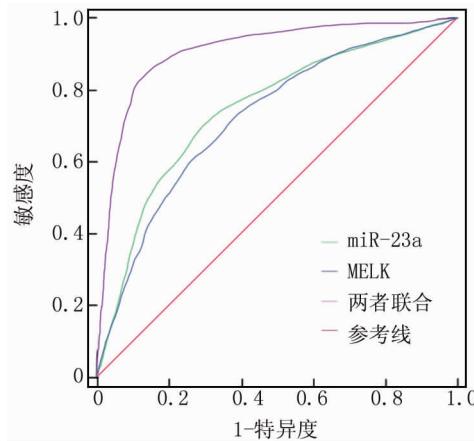


图 1 miR-23a、MELK 水平预测骨肉瘤患者预后不良的 ROC 曲线

**Fig. 1** ROC curve of miR-23a and MELK levels predicting poor prognosis in osteosarcoma patients

#### 2.4 Cox 回归分析骨肉瘤患者预后不良影响因素

以患者预后不良为因变量(1 = 预后不良, 0 = 预后良好), 以 miR-23a、MELK、肿瘤最大径、远处转移、Enneking 分期为自变量进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示: miR-23a 高表达、MELK 高表达、肿瘤最大径  $\geq 5$  cm、有远处转移、Enneking 分期 III 期为骨肉瘤患者预后不良的独立危险因素( $P < 0.05$ ), 见表 6。

表 6 多因素 Cox 回归分析骨肉瘤预后不良的危险因素

**Tab. 6** Multivariate Cox regression analysis of risk factors for poor prognosis in osteosarcoma

因素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
miR-23a 高表达	1.411	0.187	16.145	0.003	4.100	1.426 ~ 6.774
MELK 高表达	1.392	0.116	14.341	0.011	4.023	1.279 ~ 6.767
肿瘤最大径 $\geq 5$ cm	0.811	0.092	11.826	0.025	2.250	1.041 ~ 3.459
有远处转移	0.874	0.085	12.049	0.027	2.396	1.117 ~ 3.675
Enneking 分期 III 期	0.912	0.101	13.788	0.021	2.489	1.028 ~ 3.951

2.5 骨肉瘤组织中 miR-23a、MELK 表达对患者生存期的影响 组织 miR-23a  $\geq 1.14$  (均值) 且 MELK  $\geq 0.73$  (均值) 的骨肉瘤患者中位生存期低于 miR-23a  $< 1.14$  或 MELK  $< 0.73$  的患者中位生存期[(24.38 ±

4.52) 月 vs. (32.74 ± 5.16) 月], 差异有统计学意义 ( $\text{Log Rank } \chi^2 = 9.821, P < 0.001$ )。

#### 3 讨论

骨肉瘤的致病分子机制主要与基因突变及表观遗传学导致的基因表达异常有关, 其中 miRNA 通过调控细胞迁移、侵袭及微血管再生等多种方式参与其发病机制, 为骨肉瘤最新的研究热点及难点<sup>[10]</sup>。研究发现 miRNA 表达异常在骨肉瘤广泛存在, 且与病情及预后紧密关联, 可作为骨肉瘤病情及预后评估的标志物<sup>[11-12]</sup>。miRNA 具有翻译前基因表达调控功能, 可结合靶基因而抑制其表达<sup>[13-14]</sup>。miR-23a 为新近发现的具有促癌功能的 miRNA, 通过调控细胞增殖、迁移及侵袭等功能参与恶性肿瘤发生、发展及转归, 为恶性肿瘤的危险因素<sup>[15]</sup>。此外, 研究证实 miR-23a 可通过多个靶基因调控细胞自噬、铁死亡等功能<sup>[16]</sup>。研究发现 miR-23a 与骨关节等疾病发病机制相关, 在多种恶性肿瘤中表达显著增高, 与肿瘤分期及恶性程度密切相关, 为预后不良的生物标志物<sup>[17-18]</sup>, 但 miR-23a 在骨肉瘤中的表达及与临床病理特征的关联尚无研究。本研究发现骨肉瘤患者肿瘤组织 miR-23a 表达显著上调, 与肿瘤最大径、远处转移及 Enneking 分期相关且 miR-23a 高表达为骨肉瘤预后不良的独立危险因素, 表明 miR-23a 在骨肉瘤中具有促癌基因功能且与病情和预后相关。

MELK 为 Snf1/AMPK 激酶家族中保守的周期依赖性激酶, 其表达有极高的组织特异性, 在细胞更新活跃的组织器官中高表达而在成体的心脑肺等组织器官中表达较低<sup>[19]</sup>。MELK 与多种基因交互作用后激活下游信号通路, 在组织发育的过程中发挥维持增殖和凋亡平衡的作用<sup>[20]</sup>。MELK 的功能包括调控细胞周期、mRNA 前体剪接、干细胞及胚胎细胞发育, 同时 MELK 自身或作为其他基因靶标相互作用参与恶性肿瘤的发生、发展及转归。MELK 作为新近发现的促癌基因在多种恶性肿瘤中表达显著上调, 与 TNM 分期及生存期相关, 为恶性肿瘤病情及预后评估潜在的标志物<sup>[21-23]</sup>。体外实验发现, MELK 在骨肉瘤细胞中表达显著升高, 敲低 MELK 表达后骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力显著下降<sup>[24]</sup>。目前 MELK 在骨肉瘤组织中的表达及其临床价值尚无研究, 本研究发现骨肉瘤患者肿瘤组织 MELK 表达显著增高, 与肿瘤分期相关, 且 MELK 高表达为骨肉瘤预后不良的独立危险因素, 首次证实 MELK 在骨肉瘤中具有促癌基因功能。

当前临幊上骨肉瘤病情及预后评估、临幊诊疗策略制定的方法多为影像学评估及 Enneking 分期, 存在

敏感度及特异度不高、依赖于检查机器精度及影像科医生经验等缺点,尤其对无法取得明确病理组织的患者不适用,导致影像学评估及 Enneking 分期在实际临床应用中的价值有限<sup>[25-28]</sup>。随着骨肉瘤相关的新功能基因的发现及检测基因 PCR 技术指数级扩大效应,其在骨肉瘤病情及预后评估中具有更高的临床价值,具有可重复性高、敏感度高及对组织标本量要求低等优点,但单个指标的检测存在敏感度及特异度低等缺点,目前无法达到临床广泛应用的目的,基于目前检测现状临幊上将多个指标、多种检测技术联合应用以提高临床价值<sup>[29-30]</sup>。本研究中,miR-23a 联合 MELK 预测骨肉瘤预后不良的敏感度、特异度均高于传统的 Enneking 分期等,提示 miR-23a、MELK 表达检测预测骨肉瘤预后不良的效能高于目前的检测指标。此外,本研究发现 MELK 和 miR-23a 两者联合时其敏感度及特异度显著升高,提示在骨肉瘤临床诊疗方面应将 miR-23a 及 MELK 有机结合以提高效能。

综上所述,骨肉瘤患者 miR-23a、MELK 表达升高,与肿瘤最大径、远处转移及 Enneking 分期等传统指标存在相关性,在骨肉瘤病情及预后评估中具有更高的临床价值,miR-23a、MELK 二者联合检测时可显著提高敏感度及特异度。值得注意的是,本研究中 miR-23a、MELK 的检测均为病理组织标本,存在受制于病理标本的缺点,外周血 miR-23a、MELK 检测可能更适合临床应用,但其具体价值有待于进一步大规模临床试验研究。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

杨琼:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;李健伟:进行统计学分析;曾寒、欧阳柳:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;郑冲:提出研究思路,分析试验数据,论文审核

**参考文献**

- [1] Shoaib Z, Fan TM, Irudayaraj J. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets [J]. Br J Pharmacol, 2022, 179 (2) : 201-217. DOI:10.1111/bph.15713.
- [2] 易鹏,徐雄峰,姚佳炜,等.儿童骨肉瘤预后因素及列线图的构建[J].疑难病杂志,2020,19(9):926-930. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.09.015.
- [3] Sun Y, Zhang C, Fang Q, et al. Abnormal signal pathways and tumor heterogeneity in osteosarcoma [J]. J Transl Med, 2023, 21 (1) : 99. DOI:10.1186/s12967-023-03961-7.
- [4] Wu C, Gong S, Duan Y, et al. A tumor microenvironment-based prognostic index for osteosarcoma [J]. J Biomed Sci, 2023, 30 (1) : 23. DOI:10.1186/s12929-023-00917-3.
- [5] Abdollahi E, Mozdaran H, Alizadeh BZ. Role of circ-FOXO3 and miR-23a in radiosensitivity of breast cancer [J]. Breast Cancer, 2023, 30 (5) : 714-726. DOI:10.1007/s12282-023-01463-4.
- [6] Zuo H, Liu S, Li X, et al. miR-23a-3p promotes the development of colon cancer by inhibiting the expression of NDRG4 [J]. Clin Transl Oncol, 2023, 25 (4) : 933-940. DOI:10.1007/s12094-022-02996-4.
- [7] Laha D, Grant R, Mishra P, et al. Preclinical assessment of synergistic efficacy of MELK and CDK inhibitors in adrenocortical cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41 (1) : 282. DOI:10.1186/s13046-022-02464-5.
- [8] Yang H, Zhou H, Wang G, et al. MELK is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in glioma [J]. Front Neurol, 2022, 13 (4) : 977180. DOI:10.3389/fneur.2022.977180.
- [9] 中国医师协会骨科医师分会骨肿瘤专业委员会,郭卫,牛晓辉,等.骨肉瘤临床循证诊疗指南 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2018, 11 (4) : 288-301. DOI:10.3969/j.issn.2095-9958.2018.04.005.
- [10] Jiang M, Jike Y, Liu K, et al. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1 [J]. Mol Cancer, 2023, 22 (1) : 113. DOI:10.1186/s12943-023-01804-z.
- [11] Yang F, Liu Y, Xiao J, et al. Circ-CTNNB1 drives aerobic glycolysis and osteosarcoma progression via m6A modification through interacting with RBM15 [J]. Cell Prolif, 2023, 56 (1) : e13344. DOI:10.1111/cpr.13344.
- [12] Uralic I, Jovicic MS, Ostojic K, et al. Cellular and genetic background of osteosarcoma [J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45 (5) : 4344-4358. DOI:10.3390/cimb45050276.
- [13] 万晶晶,姚莉,李梦琳,等. TOP2A 联合 miR-21 检测在宫颈癌病情及预后评估中的价值 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22 (10) : 1045-1050. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.10.007.
- [14] 洪佳,黄金玲,杨琼琼,等.miR-200c 联合 MORC2 检测在卵巢癌病情及预后评估中的临床价值 [J]. 疑难病杂志, 2024, 23 (4) : 407-411. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2024.04.005.
- [15] Petrovic N, Stanojkovic TP, Nikitovic M. MicroRNAs in prostate cancer following radiotherapy: Towards predicting response to radiation treatment [J]. Curr Med Chem, 2022, 29 (9) : 1543-1560. DOI:10.2174/092986732866210804085135.
- [16] Fan X, Tao S, Li Q, et al. The miR-23a/27a/24-2 cluster promotes postoperative progression of early-stage non-small cell lung cancer [J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 24 (7) : 205-217. DOI:10.1016/j.mto.2021.12.014.
- [17] Simeone I, Rubolino C, Noviello T, et al. Prediction and pan-cancer analysis of mammalian transcripts involved in target directed miRNA degradation [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (4) : 2019-2035. DOI:10.1093/nar/gkac057.
- [18] Hussen BM, Ahmadi G, Marzban H, et al. The role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in lung cancer development [J]. Microb Pathog, 2021, 150 (10) : 104692. DOI:10.1016/j.micpath.2020.104692.
- [19] Li Z, Zhou H, Zhai X, et al. MELK promotes HCC carcinogenesis through modulating cuproptosis-related gene DLAT-mediated mitochondrial function [J]. Cell Death Dis, 2023, 14 (11) : 733. DOI:10.1038/s41419-023-06264-3.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 007

PCR 技术与肿瘤

# 宫颈癌组织中 LRRC8A、METTL14 的表达及临床预后价值

王彩丽, 王蕊, 张文莉, 杨杰

基金项目: 陕西省卫生健康科研项目(2020E023)

作者单位: 719000 陕西榆林, 榆林市第一医院妇产科

通信作者: 王蕊, E-mail: m18740320595@163.com



**【摘要】 目的** 分析宫颈癌(CC)组织中富含亮氨酸重复蛋白8A(LRRC8A)、甲基转移酶样蛋白14(METTL14)的表达,探讨两者的临床意义。**方法** 回顾性选取2019年2月—2021年3月榆林市第一医院妇产科诊治CC术后患者138例的临床资料和病理组织,采用实时荧光定量PCR和免疫组化法检测CC组织中LRRC8A、METTL14 mRNA及蛋白表达;绘制K-M生存曲线,用Log-Rank检验比较曲线的差异;Cox回归模型筛选CC预后影响因素。**结果** CC癌组织中LRRC8A、METTL14 mRNA表达量高于癌旁组织( $t/P = 44.520/ < 0.001, 42.352/ < 0.001$ ),癌组织LRRC8A、METTL14蛋白阳性率高于癌旁组织( $\chi^2/P = 124.062/ < 0.001, 107.574/ < 0.001$ );FIGO分期I B2~II A期、淋巴结转移患者癌组织LRRC8A、METTL14蛋白阳性率明显高于I A~I B1期及无淋巴结转移患者(LRRC8A:  $\chi^2/P = 6.338/0.012, 4.886/0.027$ ; METTL14:  $\chi^2/P = 7.547/0.006, 10.294/0.001$ );LRRC8A阳性和阴性组3年总生存率分别为71.43% (70/98)、90.00% (36/40);METTL14阳性和阴性组3年总生存率分别为70.65% (65/92)、89.13% (41/46)。Log-Rank检验结果显示,LRRC8A阳性组、METTL14阳性组3年总生存率分别低于LRRC8A阴性组、METTL14阴性组(Log-Rank  $\chi^2 = 5.065, 7.690, P = 0.023, 0.006$ );Cox回归分析结果表明,LRRC8A阳性、METTL14阳性、FIGO分期I B2~II A期是影响CC患者生存预后的独立危险因素[OR (95% CI) = 1.679 (1.301~2.166), 1.429 (1.156~1.766), 1.713 (1.187~2.471)]。**结论** CC组织中LRRC8A、METTL14表达升高,与CC患者FIGO分期、淋巴结转移有关,是评估CC患者不良生存预后的标志物。

**【关键词】** 宫颈癌; 富含亮氨酸重复蛋白8A; 甲基转移酶样蛋白14; 预后

**【中图分类号】** R737.33

**【文献标识码】** A

**The expression and clinical prognostic value of LRRC8A and METTL14 in cervical cancer tissue** Wang Caili, Wang Rui, Zhang Wenli, Yang Jie. Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital of Yulin City, Shaanxi Province, Yulin 719000, China

**Funding program:** Shaanxi Provincial Health Research Project (2020E023)

**Corresponding author:** Wang Rui, E-mail: m18740320595@163.com

**【Abstract】 Objective** To analyze the expression of leucine rich repeat protein 8A (LRRC8A) and methyltransferase like protein 14 (METTL14) in cervical cancer (CC) and explore their clinical significance. **Methods** One hundred and thirty-eight patients with CC who underwent diagnosis and treatment from February 2019 to March 2021 were selected. Immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect the expression of LRRC8A and METTL14 in CC. K-M survival curve were drew and the differences between the curves were compared by Log Rank test. The prognostic factors affecting CC were screen by COX regression model. **Results** The expression levels of LRRC8A mRNA and METTL14 mRNA in CC cancer tissues were higher than those in adjacent tissues ( $t/P = 44.520/ < 0.001, 42.352/ < 0.001$ ). The positive rates of LRRC8A protein and METTL14 protein in cancer tissues of patients with FIGO staging I B2-IIA and lymph node metastasis were higher ( $P < 0.05$ ). The 3-year overall survival (OS) of LRRC8A positive and negative groups were 71.43% (70/98) and 90.00% (36/40), respectively; The 3-year OS of METTL14 positive and negative groups were 70.65% (65/92) and 89.13% (41/46), respectively. Log Rank test showed that the overall 3-year survival rate of the LRRC8A positive group and the METTL14 positive group was lower than that of the LRRC8A negative group and the METTL14

negative group, with statistically significant differences (Log Rank  $\chi^2 = 5.065, 7.690, P = 0.023, 0.006$ ). LRRC8A positive and METTL14 positive groups, as well as FIGO staging stages IB2-IIA, were independent risk factors [ $OR(95\% CI) = 1.679 (1.301 - 2.166), 1.429 (1.156 - 1.766), 1.713 (1.187 - 2.471)$ ]. **Conclusion** Elevated expression of LRRC8A and METTL14 in CC are associated with FIGO staging and lymph node metastasis in CC patients, and are biomarkers for signal assessment of poor survival prognosis in CC patients.

**[Key words]** Cervical cancer; Rich in leucine repeat protein 8A; Methyltransferase like protein 14; Prognosis

宫颈癌(cervical cancer, CC)为女性第四大常见恶性肿瘤,全世界每年新发例数60万,死亡例数34.2万<sup>[1]</sup>。CC的治疗包括手术及放化疗等,但中晚期CC患者术后肿瘤复发及转移的风险较高<sup>[2]</sup>。富含亮氨酸重复蛋白8A(leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A,LRRC8A)属于富含亮氨酸的蛋白质重复家族,参与包括细胞黏附、细胞运输和激素受体相互作用等多种生物过程<sup>[3]</sup>。研究表明,胃癌、肺癌等肿瘤中LRRC8A表达上调,其能够抑制p53的表达,促进癌细胞的恶性增殖及转移<sup>[4-5]</sup>。甲基转移酶样蛋白14(methyltransferase 14,METTL14)具有与信使核糖核酸结合及N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine,m6A)甲基转移酶的活性,参与信使核糖核酸代谢及翻译调节过程,与造血祖细胞分化、个体发育及炎性反应关系密切<sup>[6]</sup>。研究表明,METTL14能够促进癌基因c-Met mRNA的m6A修饰,上调c-Met的表达,促进癌细胞的恶性增殖<sup>[7]</sup>。目前CC组织中LRRC8A、METTL14表达的临床意义尚不清楚。本研究通过分析CC组织中LRRC8A、METTL14的基因和蛋白表达,探讨两者的预后价值,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 回顾性选取2019年2月—2021年3月榆林市第一医院妇产科诊治CC术后患者138例的临床资料,年龄32~79( $57.54 \pm 7.16$ )岁;病理类型:鳞癌93例,腺癌45例;浸润深度:<1/2肌层85例, $\geq 1/2$ 肌层53例;肿瘤大小:<4 cm 88例, $\geq 4$  cm 48例;分化程度:高中分化90例,低分化48例;FIGO分期:I A~I B1期96例,I B2~II A期42例;淋巴结转移39例。本研究获得医院伦理委员会批准(2021-009),患者和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为CC;②初次诊治,病理切缘阴性;③临床资料完整;④FIGO分期I A~II A。(2)排除标准:①合并其他器官的恶性肿瘤;②入院前有放化疗及免疫治疗等;③合并严重心脑血管疾病、肺栓塞等。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 LRRC8A、METTL14 mRNA检测:**将术中获取

的癌及癌旁组织(距离肿瘤边缘>2 cm)各约50 mg,研钵中研磨后,离心留取研磨后的组织上清。利用TRIzol试剂提取其中的总RNA,将RNA逆转录为cDNA(逆转录试剂盒购自日本Takara公司,货号RR901Q)。然后采用SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒(北京伊塔生物科技有限公司,货号SY4008)进行实时荧光定量PCR反应。实时荧光定量PCR反应仪购自美国赛默飞公司,型号ABI7500。引物由北京睿博兴科生物公司提供,反应程序:94℃ 5 min,1个循环,94℃ 34 s,62℃ 30 s,72℃ 32 s,共计40个循环。引物序列如下:LRRC8A上游5'-ACTGCCGACAGCATTGGTG-3',下游5'-GGAGCAGAGGTATCATAGGAAGC-3';METTL14上游5'-GAACACAGAGCTAAATCCCCA-3',下游5'-TGTCAAGCTAACCTACATCCCTG-3';GAPDH上游5'-GAGTGTGTTACGAAAATGGGGT-3',下游5'-CCGTCTGTGCTACGCTTC-3'。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法评估LRRC8A、METTL14 mRNA的相对表达量。

**1.3.2 LRRC8A、METTL14蛋白检测:**采用免疫组化法。调取病理科CC癌和癌旁组织的石蜡切片,按照常规免疫组化步骤进行染色(SP法),由1名专业的病理科医师完成。LRRC8A、METTL14兔多克隆抗体(购自美国Abcam公司,货号ab157487、ab220030)稀释比为1:100,DAB显色后镜下观察(购自日本尼康公司,型号JCM-5000),分别进行半定量的染色强度评分(0分无染色;1分淡黄色;2分棕黄色;3分棕褐色)和染色面积评分(0分≤5%;1分6%~25%;2分26%~50%;3分51%~100%)。两项乘积>2为阳性,≤2为阴性。LRRC8A阳性和阴性组分别为98例、40例,METTL14阳性和阴性组分别为92例、46例。

**1.3.3 随访方法:**随访起点为患者手术后即刻,随访截止时间为术后3年,3~6个月随访1次,采用门诊随访,随访截至2024年4月1日。记录患者因CC复发转移等造成死亡的时间。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS 26.0软件对数据进行分析。正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本t检验或配对t检验;计数资料以频数或率

(%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; Kaplan-Meier 法 (Log-Rank 检验) 比较组间的生存曲线差异; Cox 比例风险回归模型筛选 CC 预后影响因素。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 宫颈癌和癌旁组织 LRRC8A、METTL14 基因和蛋白表达比较** 癌组织 LRRC8A、METTL14 mRNA 表达量均高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ )。癌组织 LRRC8A、METTL14 蛋白位于细胞浆和细胞膜。癌组织 LRRC8A、METTL14 蛋白阳性率均高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 见表 1、图 1。

**2.2 LRRC8A 蛋白、METTL14 蛋白在不同临床病理参数中的差异** CC 癌组织 LRRC8A、METTL14 蛋白阳性率在 FIGO 分期 I B2 ~ II A 期、淋巴结转移中均高于 FIGO 分期 I A ~ I B1 期、无淋巴结转移患者 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

**2.3 LRRC8A、METTL14 蛋白水平与 CC 患者临床预后的关系** CC 患者随访中, 肿瘤相关死亡 32 例, 3 年总生存率为 76.81% (106/138)。LRRC8A 阳性和阴性组 3 年总生存率分别为 71.43% (70/98)、90.00% (36/40); METTL14 阳性和阴性组 3 年总生存率分别

为 70.65% (65/92)、89.13% (41/46)。Log-Rank 检验结果显示, LRRC8A 阳性组、METTL14 阳性组 3 年总生存率低于 LRRC8A 阴性组、METTL14 阴性组 (Log-Rank  $\chi^2 = 5.065, 7.690, P = 0.023, 0.006$ ), 见图 2。

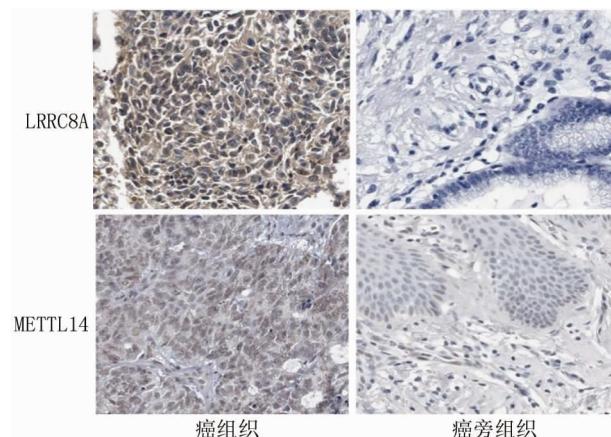


图 1 宫颈癌和癌旁组织中 LRRC8A、METTL14 蛋白表达(免疫组化染色,  $\times 200$ )

**Fig. 1** Expression of LRRC8A protein and METTL14 protein in cervical cancer and adjacent tissues (immunohistochemical staining,  $\times 200$ )

表 1 宫颈癌和癌旁组织中 LRRC8A、METTL14 mRNA 和蛋白表达比较

**Tab. 1** mRNA and protein expression of LRRC8A and METTL14 in cervical cancer and adjacent tissues

组 别	n	LRRC8A mRNA ( $\bar{x} \pm s$ )	METTL14 mRNA ( $\bar{x} \pm s$ )	LRRC8A 蛋白 [例 (%) ]	METTL14 蛋白 [例 (%) ]
癌旁组织	138	1.02 $\pm$ 0.24	1.13 $\pm$ 0.33	8(5.80)	9(6.52)
癌组织	138	3.02 $\pm$ 0.47	3.32 $\pm$ 0.51	98(71.01)	92(66.67)
t 值		44.520	42.352	124.062	107.574
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 不同临床病理参数 CC 癌组织中 LRRC8A、METTL14 蛋白表达的比较 [例 (%) ]

**Tab. 2** Comparison of LRRC8A and METTL14 protein expression in CC cancer tissues with different clinical pathological parameters

项 目		例数	LRRC8A 蛋白阳性 (n=98)	$\chi^2$ 值	P 值	METTL14 蛋白阳性 (n=92)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄	≤60 岁	87	60(68.97)	0.480	0.488	53(60.92)	3.499	0.061
	>60 岁	51	38(74.51)			39(76.47)		
病理类型	鳞癌	93	65(69.89)	0.174	0.676	58(62.37)	2.374	0.123
	腺癌	45	33(73.33)			34(75.56)		
肿瘤大小	<4 cm	89	67(75.28)	2.217	0.137	59(66.29)	0.016	0.900
	≥4 cm	49	31(63.27)			33(67.35)		
肌层浸润深度	<1/2 全层	85	58(68.24)	0.830	0.362	54(63.53)	0.980	0.322
	≥1/2 全层	53	40(75.47)			38(71.70)		
肿瘤分化程度	高中分化	90	59(65.56)	3.746	0.053	56(62.22)	2.300	0.290
	低分化	48	39(81.25)			36(75.00)		
FIGO 分期	I A ~ I B1 期	96	62(64.58)	6.338	0.012	57(59.38)	7.547	0.006
	I B2 ~ II A 期	42	36(85.71)			35(83.33)		
淋巴结转移	无	99	65(65.66)	4.886	0.027	58(58.59)	10.294	0.001
	有	39	33(84.62)			34(87.18)		

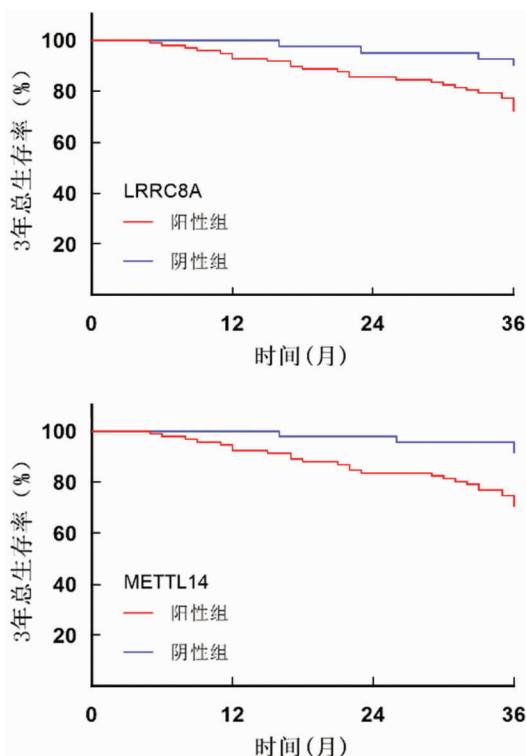


图 2 K-M 曲线分析 LRRC8A 蛋白/METTL14 蛋白水平与 CC 患者临床预后的关系

**Fig. 2** K-M curve analysis of the relationship between LRRC8A protein/METTL14 protein expression and clinical prognosis in CC patients

#### 2.4 影响 CC 患者生存预后的多因素 Cox 回归分析

以患者的生存预后为因变量(1 = 死亡, 0 = 存活), 将上述结果中差异有统计学意义的因素为自变量进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示: LRRC8A 阳性、METTL14 阳性、FIGO 分期 I B2 ~ II A 期是影响 CC 预后的危险因素( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 3。

表 3 影响 CC 患者生存预后的多因素 Cox 回归分析

**Tab. 3** Multivariate Cox regression analysis of factors affecting the survival prognosis of CC patients

因素	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	HR 值	95% CI
FIGO I B2 ~ II A 期	0.538	0.187	8.277	$< 0.001$	1.713	1.187 ~ 2.471
淋巴结转移	0.242	0.182	1.768	0.332	1.274	0.892 ~ 1.820
LRRC8A 阳性	0.518	0.130	15.877	$< 0.001$	1.679	1.301 ~ 2.166
METTL14 阳性	0.357	0.108	10.927	$< 0.001$	1.429	1.156 ~ 1.766

#### 3 讨 论

CC 是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 近年来其发病率和病死率总体呈不断上升的趋势<sup>[8]</sup>。早期 CC 以手术治疗为主, 术后预后较好, 但合并淋巴结转移、切缘阳性等高危因素的 CC 患者肿瘤术后容易出现复发

转移, 预后不佳<sup>[9]</sup>。探究影响 CC 患者预后的相关因素, 对于临幊工作中评估 CC 患者的预后, 指导 CC 的临幊诊治意义重大。

LRRC8A 是表达于细胞膜的保守的跨膜蛋白, 结构上具有富含亮氨酸重复序列, 参与构成体积阴离子通道, 在 B 细胞发育和功能维持、细胞自噬及细胞凋亡中发挥重要的调控作用<sup>[10]</sup>。研究表明, 食管鳞癌中 LRRC8A 的表达上调能够抑制 p21 和 p27 的表达, 促进细胞周期由 G1 到 M 期的转变, 促进癌细胞的恶性增殖<sup>[11]</sup>。本研究中, CC 病组织中 LRRC8A 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调, 与既往学者在人类肿瘤基因组图谱数据库分析结果一致<sup>[12]</sup>, 但该研究未能对 LRRC8A 在蛋白水平进行大样本验证, 本研究进一步证实 CC 组织中 LRRC8A 蛋白表达显著上调, 提示 LRRC8A 促进 CC 的肿瘤发生。CC 中 LRRC8A 的表达上调与其 mRNA 的稳定性增加有关。既往学者报道, NOP2/Sun RNA 甲基转移酶家族成员 2 能够促进 CC 病细胞中 LRRC8A mRNA 的 5 甲基胞嘧啶修饰, 增加 LRRC8A mRNA 的稳定性, 上调 LRRC8A 的蛋白表达, LRRC8A 蛋白与 RNA 结合蛋白 Y-盒结合蛋白 1 相互作用, 促进 CC 病细胞的恶性增殖和转移<sup>[12]</sup>。本研究中, FIGO 分期 I B2 ~ II A 期、淋巴结转移 CC 组织中 LRRC8A 表达升高, 表明 LRRC8A 参与 CC 的肿瘤进展。分析其原因, LRRC8A 是介导细胞内多条信号通路传导的中心介质, 其表达上调能够促进癌细胞的增殖和转移。研究表明, LRRC8A 与磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶 1 型  $\beta$  结合, 磷酸化激活丝裂原活化蛋白激酶、磷酸腺苷激活的蛋白激酶和趋化因子信号通路, 促进癌细胞的侵袭和迁移<sup>[13]</sup>。此外, LRRC8A 作为一种氯离子通道蛋白, 其高表达还能够促进 JAKs 相关激酶磷酸化激活, 促进转化生长因子  $\beta$  介导的细胞迁移和侵袭, 导致肿瘤恶性进展<sup>[14]</sup>。本研究中, LRRC8A 阳性的 CC 患者随访中具有较高的死亡风险, 提示 LRRC8A 的表达有助于评估 CC 患者的生存预后。笔者分析, LRRC8A 作为氯离子通道的关键蛋白, 其能促进癌细胞中牛磺酸及谷氨酸等物质进入细胞, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭及转移, 增加肿瘤术后进展的风险。此外, LRRC8A 还能够抑制顺铂和卡铂化疗药物进入细胞, 降低化疗治疗的有效性, 导致患者不良预后, 动物实验证实敲除 LRRC8A 能够增强顺铂和卡铂诱导的癌细胞 DNA 损伤, 促进癌细胞凋亡, 改善化疗耐药性<sup>[15]</sup>。

METTL14 是甲基转移酶复合物的核心成分, 广泛表达于真核细胞中, 参与细胞内 m6A 修饰动态过程的

调控。近年来发现,卵巢癌、子宫内膜癌等妇科恶性肿瘤中 METTL14 表达上调,其能够以 m6A 修饰依赖的方式促进癌细胞的侵袭和转移,导致肿瘤进展<sup>[16-17]</sup>。本研究中,CC 组织中 METTL14 表达明显升高,这与既往学者在 CC 肿瘤细胞中观察结果一致<sup>[18]</sup>,但该研究是基于 GEPIA 数据库对 CC 中 METTL14 mRNA 的表达进行检测,本研究进一步在蛋白水平证实 CC 中 METTL14 蛋白水平升高,提示 METTL14 参与 CC 的肿瘤发生。有研究表明,PIWI 相互作用 RNA-14633 在 CC 组织和肿瘤细胞中高表达,其促进 METTL14 mRNA 的甲基化修饰及增强 METTL14 mRNA 稳定性,上调细胞色素 P450 家族 1 亚家族 B 成员 1 的表达,促进 CC 细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[19]</sup>。本研究中,METTL14 与较差的临床病理参数相关。分析其机制,CC 肿瘤细胞系 SiHa 和 C33a 中 METTL14 的表达上调能够磷酸化激活磷脂酰肌醇 3 激酶/Akt/人类哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路,上调抗凋亡相关蛋白如 Bcl-2 的表达,促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制肿瘤细胞凋亡,导致肿瘤恶性进展<sup>[20-21]</sup>。此外,CC 组织中 METTL14 的表达上调还能够促进糖酵解,导致肿瘤微环境中乳酸堆积,上调肿瘤相关巨噬细胞中程序性细胞死亡蛋白 1 的表达,抑制肿瘤细胞逃逸 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的免疫杀伤能力,导致肿瘤的免疫逃逸<sup>[22]</sup>。本研究中,METTL14 的表达上调能够增加 CC 患者不良预后的风险。既往有学者发现,METTL14 的表达上调能够增加 CC 细胞中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 mRNA 的 m6A 修饰及 mRNA 的稳定性,促进脂质代谢,促进三酰甘油和脂肪酸的细胞内蓄积,导致 CC 细胞的增殖和转移,增加 CC 患者术后肿瘤转移的风险<sup>[23-24]</sup>。此外,METTL14 能够促进蛋白质精氨酸甲基转移酶 3 相互作用,增加谷胱甘肽过氧化物酶 4 mRNA 的稳定性,降低顺铂化疗及 X 线放射治疗诱导的细胞脂质过氧化水平,促进肿瘤耐药性及放疗抵抗性形成<sup>[25]</sup>。

综上所述,CC 组织中 LRRC8A、METTL14 表达升高,与 CC 患者 FIGO 分期、淋巴结转移有关,是评估 CC 患者不良生存预后的标志物。但是本研究也存在局限性。本研究通过 qPCR 试验和免疫组化试验验证 LRRC8A、METTL14 在 CC 组织中的差异表达,但 LRRC8A、METTL14 在 CC 组织中确切的作用机制需要更多的后续试验进行验证。其次,本研究还发现 LRRC8A、METTL14 对于 CC 患者的预后具有良好的临床评估价值,仍然还需要更多的前瞻性大样本的临床研究验证 LRRC8A、METTL14 的预后价值。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

## 作者贡献声明

王彩丽:设计研究方案,实施研究过程,分析试验数据,论文撰写;王蕊:进行文献调研与整理,提出研究思路,收集并分析试验数据,论文审核;张文莉:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;杨杰:数据收集,进行统计学分析

## 参考文献

- [1] Buskwoff A, David-West G, Clare CA. A review of cervical cancer: Incidence and disparities [J]. J Natl Med Assoc, 2020, 112(2): 229-232. DOI: 10.1016/j.jnma.2020.03.002.
- [2] He B, Chen W, Liu L, et al. Prediction models for prognosis of cervical cancer: Systematic review and critical appraisal [J]. Front Public Health, 2021, 9(8): 6544-6554. DOI: 10.3389/fpubh.2021.654454.
- [3] Goldsmith EJ, Huang CL. LRRC8A reduces intracellular chloride to permit WNK activation in response to hypertonic stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(32): 2109-2124. DOI: 10.1073/pnas.2109432118.
- [4] Kurashima K, Shiozaki A, Kudou M, et al. LRRC8A influences the growth of gastric cancer cells via the p53 signaling pathway [J]. Gastric Cancer, 2021, 24(5): 1063-1075. DOI: 10.1007/s10120-021-01187-4.
- [5] Xu R, Hu Y, Xie Q, et al. LRRC8A is a promising prognostic biomarker and therapeutic target for pancreatic adenocarcinoma [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(22): 5526-5534. DOI: 10.3390/cancers14225526.
- [6] Zheng Y, Li Y, Ran X, et al. Mettl14 mediates the inflammatory response of macrophages in atherosclerosis through the NF-kappaB/IL-6 signaling pathway [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(6): 311-323. DOI: 10.1007/s00018-022-04331-0.
- [7] Miyake K, Costa CP, Nagatomo I, et al. A cancer-associated METTL14 mutation induces aberrant m6A modification, affecting tumor growth [J]. Cell Rep, 2023, 42(7): 1126-1138. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112688.
- [8] 王瑾瑶, 张年萍, 白志强, 等. 1993—2017 年中国宫颈癌发病率和死亡率长期趋势的年龄-时期-队列模型分析 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(13): 1564-1568. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0074.
- [9] 玛丽亚木古丽·克依木, 热孜婉古丽·吾布力, 克热曼·牙库甫, 等. 基于列线图生存预测模型探讨血清学指标对宫颈癌预后的判断价值 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22(11): 1186-1190. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.11.013.
- [10] Serra SA, Stojakovic P, Amat R, et al. LRRC8A-containing chloride channel is crucial for cell volume recovery and survival under hypertonic conditions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(23): 3118-3128. DOI: 10.1073/pnas.2025013118.
- [11] Konishi T, Shiozaki A, Kosuga T, et al. LRRC8A expression influences growth of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Pathol, 2019, 189(10): 1973-1985. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.06.006.
- [12] Chen Y, Zuo X, Wei Q, et al. Upregulation of LRRC8A by m(5)C modification-mediated mRNA stability suppresses apoptosis and facilitates tumorigenesis in cervical cancer [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(2): 691-704. DOI: 10.7150/ijbs.79205.

- [13] Zhang H, Liu R, Jing Z, et al. LRRC8A as a central mediator promotes colon cancer metastasis by regulating PIP5K1B/PIP2 pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870 (4): 1670-1686. DOI:10.1016/j.bbdis.2024.167066.
- [14] Yoshimoto S, Matsuda M, Kato K, et al. Volume-regulated chloride channel regulates cell proliferation and is involved in the possible interaction between TMEM16A and LRRC8A in human metastatic oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 895 (8): 1738-1746. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.173881.
- [15] Widmer CA, Klebic I, Domanitskaya N, et al. Loss of the volume-regulated anion channel components LRRC8A and LRRC8D limits platinum drug efficacy [J]. *Cancer Res Commun*, 2022, 2 (10): 1266-1281. DOI:10.1158/2767-9764.CRC-22-0208.
- [16] 韦有生, 姚德生, 李力, 等. METTL14 在卵巢上皮性癌组织中的表达及对 A2780、SKOV3 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2022, 57 (1): 46-56. DOI:10.3760/cma.j.cn112141-20210925-00553.
- [17] 赵满英, 伍东月, 杜瑞亭, 等. METTL14 介导 ER $\alpha$  的 m6A 修饰调控子宫内膜癌转移的机制研究 [J]. 中国癌症杂志, 2023, 33 (3): 250-259. DOI:10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.03.008.
- [18] Geng F, Fan MJ, Li J, et al. Knockdown of METTL14 inhibits the growth and invasion of cervical cancer [J]. *Transl Cancer Res*, 2019, 8 (6): 2307-2315. DOI:10.21037/tcr.2019.09.48.
- [19] Xie Q, Li Z, Luo X, et al. piRNA-14633 promotes cervical cancer cell malignancy in a METTL14-dependent m6A RNA methylation manner [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 51-62. DOI:10.1186/s12967-022-03257-2.
- [20] Liu X, Xiao M, Zhang L, et al. The m6A methyltransferase METTL14 inhibits the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35 (3): 2365-2375. DOI:10.1002/jcla.23655.
- [21] 玛丽亚木古丽·克依木, 热孜婉古丽·吾布力, 克热曼·牙库甫, 等. 基于列线图生存预测模型探讨血清学指标对宫颈癌预后的判断价值 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22 (11): 1186-1190. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.11.013.
- [22] Wang B, Mao Z, Ye J, et al. Glycolysis induced by METTL14 is essential for macrophage phagocytosis and phenotype in cervical cancer [J]. *J Immunol*, 2024, 212 (4): 723-736. DOI:10.4049/jimmunol.2300339.
- [23] Han C, Hu C, Liu T, et al. IGF2BP3 enhances lipid metabolism in cervical cancer by upregulating the expression of SCD [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15 (2): 138-147. DOI:10.1038/s41419-024-06520-0.
- [24] 张海花, 雷燕, 刘宇, 等. m6A 修饰与妇科恶性肿瘤相关性的研究进展 [J]. 临床误诊误治, 2024, 37 (1): 147-152. DOI:10.3969/j.issn.1002-3429.2024.01.026.
- [25] Lu W, Yang X, Zhong W, et al. METTL14-mediated m6A epitranscriptomic modification contributes to chemotherapy-induced neuropathic pain by stabilizing GluN2A expression via IGF2BP2 [J]. *J Clin Invest*, 2024, 134 (6): 1748-1757. DOI:10.1172/JCI174847.

(收稿日期:2024-07-05)

(上接 1186 页)

- [20] Ren L, Guo JS, Li YH, et al. Structural classification of MELK inhibitors and prospects for the treatment of tumor resistance: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156 (2): 113965. DOI:10.1016/j.biopharm.2022.113965.
- [21] Hardeman AA, Han YJ, Grushko TA, et al. Subtype-specific expression of MELK is partly due to copy number alterations in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (6): e0268693. DOI:10.1371/journal.pone.0268693.
- [22] Zhu X, Zhang E, Qin L. The high expression of TOP2A and MELK induces the occurrence of psoriasis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16 (4): 3185-3199. DOI:10.18632/aging.205519.
- [23] 张钗红, 全昱冲, 关德风, 等. 母体胚胎亮氨酸拉链激酶与妇科恶性肿瘤的相关研究 [J]. 临床误诊误治, 2020, 33 (8): 112-116. DOI:10.3969/j.issn.1002-3429.2020.08.023.
- [24] Salim Jeddo(萨利姆). MELK 是骨肉瘤的不良预后标志物和治疗靶 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [25] 孟杨, 王绍伟, 王宪峰, 等. 瑞芬太尼调控 miR-148a 对骨肉瘤细胞生物行为的影响 [J]. 疑难病杂志, 2020, 19 (4): 371-375. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.04.011.
- [26] Li R, Yan L, Jiu J, et al. PSME2 offers value as a biomarker of M1 macrophage infiltration in pan-cancer and inhibits osteosarcoma malignant phenotypes [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20 (4): 1452-1470. DOI:10.7150/ijbs.90226.
- [27] Guo T, Wei R, Dean DC, et al. SMARCB1 expression is a novel diagnostic and prognostic biomarker for osteosarcoma [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42 (1): BSR20212446. DOI:10.1042/BSR20212446.
- [28] 易鹏, 徐雄峰, 姚佳炜, 等. 儿童骨肉瘤预后因素及列线图的构建 [J]. 疑难病杂志, 2020, 19 (9): 926-930. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2020.09.015.
- [29] Gao X, Gao B, Li S. Extracellular vesicles: A new diagnostic biomarker and targeted drug in osteosarcoma [J]. *Front Immunol*, 2022, 13 (9): 1002742. DOI:10.3389/fimmu.2022.1002742.
- [30] Han Z, Peng X, Yang Y, et al. Integrated microfluidic-SERS for exosome biomarker profiling and osteosarcoma diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 217 (2): 114709. DOI:10.1016/j.bios.2022.114709.

(收稿日期:2024-05-30)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 008

PCR 技术与肿瘤

# 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达与病理参数和预后的关系

王嵘嵘, 程开芳, 陈君墨, 肖大树, 朱楠



基金项目: 安徽省卫生健康科研项目(AHWJ2022b030)

作者单位: 238000 合肥, 安徽医科大学附属巢湖医院病理科(王嵘嵘、肖大树、朱楠), 妇产科(陈君墨); 238008 合肥市第八人民医院病理科(程开芳)

通信作者: 肖大树, E-mail: xdsh2623987@163.com

**【摘要】 目的** 探讨子宫内膜癌组织中长链非编码核糖核酸 GATA 结合蛋白 3 反义 RNA1 (LncRNA GATA3-AS1)、微小核糖核酸-362-3p (miR-362-3p) 表达与病理参数和预后的关系。**方法** 回顾性选取 2018 年 1 月—2021 年 12 月安徽医科大学附属巢湖医院妇产科收治的子宫内膜癌患者 101 例为研究对象。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p mRNA 表达水平; Pearson 相关分析子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 与 miR-362-3p 的相关性; Kaplan-Meier 法分析 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达对子宫内膜癌患者生存预后的影响; 多因素 Cox 回归分析子宫内膜癌患者预后的影响因素。**结果** 子宫内膜癌患者癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达高于癌旁组织, miR-362-3p 表达低于癌旁组织( $t/P = 17.642 / < 0.001, 18.153 / < 0.001$ ); 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达与 miR-362-3p 表达呈负相关( $r = -0.691, P < 0.001$ ); FIGO 分期ⅢA 期、肌层浸润深度  $> 1/2$ 、有淋巴结转移的子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达高于 FIGO 分期 I ~ II 期、肌层浸润深度  $\leq 1/2$ 、无淋巴结转移, 而 miR-362-3p 表达低于 FIGO 分期 I ~ II 期、肌层浸润深度  $\leq 1/2$ 、无淋巴结转移 (LncRNA GATA3-AS1:  $t/P = 16.168 / < 0.001, 9.423 / < 0.001, 20.066 / < 0.001$ ; miR-362-3p:  $t/P = 12.563 / < 0.001, 8.139 / < 0.001, 5.923 / < 0.001$ )。LncRNA GATA3-AS1 高表达组 3 年总生存(OS)率为 63.46% (33/52), 低于低表达组的 80.85% (38/47) ( $\text{Log-rank } \chi^2 = 4.431, P = 0.032$ ); miR-362-3p 低表达组 3 年 OS 率为 62.00% (31/50), 低于高表达组的 81.63% (40/49) ( $\text{Log-rank } \chi^2 = 5.240, P = 0.022$ )。FIGO 分期ⅢA 期、肌层浸润深度  $> 1/2$ 、淋巴结转移、LncRNA GATA3-AS1 高是影响子宫内膜癌患者预后的独立危险因素 [ $HR(95\% CI) = 1.637 (1.135 \sim 2.362), 1.667 (1.085 \sim 2.561), 1.881 (1.169 \sim 3.029), 1.675 (1.164 \sim 2.412)$ ], miR-362-3p 高是独立保护因素 [ $HR(95\% CI) = 0.649 (0.495 \sim 0.851)$ ]。**结论** 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达上调, miR-362-3p 表达下调, 且与恶性病理参数以及不良预后有关。LncRNA GATA3-AS1 可能通过负性调控 miR-362-3p 参与子宫内膜癌进展。

【关键词】 子宫内膜癌; GATA 结合蛋白 3 反义 RNA1; 微小核糖核酸-362-3p; 病理参数; 预后

【中图分类号】 R737.33

【文献标识码】 A

**Relationship between the expression of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p in endometrial carcinoma tissues and pathological parameters and prognosis** Wang Rongrong\*, Cheng Kaifang, Chen Junmo, Xiao Dashu, Zhu Nan. \* Department of Pathology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province, Hefei 238000, China

**Funding program:** Anhui Provincial Health Research Project (AHWJ2022b030)

**Corresponding author:** Xiao Dashu, E-mail: xdsh2623987@163.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between the expression of long non-coding ribonucleic acid GATA binding protein 3 antisense RNA1 (LncRNA GATA3-AS1) and micromas 362-3p (miR-362-3p) and pathological parameters and prognosis in endometrial carcinoma. **Methods** One hundred and one patients with endometrial cancer admitted to Department of Pathology and the Department of Obstetrics and Gynecology of Chaohu Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Department of Pathology of the Eighth People's Hospital of Hefei from January 2018 to December 2021 were selected as the study objects. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p. The correlation between LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p in endometrial cancer tissues was analyzed by Pearson correlation. Kaplan-Meier method was used to analyze

the effects of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p expression on survival and prognosis of patients with endometrial cancer. Multivariate Cox regression analysis of the prognostic factors in patients with endometrial cancer. **Results** The expression of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p in cancer tissues was higher than that in para-cancer tissues ( $t/P = 17.642 / < 0.001, 18.153 / < 0.001$ ). The expression of LncRNA GATA3-AS1 in endometrial carcinoma was negatively correlated with the expression of miR-362-3p ( $r = -0.691, P < 0.001$ ). LncRNA GATA3-AS1 expression in endometrial cancer tissues with FIGO stage IIIA, myographic invasion depth  $> 1/2$  and lymph node metastasis was higher than that in FIGO stage I ~ II myographic invasion depth  $\leq 1/2$  and no lymph node metastasis. The expression of miR-362-3p was lower than that in FIGO stages I to II, the depth of myographic infiltration was  $\leq 1/2$ , and no lymph node metastasis was found ( $t/P = 16.168 / < 0.001, 9.423 / < 0.001, 20.066 / < 0.001, 12.563 / < 0.001, 8.139 / < 0.001, 5.923 / < 0.001$ ). The 3-year overall survival (OS) rate in the high expression group of LncRNA GATA3-AS1 was 63.46% (33/52), which was lower than that in the low expression group of 80.85% (38/47) (Log-rank  $\chi^2 = 4.431, P = 0.032$ ). The 3-year OS rate of miR-362-3p group was 62.00% (31/50), which was lower than that of Mir-362-3p group (81.63% (40/49) (Log-rank  $\chi^2 = 5.240, P = 0.022$ ). FIGO stage IIIA, depth of myographic invasion  $> 1/2$ , lymph node metastasis, and high LncRNA GATA3-AS1 were independent risk factors for prognosis of patients with endometrial cancer [HR (95% CI) = 1.637 (1.135 – 2.362), 1.667 (1.085 – 2.561), 1.881 (1.169 – 3.029), 1.675 (1.164 – 2.412)], miR-362-3p was an independent protective factor [HR (95% CI) = 0.649 (0.495 – 0.851)]. **Conclusion** The expression of LncRNA GATA3-AS1 is up-regulated and the expression of miR-362-3p is down-regulated in endometrial carcinoma tissues, which is related to malignant pathological parameters and poor prognosis. LncRNA GATA3-AS1 may participate in the progression of endometrial cancer by negatively regulating miR-362-3p.

**[Key words]** Endometrial cancer; GATA binding protein 3 antisense RNA1; MiR-362-3p; Pathological parameters; Prognosis

子宫内膜癌占女性生殖道恶性肿瘤的 20% ~ 30%<sup>[1-2]</sup>, 好发于围绝经期及绝经后女性, 随着年龄的增长其发病率也在上升<sup>[3]</sup>。长链非编码核糖核酸 (LncRNA) 以组织特异性方式表达, 通过与微小核糖核酸 (miRNA) 的相互作用影响靶基因的表达, 在子宫内膜癌发病过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。LncRNA GATA 结合蛋白 3 反义 RNA1 (LncRNA GATA3-AS1) 作为多种癌症的致癌基因, 已被证实在局部晚期乳腺癌、急性淋巴细胞白血病中表达上调, 与癌细胞增殖、对新辅助化疗耐药有关<sup>[5-6]</sup>。miR-362-3p 是一种具有抑癌活性的 miRNA, 在宫颈癌、卵巢癌组织中表达降低, 与癌细胞增殖、迁移和侵袭有关<sup>[7-8]</sup>。本研究拟分析两者在子宫内膜癌中的应用价值, 旨在为临床提供参考, 报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 回顾性选取 2018 年 1 月—2021 年 12 月安徽医科大学附属巢湖医院妇产科收治的子宫内膜癌患者 101 例为研究对象。年龄 51 ~ 77 (65.12 ± 8.09) 岁; 肿瘤直径: ≥3.0 cm 39 例, <3.0 cm 62 例; 国际妇产科学联盟 (FIGO) 分期: I ~ II 期 54 例, III A 期 47 例; 分化程度: 低分化 65 例, 中高分化 36 例; 肌层浸润深度: ≤1/2 43 例, >1/2 58 例; 有淋巴结转移 47 例, 无淋巴结转移 54 例。本研究经安徽医科大学附属巢湖医院伦理委员会批准 (KYXM-202310-040), 患者或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接受手术治疗, 经术后病理组织学证实为子宫内膜癌; ②符合手术标准, FIGO 分期 I ~ III A 期; ③年龄 ≥ 18 岁。(2) 排除标准: ①已经确诊其他妇科恶性肿瘤或其他部位原发肿瘤; ②发生远处转移者; ③有严重的器质性疾病, 如重大心、肺、肝、肾疾病等; ④免疫性疾病、既往妇科手术史。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p mRNA 检测及分组:** 于术中留取子宫内膜癌患者部分癌组织和癌旁组织(距离癌灶 5 cm 以上, 经术后病理学证实无肿瘤细胞侵犯), 使用 TRIzol 试剂(美国赛默飞世尔科技公司)从组织中提取总 RNA, 使用 M-MLV 逆转录酶试剂盒(美国 Promega 公司)将符合条件的 RNA(吸光度值 260/280 在 1.8 ~ 2.0) 逆转录为 cDNA。行实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 检测 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达水平。应用 Applied Biosystems 7500 qPCR 系统(美国赛默飞世尔科技公司), 以量化靶基因的相对表达。引物序列见表 1。反应条件: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 120 s, 共计 40 个循环。反应体系: 上游和下游引物(浓度为 10 μmmol/L)各 1.0 μl, cDNA 0.8 μl, 无 RNase H<sub>2</sub>O 12.2 μl 和 SYBRP Primmix Ex TaqTM 10 μl, 共 25 μl。2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p mRNA 相对表达量。以癌组织 LncRNA

GATA3-AS1、miR-362-3p 表达的平均值 4.23、1.35 为界, 分为 LncRNA GATA3-AS1 高表达组 52 例 ( $\geq 4.23$ ) 和低表达组 47 例 ( $< 4.23$ ), miR-362-3p 高表达组 49 例 ( $\geq 1.35$ ) 和低表达组 50 例 ( $< 1.35$ )。

表 1 LncRNA GATA3-AS1 和 miR-362-3p 引物序列

**Tab. 1** Primer sequences of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p

基 因	上游引物	下述引物
LncRNA GATA3-AS1	5'-TTGTTCCCTCTTC-GCTCCT-3'	5'-TTGTTCCCTCACCGCA-TG-3'
miR-362-3p	5'-AACACACCTATT-CAAGGATTCA-3'	5'-ACGTGACACGTTT-GGAGAATT-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAG-CACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATT-CCGT-3'

1.3.2 随访: 患者术后病理确诊后开始定期门诊复查和电话随访, 共随访 3 年, 第 1 年每 3 个月随访 1 次, 第 2~3 年每 6 个月随访 1 次, 随访截止时间为 2024 年 2 月。记录随访期间患者的总生存 (OS) 状态, OS 时间定义为确诊至死亡或随访截止时间。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 29.0 统计学软件分析数据。计数资料以频数或率 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用两独立样本  $t$  检验; Pearson 相关分析 LncRNA GATA3-AS1 与 miR-362-3p 的相关性; Kaplan-Meier 法分析 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达对子宫内膜癌患者生存预后的影响; 多因素 Cox 回归分析子宫内膜癌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 子宫内膜癌和癌旁组织中 LncRNA GATA3-AS1、

miR-362-3p 表达比较 子宫内膜癌患者癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 相对表达量高于癌旁组织, miR-362-3p 相对表达量低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 子宫内膜癌患者癌旁组织和癌组织中 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 2** Comparison of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p expression in adjacent and cancerous tissues of endometrial cancer patients

组 织	例数	LncRNA GATA3-AS1	miR-362-3p
癌旁组织	101	$2.02 \pm 0.63$	$2.57 \pm 0.61$
癌组织	101	$4.23 \pm 1.09$	$1.35 \pm 0.29$
$t$ 值		17.642	18.153
$P$ 值		<0.001	<0.001

2.2 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 与 miR-362-3p 表达相关性 Pearson 相关分析显示, 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达与 miR-362-3p 表达呈负相关 ( $r = -0.691, P < 0.001$ )。

2.3 子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达在不同临床病理特征中的差异 FIGO 分期 III A 期、肌层浸润深度  $> 1/2$ 、有淋巴结转移的子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达高于 FIGO 分期 I ~ II 期、肌层浸润深度  $\leq 1/2$ 、无淋巴结转移, 而 miR-362-3p 表达低于 FIGO 分期 I ~ II 期、肌层浸润深度  $\leq 1/2$ 、无淋巴结转移 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

2.4 癌组织中 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达对子宫内膜癌患者生存预后的影响 子宫内膜癌患者 101 例随访期间失访 2 例, 至随访结束时死亡 28 例, 3 年 OS 率为 71.72% (71/99)。LncRNA GATA3-AS1 高表达组 3 年 OS 率为 63.46% (33/52), 低于低表达组

表 3 不同临床/病理特征子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达比较

**Tab. 3** Comparison of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p expression in endometrial cancer tissues with different clinical/pathological features

项 目		例数	LncRNA GATA3-AS1	$t$ 值	$P$ 值	miR-362-3p	$t$ 值	$P$ 值
年 龄	<65 岁	32	$4.21 \pm 0.66$	0.226	0.821	$1.37 \pm 0.27$	0.471	0.639
	$\geq 65$ 岁	69	$4.24 \pm 0.60$			$1.34 \pm 0.21$		
肿 瘤 直 径	$\leq 3$ cm	39	$4.16 \pm 1.09$	0.514	0.609	$1.39 \pm 0.21$	1.273	0.206
	$> 3$ cm	62	$4.27 \pm 1.02$			$1.32 \pm 0.30$		
FIGO 分 期	I ~ II 期	54	$3.65 \pm 0.41$	16.168	<0.001	$1.49 \pm 0.11$	12.563	<0.001
	III A 期	47	$4.90 \pm 0.36$			$1.19 \pm 0.13$		
分 化 程 度	中高分化	65	$4.17 \pm 1.10$	0.777	0.439	$1.37 \pm 0.23$	1.142	0.256
	低分化	36	$4.34 \pm 0.96$			$1.31 \pm 0.29$		
肌 层 浸 润 深 度	$\leq 1/2$	43	$3.75 \pm 0.46$	9.423	<0.001	$1.45 \pm 0.12$	8.139	<0.001
	$> 1/2$	58	$4.59 \pm 0.43$			$1.28 \pm 0.09$		
淋 巴 结 转 移	无	54	$3.67 \pm 0.36$	20.066	<0.001	$1.42 \pm 0.12$	5.923	<0.001
	有	47	$4.87 \pm 0.21$			$1.27 \pm 0.13$		

的 80.85% (38/47) (Log-rank  $\chi^2 = 4.431, P = 0.032$ )；miR-362-3p 低表达组 3 年 OS 率为 62.00% (31/50)，低于高表达组的 81.63% (40/49) (Log-rank  $\chi^2 = 5.240, P = 0.022$ )，见图 1。

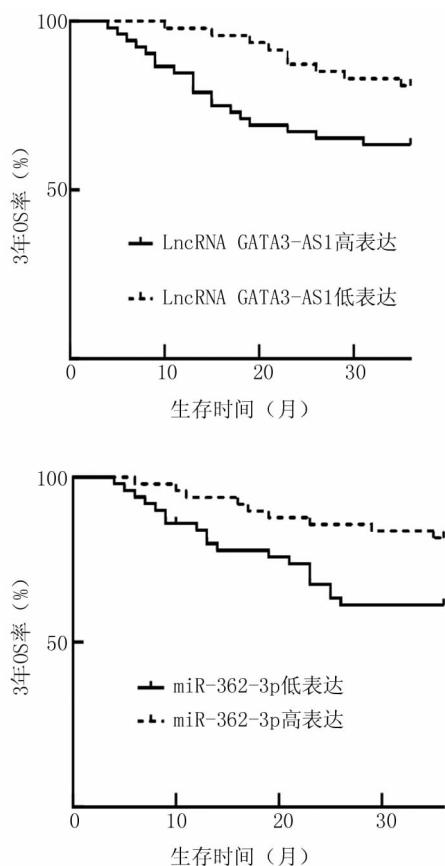


图 1 Kaplan-Meier 曲线分析 LncRNA GATA3-AS1、miR-362-3p 表达对子宫内膜癌患者生存预后的影响

**Fig. 1** Kaplan Meier curve analysis of the impact of LncRNA GATA3-AS1 and miR-362-3p expression on the survival prognosis of endometrial patients

**2.5 多因素 Cox 回归分析子宫内膜癌患者预后的影响因素** 以子宫内膜癌患者随访 3 年内存活情况为因变量(1=死亡, 0=存活), 以上述结果中  $P < 0.05$  项目为自变量进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示:

FIGO 分期ⅢA 期、肌层浸润深度  $> 1/2$ 、淋巴结转移、LncRNA GATA3-AS1 高表达是影响子宫内膜癌患者预后的独立危险因素, miR-362-3p 高表达为独立保护因素( $P < 0.05$ ), 见表 4。

### 3 讨 论

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一, 早期被诊断并接受子宫切除术治疗的患者预后相对较好, 但是中晚期子宫内膜癌患者由于丧失最佳手术治疗时机, 局部侵袭和远处转移率高, 预后较差<sup>[9]</sup>。异常的基因表达导致包括癌症在内的多种类型疾病发生, LncRNA 是非编码 RNA 的一大家族, 占所有 RNA 转录本的 80%, 在表观遗传、转录、转录后和翻译等多个水平参与多种信号通路的调控, 从而促进肿瘤细胞中复杂调控网络的形成, 与癌变和子宫内膜癌进展密切相关<sup>[10]</sup>。miRNA 是非编码 RNA 的另一个家族, 通过调控下游靶基因的表达, 在细胞分化、发育、代谢及肿瘤发生中起着重要作用, 研究表明其与子宫内膜癌细胞的侵袭和转移能力具有很强的相关性<sup>[11]</sup>。LncRNA 作为 miRNA 海绵调节癌细胞增殖、侵袭和转移, 参与子宫内膜癌发病和恶性进展的过程<sup>[12]</sup>。

LncRNA GATA3-AS1 是癌症的关键调节因子, 在胰腺癌组织和细胞系中上调, 作为 miR-30b-5p 的竞争性内源性 RNA, 通过负向调控 miR-30b-5p 及其下游靶基因睾丸表达基因 10 表达, 增强癌细胞活力, 促使癌细胞增殖和侵袭, 并抑制癌细胞凋亡<sup>[13]</sup>。LncRNA GATA3-AS1 在三阴性乳腺癌组织和细胞中明显过表达, 通过上调组成型光形态建成蛋白 9 信号体亚基 5 的表达, 稳定程序性死亡分子配体-1 蛋白, 并通过促进 GATA3 泛素化降解 GATA3 蛋白, 继而促进免疫逃逸和三阴性乳腺癌进展<sup>[14]</sup>。在肝癌发病过程中, LncRNA GATA3-AS1 高表达抑制磷酸酶和张力蛋白同源物、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A 和肿瘤蛋白 p53 表达, 促使肝癌细胞增殖和转移<sup>[15]</sup>。本研究发现 LncRNA GATA3-AS1 在子宫内膜癌组织中高表达可增强子宫内膜癌恶性病理学行为, 增加不良预后风

表 4 多因素 Cox 回归分析子宫内膜癌患者预后的影响因素

**Tab. 4** Multivariate Cox regression analysis of factors influencing the prognosis of endometrial cancer patients

变 量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	HR 值	95% CI
FIGO 分期ⅢA 期	0.493	0.187	6.950	0.001	1.637	1.135 ~ 2.362
肌层浸润深度 $> 1/2$	0.511	0.219	5.444	0.009	1.667	1.085 ~ 2.561
淋巴结转移	0.632	0.243	6.764	0.002	1.881	1.169 ~ 3.029
LncRNA GATA3-AS1 高	0.516	0.186	7.696	<0.001	1.675	1.164 ~ 2.412
miR-362-3p 高	-0.432	0.175	6.094	0.004	0.649	0.495 ~ 0.851

险。分析其机制,miR-361 是一种关键的肿瘤抑制因子,通过直接靶向致癌基因—信号转导与转录激活因子 3 来抑制子宫内膜癌细胞的增殖、侵袭<sup>[16]</sup>。LncRNA GATA3-AS1 在子宫内膜癌组织和细胞中表达上调,负向调控 miR-361 表达,上调下游直接靶基因人  $\beta$  抑制蛋白 2 表达,从而激活 Src/Akt 通路,诱导上皮间质转化,促使子宫内膜癌细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[17-19]</sup>。

miR-362-3p 参与调控肿瘤细胞迁移、侵袭、增殖和分化等过程,在癌变和肿瘤进展中发挥关键作用。既往研究显示,miR-362-3p 在卵巢癌组织和细胞系中显著下调,miR-362-3p 表达上调通过直接靶向下调纤溶酶原激活物抑制剂 1 RNA 结合蛋白的表达来抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移<sup>[20]</sup>。鼻窦鳞状细胞癌中 miR-362-3p 表达降低,miR-362-3p 表达上调通过靶向抑制垂体肿瘤转化基因 1 表达,限制癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化<sup>[21]</sup>。宫颈腺癌组织和细胞系中也检测到 miR-362-3p 的表达下调,其直接靶向负性调控微小染色体维持蛋白 5 表达,抑制宫颈癌细胞增殖<sup>[22]</sup>。本研究发现,miR-362-3p 表达降低与子宫内膜癌恶性病理参数有关,miR-362-3p 高表达是子宫内膜癌不良预后的保护因素。分析机制可能与 miR-362-3p 的抑癌作用有关,研究显示脂肪酸结合蛋白 5 (FABP5) 与脂肪酸合酶相互作用并激活泛素蛋白酶体通路,对癌细胞增殖、集落形成、迁移、侵袭及肿瘤生长具有促进作用<sup>[23]</sup>。FABP5 是 miR-362-3p 的下游靶标,miR-362-3p 过表达可能下调 FABP5 表达<sup>[24]</sup>,抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究相关性分析 LncRNA GATA3-AS1 与 miR-362-3p 表达呈负相关,提示 LncRNA GATA3-AS1 可能通过负向调控 miR-362-3p 表达,参与子宫内膜癌的恶性进展过程。

综上,子宫内膜癌组织中 LncRNA GATA3-AS1 表达上调,miR-362-3p 表达下调,LncRNA GATA3-AS1 高表达、miR-362-3p 低表达与子宫内膜癌恶性病理参数及不良预后有关。LncRNA GATA3-AS1 可能通过负向调控 miR-362-3p 表达参与子宫内膜癌病情进展。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

王嵘嵘:设计研究方案,实施研究过程,分析试验数据,论文撰写,论文审核;程开芳:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;程君墨:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;肖大树:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;朱楠:进行统计学分析

#### 参考文献

[1] 刘艳红,李虎,杨翔,等. 子宫内膜癌组织 LncRNACARLo-5、

- CDK2、CDKN1A 表达及临床意义 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20 (11): 1100-1105. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2021. 11. 005.
- [2] 郭伟,朱奕潼,丁高恒,等. 2009—2015 年甘肃省肿瘤登记地区子宫体癌发病与死亡特征分析 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2021, 35 (3): 207-211. DOI: 10. 11904/j. issn. 1002-3070. 2021. 03. 003.
- [3] 赵湘铃,段朝晖,张敏,等. 中国子宫内膜癌疾病负担状况及流行趋势预测 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2023, 31 (8): 568-573. DOI: 10. 16386/j. ejcped. issn. 1004-6194. 2023. 08. 002.
- [4] LI L, Chen P, Huang B, et al. lncRNA DSCAM-AS1 facilitates the progression of endometrial cancer via miR-136-5p [J]. Oncol Lett, 2021, 22 (6): 825. DOI: 10. 3892/ol. 2021. 13086.
- [5] Contreras-Espinosa L, Alcaraz N, De La Rosa-Velázquez IA, et al. Transcriptome analysis identifies GATA3-AS1 as a long noncoding RNA associated with resistance to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer patients [J]. J Mol Diagn, 2021, 23 (10): 1306-1323. DOI: 10. 1016/j.jmoldx. 2021. 07. 014.
- [6] 秦彦,韵雪雪,郑忠梅,等. lncRNA GATA3-AS1 靶向 miR-515-5p 对儿童急性淋巴细胞白血病细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2023, 31 (4): 1032-1037. DOI: 10. 19746/j. cnki. issn1009-2137. 2023. 04. 016.
- [7] 赵虹,张芬,张振东. 宫颈癌中高危型 HPV 感染与 miR-362-3p、Nemo 样激酶表达的相关性研究 [J]. 病毒学报, 2021, 37 (6): 1363-1369. DOI: 10. 13242/j. cnki. bingduxuebao. 004054.
- [8] Li C, Yang Y, Wang H, et al. miR-362-3p suppresses ovarian cancer by inhibiting LRP8 [J]. Transl Oncol, 2022, 15 (1): 101284. DOI: 10. 1016/j. tranon. 2021. 101284.
- [9] Xie G, Qi C, Yang W, et al. Competing risk nomogram predicting cancer-specific mortality for endometrial cancer patients treated with hysterectomy [J]. Cancer Med, 2021, 10 (10): 3205-3213. DOI: 10. 1002/cam4. 3887.
- [10] Zhang HQ, Li T, Li C, et al. LncRNA THOR promotes endometrial cancer progression through the AKT and ERK signaling pathways [J]. Med Oncol, 2022, 39 (12): 207. DOI: 10. 1007/s12032-022-01802-z.
- [11] Paterson E, Blenkiron C, Danielson K, et al. Recommendations for extracellular vesicle miRNA biomarker research in the endometrial cancer context [J]. Transl Oncol, 2022, 23: 101478. DOI: 10. 1016/j. tranon. 2022. 101478.
- [12] Shetty A, Venkatesh T, Kabbekodu SP, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: A comprehensive overview [J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306 (5): 1431-1447. DOI: 10. 1007/s00404-022-06423-5.
- [13] Liu Y, Xu G, Li L. LncRNA GATA3AS1miR30b5pTex10 axis modulates tumorigenesis in pancreatic cancer [J]. Oncol Rep, 2021, 45 (5): 59. DOI: 10. 3892/or. 2021. 8010.
- [14] Zhang M, Wang N, Song P, et al. LncRNA GATA3-AS1 facilitates tumour progression and immune escape in triple-negative breast cancer through destabilization of GATA3 but stabilization of PD-L1 [J]. Cell Prolif, 2020, 53 (9): e12855. DOI: 10. 1111/cpr. 12855.

(下转 1209 页)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 009

论著 · 临床

# 血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与老年慢性心力衰竭患者心功能的相关性及对诊断的价值

安然, 韩建妙, 张倩, 朱娜娜, 闫士然



基金项目: 河北省医学科学研究课题计划(20220199)

作者单位: 050000 石家庄, 石家庄市第三医院老年医学二科

通信作者: 韩建妙, E-mail: 592311028@qq.com

**【摘要】 目的** 探讨血尿酸、肠道菌群、微小 RNA-25 (miR-25) 水平与老年慢性心力衰竭 (CHF) 患者心功能的相关性及诊断价值。**方法** 选取 2021 年 2 月—2024 年 2 月石家庄市第三医院老年医学二科收治的老年 CHF 患者 110 例作为 CHF 组, 根据纽约心脏病协会 (NYHA) 心功能分级将患者分为 II 级 44 例、III 级 37 例、IV 级 29 例。另选取同期健康体检者 110 例作为健康对照组。Pearson 法分析血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与老年 CHF 患者心功能分级的相关性; 多因素 Logistic 回归分析老年 CHF 患者发病的影响因素; 受试者工作特征 (ROC) 曲线分析血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平诊断老年 CHF 的价值。**结果** CHF 组血清尿酸、miR-25 水平高于健康对照组, 双歧杆菌、乳杆菌低于健康对照组 ( $t/P = 8.993/ < 0.001, 9.656/ < 0.001, 9.516/ < 0.001, 6.542/ < 0.001$ ); 血清尿酸、miR-25 水平比较, NYHA 心功能 IV 级  $>$  III 级  $>$  II 级老年 CHF 患者 ( $F/P = 3.524/0.033, 11.062/ < 0.001$ ), 双歧杆菌、乳杆菌比较, NYHA 心功能 IV 级  $<$  III 级  $<$  II 级老年 CHF 患者 ( $F/P = 10.008/ < 0.001, 37.612/ < 0.001$ ); 血尿酸、miR-25 与 NYHA 心功能分级呈正相关 ( $r/P = 0.528/ < 0.001, 0.482/ < 0.001$ ), 双歧杆菌、乳杆菌与 NYHA 心功能分级呈负相关 ( $r/P = -0.466/ < 0.001, -0.474/ < 0.001$ ); 多因素 Logistic 回归分析显示, 血尿酸、miR-25 升高为老年 CHF 患者发病的独立危险因素 [ $OR(95\% CI) = 1.721(1.339 \sim 5.182), 1.381(1.151 \sim 3.221)$ ], 双歧杆菌、乳杆菌升高为独立保护因素 [ $OR(95\% CI) = 0.971(0.957 \sim 0.985), 0.952(0.940 \sim 0.988)$ ]; 血尿酸、双歧杆菌、乳杆菌、miR-25 及四者联合诊断老年 CHF 的 AUC 分别为 0.780、0.773、0.675、0.822、0.936, 四者联合的 AUC 大于各自单独诊断效能 ( $Z/P = 5.259/ < 0.001, 5.319/ < 0.001, 7.157/ < 0.001, 4.883/ < 0.001$ )。**结论** 血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与老年 CHF 患者病情严重程度有关, 上述指标联合对诊断老年 CHF 具有较高效能。

【关键词】 慢性心力衰竭; 血尿酸; 肠道菌群; 微小 RNA-25; 心功能; 相关性

【中图分类号】 R541.6

【文献标识码】 A

**Study on the correlation between cardiac function and blood uric acid, intestinal flora and miR-25 level in elderly patients with chronic heart failure** An Ran, Han Jianmiao, Zhang Qian, Zhu Nana, Yan Shiran. Department of Geriatrics, Shijiazhuang Third Hospital, Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China

Funding program: 2022 Hebei Medical Science Research Project (20220199)

Corresponding author: Han Jianmiao, E-mail: 592311028@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between cardiac function and serum uric acid, intestinal flora and miR-25 level in elderly patients with chronic heart failure. **Methods** A total of 110 elderly CHF patients admitted to the Second Department of Geriatric Medicine in the Third Hospital of Shijiazhuang from February 2021 to February 2024 were selected as the CHF group, according to the New York Heart Association (NYHA) cardiac function classification, the patients were divided into Grade II (44 cases), grade III (37 cases), and grade IV (29 cases). Another 110 healthy subjects were selected as the control group. The correlation of serum uric acid, intestinal flora, miR-25 level and cardiac function grade in elderly patients with CHF was analyzed by Pearson method. Multivariate Logistic regression was used to analyze the influencing factors of CHF in elderly patients. The value of serum uric acid, intestinal flora and miR-25 levels in the diagnosis of CHF in the elderly was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Serum uric acid and miR-25 in chronic heart failure group were higher than those in control group, bifidobacterium and Lactobacillus were lower than those in control group ( $t/P = 8.993/ < 0.001, 9.656/ < 0.001, 9.516/ < 0.001, 6.542/ < 0.001$ ). The levels of serum uric acid and miR-25 in NYHA elderly CHF patients with cardiac function in grade IV  $>$  Grade III  $>$  Grade II were compared ( $F/P = 3.524/0.033, 11.062/ < 0.001$ ).

<0.001). The comparison of Bifidobacterium and Lactobacillus showed that NYHA elderly CHF patients with cardiac function in grade IV < grade III < grade II ( $F/P=10.008/ < 0.001, 37.612/ < 0.001$ ). Pearson correlation analysis showed that blood uric acid and miR-25 were positively correlated with cardiac function classification ( $r/P=0.528/ < 0.001, 0.482/ < 0.001$ ), while bifidobacterium and Lactobacillus were negatively correlated with cardiac function classification ( $r/P = -0.466/ < 0.001, -0.474/ < 0.001$ ). Multivariate Logistic regression analysis showed that high blood uric acid and high miR-25 were independent risk factors for the onset of CHF in elderly patients [ $OR (95\% CI) = 1.721 (1.339 - 5.182), 1.381 (1.151 - 3.221)$ ]. Bifidobacteria high and Lactobacillus high were independent protective factors [ $OR (95\% CI) = 0.971 (0.957 - 0.985), 0.952 (0.940 - 0.988)$ ]. The AUC of serum uric acid, bifidobacterium, Lactobacillus, miR-25 and the four combined in the diagnosis of elderly CHF were 0.780, 0.773, 0.675, 0.822, 0.936, respectively, and the AUC of the four combined was greater than the diagnostic efficacy of each alone ( $Z/P = 5.259/ < 0.001, 5.319/ < 0.001, 7.157/ < 0.001, 4.883/ < 0.001$ ). **Conclusion** Serum uric acid, intestinal flora and miR-25 levels are related to the severity of cardiac function in elderly patients with chronic heart failure, and the combined detection of these indicators has high predictive efficacy for chronic heart failure.

**[Key words]** Chronic heart failure; Blood uric acid; Intestinal flora; Micro RNA-25; Cardiac function; Correlation

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由于心脏负荷过重、原发性心肌损害、心肌收缩和舒张功能障碍而引起的心脏疾病<sup>[1]</sup>。目前,临床虽然已经在CHF治疗中取得突破,应用各种措施保障患者生命安全<sup>[2]</sup>,但患者用药后依然常见各种心血管事件,特别是在CHF后期,患者住院时间更长,再次入院概率较高<sup>[3]</sup>。有研究指出,CHF病理发展与神经内分泌激活、细胞因子紊乱等有关,通过及时有效治疗可改善患者预后<sup>[4]</sup>。因此早期诊断和病情评估非常重要<sup>[5]</sup>。尿酸是嘌呤最终代谢产物,其产生和排泄与某些病理生理有关,且有研究显示,高尿酸血症与心脏亚临床损害有关<sup>[6]</sup>。肠道微生物群在宿主生物体微生物、代谢和免疫反应中起调节作用,参与肠和肠外器官损伤发展<sup>[7]</sup>。微小RNA-25(microRNAs-25, miR-25)参与细胞增殖、分化、迁移、凋亡、氧化应激等多种生物过程,被认为是常见癌性和非癌性疾病关键调节因子<sup>[8]</sup>。但miR-25在其他病因心力衰竭患者中是否存在差异性表达,与CHF患者心功能是否存在相关性,目前均未明晰。本研究旨在探讨血尿酸、肠道菌群、miR-25水平与老年CHF患者心功能的相关性及对诊断的价值,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选取2021年2月—2024年2月石家庄市第三医院老年医学二科收治的CHF患者110例作为CHF组, NYHA心功能分级:Ⅱ级44例、Ⅲ级37例、Ⅳ级29例。另选取同期医院健康体检者110例作为健康对照组。2组性别、年龄、体质质量指数(BMI)、病程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[(2021)伦理审批第019号],入选者或家属知情同意并签署知情同意书。

表1 健康对照组与CHF组临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical data between healthy control group and CHF group

项 目	健康对照组 (n=110)	CHF 组 (n=110)	t/χ <sup>2</sup> 值	P 值
性别[例(%)]	男 58(52.73)	54(49.09)	0.291	0.590
	女 52(47.27)	56(50.91)		
年龄(岁)	70.22 ± 4.12	70.11 ± 4.25	0.195	0.846
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.46 ± 1.28	22.59 ± 1.33	0.739	0.461
病程(年)		3.56 ± 0.52		

**1.2 病例选择标准** (1)纳入标准:①符合《慢性心力衰竭基层诊疗指南》<sup>[9]</sup>CHF诊断标准:具备心力衰竭症状与体征、心脏舒张功能异常、左心室肥厚/左心房扩大;②心力衰竭病史>6个月;③年龄>60岁;④临床资料齐全者。(2)排除标准:①入院前6个月内存在心肌梗死病史者;②合并恶性肿瘤者;③合并肝肾功能不全者;④伴有血容量不足、活动性感染者;⑤先天性风湿性心脏病所致心力衰竭者;⑥合并急慢性感染者。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 血清尿酸水平检测:**患者于入院次日晨/健康对照组于体检当日采集空腹肘静脉血3ml,离心留取血清待测。采用尿酸酶法检测血清尿酸水平,仪器为美国雅培Aerostet全自动生化分析仪,试剂和标准品由北京利德曼公司提供。

**1.3.2 肠道菌群检测:**采集2组患者新鲜粪便30g,取5g湿便标本无菌培养,应用ATB半自动微生物鉴定系统进行双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌及肠杆菌的菌群鉴定,以每克粪便湿重中菌落形成单位数的对数值(IgN/g)表示。

**1.3.3 血清miR-25水平检测:**采集患者空腹静脉血4ml,离心分离血清(半径:12cm,时间:15min,转速:3500r/min),通过Trizol法提取血清中总RNA,采用

TOYOB0 型反转录试剂盒(上海松雷生物科技有限公司)将总 RNA 反转录成 cDNA。采用 FTC-2000 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行实时荧光定量聚合酶链式反应。反应参数:92℃ 预变性 5 min, 93℃ 变性 35 min, 62℃ 退火 45 s, 74℃ 延伸 1 min, 共循环 42 次。以 U6 作为内参,通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算血清 miR-25 相对表达量。引物序列:上游引物 5'-ACGCTCAGTT-TAATGCTAACCGTGA-3'; 下游引物 5'-ATTCCATGT-GTCCACTGTCTGTG-3'; U6 上游引物 5'-AGAGAAGATT-AGCATGGACCCTG-3'; 下游引物 5'-ATCCAGTG-CAGGGTCCGAGG-3'。

**1.4 统计学方法** 选用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较行  $\chi^2$  检验;符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用 F 检验;Pearson 法分析血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与老年 CHF 患者心功能分级的相关性;多因素 Logistic 回归分析老年 CHF 患者发病的影响因素;受试者工作特征(ROC)曲线分析血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平诊断老年 CHF 的价值。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 2 组血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平比较** CHF 组血清尿酸、miR-25 水平高于健康对照组,双歧杆菌、乳杆菌低于健康对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。

**2.2 不同 NYHA 心功能分级老年 CHF 患者血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平比较** 血清尿酸、miR-25 水平比较,NYHA 心功能Ⅳ级>Ⅲ级>Ⅱ级老年 CHF 患者

( $P < 0.05$ );双歧杆菌、乳杆菌比较,NYHA 心功能Ⅳ级<Ⅲ级<Ⅱ级老年 CHF 患者( $P < 0.01$ ),见表 3。

**2.3 血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与 NYHA 心功能分级的相关性** Pearson 相关性分析显示,老年 CHF 患者血清尿酸、miR-25 水平与 NYHA 心功能分级呈正相关( $r/P = 0.528/ < 0.001, 0.482/ < 0.001$ ),双歧杆菌、乳杆菌与 NYHA 心功能分级呈负相关( $r/P = -0.466/ < 0.001, -0.474/ < 0.001$ )。

**2.4 多因素 Logistic 回归分析老年 CHF 患者发病的影响因素** 以老年 CHF 患者发病为因变量(赋值:有为“1”;无为“0”),以上述结果中有差异项目为自变量,进行多因素 Logistic 回归分析。结果显示:血尿酸、miR-25 升高为老年 CHF 患者发病的独立危险因素,双歧杆菌、乳杆菌升高为独立保护因素( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 4 Logistic 回归分析老年 CHF 患者发病的影响因素

**Tab. 4** Logistic regression analysis of influencing factors on the incidence of CHF in elderly patients

自变量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
血尿酸高	0.429	0.261	5.198	0.031	1.721	1.339 ~ 5.182
双歧杆菌高	-0.029	0.007	16.022	<0.001	0.971	0.957 ~ 0.985
乳杆菌高	-0.112	0.54	4.433	0.025	0.952	0.940 ~ 0.988
miR-25 高	0.433	0.218	4.628	0.037	1.381	1.151 ~ 3.221

**2.5 血尿酸、肠道菌群、miR-25 诊断老年 CHF 的价值** 绘制血尿酸、双歧杆菌、乳杆菌、miR-25 单独与联合诊断老年 CHF 的 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC),结果显示:血尿酸、双歧杆菌、乳杆菌、miR-25

表 2 健康对照组与 CHF 组血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 2** Comparison of blood uric acid, gut microbiota, and miR-25 levels between healthy control group and CHF group

组 别	例数	血尿酸(μmol/L)	双歧杆菌(IgN/g 湿便)	乳杆菌(IgN/g 湿便)	miR-25
健康对照组	110	320.56 ± 80.37	8.09 ± 1.01	6.05 ± 0.87	1.13 ± 0.21
CHF 组	110	425.52 ± 92.33	7.01 ± 0.63	5.38 ± 0.63	1.41 ± 0.22
<i>t</i> 值		8.993	9.516	6.542	9.656
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 不同 NYHA 心功能分级老年 CHF 患者血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 3** Comparison of blood uric acid, gut microbiota, and miR-25 levels in elderly CHF patients with different NYHA heart function grades

组 别	例数	血尿酸(μmol/L)	双歧杆菌(IgN/g 湿便)	乳杆菌(IgN/g 湿便)	miR-25
Ⅱ级	44	402.86 ± 80.67	7.30 ± 0.76	5.75 ± 0.68	1.45 ± 0.27
Ⅲ级	37	437.05 ± 88.13	7.08 ± 0.74	5.20 ± 0.55	1.69 ± 0.33
Ⅳ级	29	455.15 ± 91.27	6.51 ± 0.73	4.51 ± 0.52	1.76 ± 0.31
<i>F</i> 值		3.524	10.008	37.612	11.062
<i>P</i> 值		0.033	<0.001	<0.001	<0.001

及四者联合诊断老年 CHF 的 AUC 分别为 0.780、0.773、0.675、0.822、0.936, 四者联合的 AUC 大于各自单独诊断 ( $Z = 5.259, 5.319, 7.157, 4.883, P < 0.001$ ), 见表 5、图 1。

表 5 血尿酸、肠道菌群、miR-25 诊断老年 CHF 的价值

**Tab. 5** The diagnostic value of serum uric acid, gut microbiota, and miR-25 for elderly CHF

指 标	截断值	AUC	95% CI	敏感度	特异度	约登指数
血尿酸	397.623 μmol/L	0.780	0.720 ~ 0.833	0.600	0.891	0.491
双歧杆菌	7.418 IgN/g	0.773	0.712 ~ 0.827	0.736	0.736	0.473
乳杆菌	5.665 IgN/g	0.675	0.609 ~ 0.737	0.918	0.436	0.354
miR-25	1.246	0.822	0.765 ~ 0.870	0.764	0.746	0.510
四者联合		0.936	0.895 ~ 0.964	0.927	0.800	0.727

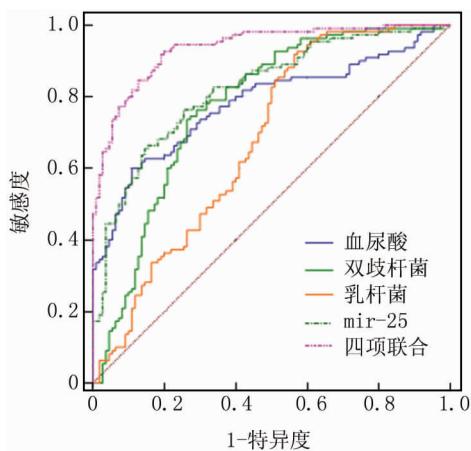


图 1 血尿酸、肠道菌群、miR-25 诊断老年 CHF 的 ROC 曲线

**Fig. 1** ROC curves of serum uric acid, gut microbiota, and miR-25 for diagnosing elderly CHF

### 3 讨 论

CHF 是一种进行性疾病,由心肌病、冠心病、心律失常等多种原因引起心脏功能和/或结构改变而起病,主要表现为心脏收缩功能或舒张功能减退的复杂临床综合征,是各种心脏疾病严重阶段或晚期表现。数据显示,我国心力衰竭患病率随社会人口老龄化逐年上升,35 岁以上居民心力衰竭患病率为 1.3%,估计全国现有心力衰竭患者约 890 万<sup>[10]</sup>。心力衰竭发病机制较为复杂,初始阶段交感神经系统、肾素—血管紧张素—醛固酮系统 (RASS) 异常激活,通过水钠潴留、心肌收缩增强及血管收缩等维持生理所需心输出量,这些机制最终因心肌能量代谢紊乱和心肌炎性反应激活使心力衰竭走向终末阶段<sup>[11]</sup>。由于 CHF 症状多样,缺乏特异性,增加诊断难度<sup>[12]</sup>。NYHA 心功能分级将患者心功能受损情况分为 4 级,但仅依靠患者主观陈

述做出分级判断,与客观检查结果差异较大,只能作为初步临床判断。

血清尿酸是由核酸代谢产生,在心血管疾病中发挥着重要生理和病理作用<sup>[13]</sup>。临床表明,尿酸在体内经过嘌呤核苷酸代谢途径生成,这一过程在肝脏和肾脏中进行,当心力衰竭发生时,机体处于低灌注状态,导致肝脏和肾脏的代谢能力下降,影响尿酸合成和排泄<sup>[14]</sup>。心力衰竭患者存在一系列代谢异常,如低钠血症、高胰岛素血症等,影响尿酸代谢<sup>[15]</sup>。人体内大约有 100 万亿个微生物,其中胃肠道中微生物约占总菌群的 80%。肠道微生物群在宿主生物体微生物、代谢和免疫反应中起调节作用,能介导多种病因引起损害进展或程度加重,进而破坏宿主局部和系统内稳态<sup>[16]</sup>。机体和肠道微生物作用不是单向的,涉及与宿主环境相互作用,肠道菌群可通过神经、内分泌以及免疫途径参与肠道与中枢神经系统双向调节。肠道和大脑之间双向通路通常被称为“肠—脑轴”或“脑—肠轴”,肠道微生物群通过该轴对神经系统疾病起关键作用<sup>[17]</sup>。机体在心力衰竭状态下,肠道最早发生缺血缺氧,表现为低灌注和通透性增加,即使在低级别活动状况下,肠壁循环和微循环障碍导致肠黏膜水肿和吸收不良,免疫防御能力减弱,细菌毒素向肠外组织器官移位。国外研究指出,与健康对照组比较,中重度心力衰竭患者肠道渗透性增加,重度心力衰竭患者粪便培养中沙门菌、假丝酵母菌等致病菌生长明显增加<sup>[18]</sup>。微小 RNA (miRNAs) 是一类非编码 RNA 分子,通过与特定 RNA 靶点结合,调节基因表达和细胞病理过程。miRNA 调节靶基因表达,参与转录后基因表达调控,在心血管、病毒感染、癌症等疾病中发挥主要作用。成熟 miRNA 在细胞生长、增殖、分化和疾病进展中至关重要,是各种癌症、血液系统疾病、肾脏疾病中磷酸酶基因 (PTEN) 潜在上游介质。miR-25 是脊椎动物高度保守 miR-106b-25 簇成员之一。在生理条件下,miR-25 参与发育事件调控,靶控 mRNA 参与细胞对 DNA 损伤反应、细胞周期调控、细胞增殖、迁移和分化<sup>[19]</sup>。在病理生理条件下,miR-25 是一种致癌 miRNA,已被证实参与各种心血管疾病<sup>[20]</sup>。miR-25 在心肌生长和心脏细胞发育中发挥负调节作用,影响心力衰竭发生发展。

本研究结果显示,CHF 组血尿酸、miR-25 高于健康对照组,双歧杆菌、乳杆菌低于健康对照组, NYHA 心功能Ⅳ级患者血尿酸、miR-25 水平高于Ⅲ级、Ⅱ级, 双歧杆菌、乳杆菌低于Ⅲ级、Ⅱ级, 血尿酸、miR-25 与 NYHA 心功能分级呈正相关, 双歧杆菌、乳杆菌与 NYHA 心功能分级呈负相关。血尿酸、miR-25 升高为老年 CHF 患者发病的独立危险因素,双歧杆菌、乳杆

菌升高为独立保护因素,参与疾病发生发展。血尿酸本身可引起心室重构,损伤血管内皮细胞和平滑肌增生,其水平升高表示心力衰竭患者肾脏功能受损,心功能同步下降。李进红等<sup>[21]</sup>研究指出,血尿酸诊断 CHF 的检测率为 60.19%。心力衰竭患者心脏功能受损,导致组织灌注不足,影响肠道形态、渗透性,损害肠屏障功能,加速系统炎性反应。肠道菌群改变及其代谢产物会使心力衰竭进一步恶化,患者发生心力衰竭也会导致肠道菌群失调,二者相互影响,调节肠道菌群可能作为心力衰竭患者治疗新靶点<sup>[22]</sup>。miR-25 在心脏肥大、纤维化和心力衰竭中以时间依赖性方式调节,模拟物可在心脏重塑和心力衰竭早期阶段发挥作用。有研究显示,miR-25 过表达会导致心肌肥大、心肌纤维化和细胞凋亡,与本研究结果相符<sup>[23]</sup>。本研究 ROC 曲线分析结果显示,血尿酸、双歧杆菌、乳杆菌、miR-25 联合诊断老年 CHF 的 AUC 值高于单项检测,提示上述指标联合诊断老年 CHF 的效能较高。

综上所述,血尿酸、肠道菌群、miR-25 水平与老年 CHF 患者病情严重程度有关,上述指标联合对诊断老年 CHF 具有较高效能。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

安然:设计研究方案,实施研究过程,分析试验数据,论文撰写;韩建妙:提出研究思路,进行课题设计,论文审核;张倩、朱娜娜:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;闫士然:实施研究过程,统计学分析,参与撰写

## 参考文献

- [1] 马梦琪,彭芳,江雪萌,等.慢性心力衰竭病人治疗负担研究进展[J].护理研究,2023,37(10):1760-1764. DOI:10.12102/j.issn.1009-6493.2023.10.013.
- [2] 司全金.开拓慢性心力衰竭治疗新思路[J].中华老年心脑血管病杂志,2020,22(10):1009-1011. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2020.10.001.
- [3] 王立立.慢性心力衰竭药物治疗的新证据与新观念[J].中华老年心脑血管病杂志,2023,25(5):449-452. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2023.05.001.
- [4] 郭智星,高传玉.慢性心力衰竭药物治疗研究进展[J].中国心血管病研究,2022,20(12):1129-1134. DOI:10.3969/j.issn.1672-5301.2022.12.013.
- [5] 许鹏,陈敏.不同 NYHA 心功能分级慢性心力衰竭患者心脏标志物四项,PCT,BNP 水平变化及临床意义[J].海南医学,2021,32(19):2488-2491. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2021.19.010.
- [6] 刘迪丹,高凯,谢扬,等.高尿酸对心肌细胞活力的影响及其相关机制探讨[J].天津医药,2020,48(10):931-936. DOI:10.11958/2020201203.
- [7] 杨竹青,宋万明,陈从英,等.影响宿主脂肪沉积的肠道微生物类别及其作用机理研究[J].动物营养学报,2023,35(11):6801-6809. DOI:10.12418/CJAN2023.619.
- [8] 张雪峰,赵姝欣,杨宇,等.心衰康胶囊对心力衰竭模型大鼠心肌组织 SERCA2a, miRNA 表达的影响[J].中医杂志,2023,64(7):716-721. DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.07.012.
- [9] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.慢性心力衰竭基层诊疗指南(实践版·2019)[J].中华全科医师杂志,2019,18(10):948-956. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-7368.2019.10.009.
- [10] Metra M, Lucioli P. Corrigendum to prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: The China hypertension survey, 2012-2015 [ Eur J Heart Fail 2019; 21: 1329-1337 ] [J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(4):759. DOI:10.1002/ejhf.1808.
- [11] 赵振霞,赵志尧,贾奎.浅谈心肺气血与慢性心力衰竭[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(20):3501-3503. DOI:10.12102/j.issn.1672-1349.2020.20.052.
- [12] Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: A report of the American college of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines[J]. Circulation, 2022, 145(18):895-1032. DOI:10.1161/CIR.0000000000001063.
- [13] 吴炎,王亚军,蒲红.血清尿酸水平与急性心力衰竭患者近 2 年预后的关系[J].中国循证心血管医学杂志,2020,12(9):1094-1097. DOI:10.3969/j.issn.1674-4055.2020.09.18.
- [14] 张丽伟.慢性心力衰竭患者血清尿酸,N 末端 B 型利钠肽原,血管形成抑制素-2 与左心室射血分数的相关性[J].实用临床医药杂志,2020,24(12):29-31. DOI:10.7619/jcmp.202012008.
- [15] 崔泽岩,臧艳静,高淑娜.血清糖类抗原 125,氨基末端脑钠肽前体和尿酸联合检测对慢性心力衰竭合并心房颤动患者预后的评估价值[J].临床内科杂志,2021,38(2):97-100. DOI:10.3969/j.issn.1001-9057.2021.02.008.
- [16] 张振东,蔡斌,王宏伟,等.肠道菌群及其代谢产物苯乙酰谷氨酰胺在慢性心力衰竭患者中的变化研究[J].中国全科医学,2023,26(29):3665-3673. DOI:10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0166.
- [17] 贾秋瑾,吕仕超,张军平.慢性心力衰竭患者肠道菌群改变的系统评价[J].中华心血管病杂志,2021,49(10):1012-1019. DOI:10.3760/cma.j.cn121248-20210831-00754.
- [18] Dai H, Hou T, Wang Q. Causal relationships between the gut microbiome, blood lipids, and heart failure: A Mendelian randomization analysis[J]. Eur J Prev Cardiol, 2023, 30(12):1274-1282. DOI:10.1093/eurjpc/zwad171.
- [19] Sárközy M, Kahán Z, Csont T. A myriad of roles of miRNA in health and disease[J]. Oncotarget, 2018, 9(30):21580-21612. DOI:10.18632/oncotarget.24662.
- [20] Yang SF, Huang PH. MiRNA is a potential treatment target for myocardial ischemic-reperfusion injury[J]. J Chin Med Assoc, 2020, 83(5):419-420. DOI:10.1016/j.phrs.2023.106957.
- [21] 李进红,汤冬静.血清 BNP、hs-CRP、UA 与 cTnT 联合检测对心力衰竭的诊断价值研究[J].中国现代药物应用,2024,18(6):65-67. DOI:10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2024.06.016.
- [22] Sanna S, Van Zuydam NR, Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases[J]. Nat Genet, 2019, 51(4):600-605. DOI:10.1038/s41588-019-0350-x.
- [23] 黄露,胡增美,侯佳华,等. microRNA 在心力衰竭中的调控作用及中西药物干预研究进展[J].解放军医学杂志,2023,48(3):331-338. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2023.03.0331.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 010

论著 · 临床

# 银杏二萜内酯葡萄糖注射液治疗急性脑梗死的疗效及对神经功能、血液流变学、神经损伤因子的影响

戴静怡, 尹江宁, 高俊, 张士卿, 赵静, 彭易根



基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目(YB201990); 江苏卫生健康职业学院科研项目(JKC202010)

作者单位: 211100 南京, 江苏省南京市江宁医院急诊科

通信作者: 高俊, E-mail:jnyyjzgj@163.com

**【摘要】 目的** 探讨银杏二萜内酯葡萄糖注射液(DGMI)辅助治疗急性脑梗死(ACI)的临床疗效及可能作用机制。**方法** 选择2021年7月—2023年6月江苏省南京市江宁医院急诊科收治的ACI患者103例作为研究对象,采用随机数字表法分为对照组( $n=51$ )和观察组( $n=52$ )。对照组给予西医常规治疗,观察组在对照组治疗基础上联合应用DGMI辅助治疗。治疗2周后,观察2组临床疗效,比较2组治疗前后血清炎性因子[C反应蛋白(CRP)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]、凝血功能[凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(Fib)]、血液流变学(全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容)、血清神经损伤因子[神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、S100B蛋白(S100B)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)]、神经功能[美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评分]、认知功能[简易精神状态量表(MMSE)评分]及日常生活能力[Barthel指数(BI)评分]变化,统计不良反应发生情况。**结果** 治疗2周后,观察组有效率高于对照组(94.23% vs. 74.51%,  $\chi^2/P = 7.632/0.006$ )。观察组血清CRP、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平低于对照组( $t/P = 8.990/ < 0.001, 7.025/ < 0.001, 4.546/ < 0.001$ ); PT、TT、APTT高于对照组( $t/P = 6.185/ < 0.001, 8.336/ < 0.001, 6.782/ < 0.001$ ), Fib低于对照组( $t/P = 6.683/ < 0.001$ ); 全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容低于对照组( $t/P = 3.553/0.001, 5.667/ < 0.001, 11.933/ < 0.001, 10.497/ < 0.001$ ); GFAP、S100B、NSE水平低于对照组( $t/P = 6.364/ < 0.001, 5.707/ < 0.001, 4.847/ < 0.001$ ); NIHSS评分低于对照组( $t/P = 9.707/ < 0.001$ ), MMSE评分和BI评分高于对照组( $t/P = 7.847/ < 0.001, 11.421/ < 0.001$ ); 2组不良反应比较差异无统计学意义(13.46% vs. 9.80%,  $\chi^2/P = 0.335/0.563$ )。**结论** DGMI辅助治疗能够提高ACI患者临床疗效,改善患者认知功能和日常生活能力,可能与拮抗炎性反应、改善凝血功能和血液流变学、抑制神经损伤因子表达等因素有关。

**【关键词】** 急性脑梗死; 银杏二萜内酯葡萄糖; 凝血功能; 血液流变学; 炎性反应; 神经功能; 认知功能; 神经损伤因子

【中图分类号】 R743.33

【文献标识码】 A

**The impact of inflammatory reaction, coagulation function, hemorheology, and nerve injury factors of EGMI for patients with acute cerebral infarction** Dai Jingyi, Yin Jiangning, Gao Jun, Zhang Shiqing, Zhao Jing, Peng Yigen. Department of Emergency, Nanjing Jiangning Hospital, Jiangsu Province, Nanjing 211100, China

**Funding program:** Jiangsu Province Chinese Medicine Science and Technology Development Program (YB201990); Scientific Research Project of Jiangsu College of Health and Wellness Professions (JKC202010)

**Corresponding author:** Gao Jun, E-mail: jnyyjzgj@163.com

**[Abstract]** **Objective** To analyzed clinical efficacy and possible mechanism of DGMI in treatment of patients with ACI. **Methods** 103 patients with ACI 2021 July to 2023 June were divided into observation group ( $n=52$ ) and control group ( $n=51$ ). The control group given routine western medicine, the observation group add DGMI therapy. 2 weeks after treatment, the clinical efficacy, inflammatory factors, coagulation function, hemorheology, nerve injury factors and adverse reactions were compared between two groups. **Results** The observation group effective rate (94.23%) higher than that control group (74.51%) ( $\chi^2/P = 7.632/0.006$ ); Serum CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  lower than control group ( $t/P = 8.990/ < 0.001, 7.025/ < 0.001, 4.546/ < 0.001$ ); PT, TT and APTT higher than control group ( $t/P = 6.185/ < 0.001, 8.336/ < 0.001, 6.782/ < 0.001$ ), FIB lower than control group ( $t/P = 6.683/ < 0.001$ ); Whole blood viscosity, plasma viscosity, platelet aggregation rate, hemat-

crit lower than control group ( $t/P = 3.553/0.001, 5.667/ < 0.001, 11.933/ < 0.001, 10.497/ < 0.001$ ) ; Serum GFAP, S100B, NSE lower than control group ( $t/P = 6.364/ < 0.001, 5.707/ < 0.001, 4.847/ < 0.001$ ) ; the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) score was lower than that control group ( $t/P = 9.707/ < 0.001$ ), the MMSE score and Barthel Index (BI) score were higher than that control group ( $t/P = 7.847/0.00, 11.421/ < 0.001$ ). There was no significant difference in adverse reactions between two groups (13.46% vs. 9.80%,  $\chi^2/P = 0.335/0.563$ ). **Conclusion** DGMI can improve clinical efficacy of ACI patients, which may be related to antagonism of inflammatory reaction, improve coagulation function and hemorheology, inhibition of expression of nerve injury factors.

**[Key words]** Acute cerebral infarction; Diterpene ginkgolides meglumine injection; Coagulation function; Hemorheology; Inflammatory reaction; Neural function; Cognition function; Nerve injury factors

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)是各种原因引起脑血供突然中断所致的脑组织坏死,具有极高的致残率与病死率<sup>[1]</sup>。西医多采用溶栓、抗血小板聚集、降纤、营养神经等对症治疗,整体效果尚可,但似乎达到了“瓶颈”期,联合应用活血类中药治疗能提高整体疗效<sup>[2]</sup>。银杏二萜内酯葡胺注射液(diterpene ginkgolides meglumine injection, DGMI)主要成分为银杏内酯A、B、K,具有活血通络的功能,是恢复期瘀阻络证中风病指定药物,联合西医治疗ACI有效性及安全性值得肯定<sup>[3]</sup>。氧化应激、炎性反应在ACI发生发展过程中发挥着重要的作用,高凝状态、血液流变学紊乱、神经功能受损是其主要病理特征。拮抗炎性反应、改善凝血功能与血液流变学、抑制神经损伤因子分泌,是治疗ACI的关键靶点<sup>[4-5]</sup>。本研究分析DGMI辅助治疗ACI的临床疗效及对炎性反应、凝血功能、血液流变学及神经功能、认知功能和神经损伤因子的影响,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选择2021年7月—2023年6月江苏省南京市江宁医院急诊科收治的ACI患者103例作为研究对象,男52例,女51例;年龄45~74(55.54±7.13)岁;发病至入院时间2~15(9.39±1.05)h;体质量指数18~28(22.79±3.06)kg/m<sup>2</sup>;梗死部位:小脑37例,基底节37例,脑干29例。采用随机数字表法分为观察组( $n=52$ )和对照组( $n=51$ ),2组患者一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性,见表1。本研究经医院伦理委员会批准(210520),患者或家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 纳入标准:①均符合《中国急性缺血性脑卒中中西医急诊诊治专家共识》<sup>[6]</sup>相关ACI诊断标准,且经颅脑MR或CT检查确诊;②首次发病,发病时间<24 h;③伴有局灶性神经功能缺损症状。排除标准:①近3个月内发生颅脑外伤史或其他手术史者;②合并严重心血管疾病、出血性卒中者;③合并严重肝、肾功能障碍者;④合并严重感染性疾病、出血

性疾病者;⑤对本研究药物存在使用禁忌证者。

表1 对照组与观察组ACI患者临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical data between control group and observation group of ACI patients

项 目	对照组 (n=51)	观察组 (n=52)	t/χ <sup>2</sup> 值	P 值
性别[例(%)]	男 30(58.82) 女 21(41.18)	27(51.92) 25(48.08)	0.496	0.481
年龄(岁)	54.62±7.25	56.45±7.34	1.273	0.206
发病至入院时间(h)	9.23±1.08	9.54±1.21	1.371	0.174
体质量指数( kg/m <sup>2</sup> )	22.45±3.23	23.12±3.14	1.068	0.288
梗死部位[例(%)]	小脑 18(35.29) 基底节 20(39.22) 脑干 13(25.49)	19(36.54) 17(32.69) 16(30.77)	0.571	0.752
合并慢性疾病[例(%)]				
原发性高血压	25(49.02)	30(57.69)	0.778	0.378
糖尿病	18(35.29)	23(44.23)	0.858	0.354
高脂血症	14(27.45)	17(32.69)	0.336	0.562
冠心病	16(31.37)	18(34.62)	0.122	0.726

1.3 治疗方法 所有患者均给予吸氧,符合溶栓治疗适应证者进行溶栓治疗<sup>[7]</sup>,合并基础疾病对症治疗(如降压、控糖、调脂)。对照组同时给予西医常规治疗:阿司匹林肠溶片(石药集团欧意药业有限公司,规格100 mg/片),每次1片,每日1次。阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司,规格10 mg/片),每次2片,每日1次。依达拉奉注射液(国药集团国瑞药业有限公司,规格30 mg:20 ml)30 mg加入0.9%氯化钠注射液100 ml中静脉滴注,每日2次。连续治疗2周。观察组在对照组基础上联合应用DGMI(江苏康缘药业股份有限公司,规格25mg:5 ml/支)25 mg加入0.9%氯化钠注射液250 ml中静脉滴注,每日1次。连续治疗2周。

## 1.4 观察指标与方法

1.4.1 血清炎性因子检测:治疗前后,采集患者空腹肘静脉血4 ml,3 000 r/min离心10 min取血清,采用全自动生化分析仪检测血清C反应蛋白(C-reactive

protein, CRP)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量。

**1.4.2 凝血功能检测:**治疗前后,采集患者静脉血,采用全自动凝血分析仪检测凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、纤维蛋白原(fibrinogen, Fib)。

**1.4.3 血液流变学检测:**治疗前后,采集患者空腹肘静脉血,采用血流变分析仪检测全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容等。

**1.4.4 血清神经损伤因子检测:**治疗前后,采集患者空腹肘静脉血,离心取血清,采用全自动生化分析仪检测血清神经损伤相关因子:神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、S100B蛋白(S100B)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)水平。

**1.4.5 神经功能、认知功能和日常生活能力评估:**采用美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)评价患者神经功能,最高评分为 42 分,分值越高说明神经功能缺损越重<sup>[8]</sup>。采用简易精神状态量表(MMSE)评估患者认知功能,最高评分为 30 分,分值越高表明患者认知功能越好<sup>[9]</sup>。采用 Barthel 指数(BI)评估患者日常生活自理能力,总分 100 分,分值越高表明自理能力越强<sup>[10]</sup>。

**1.4.6 记录不良反应:**统计治疗期间口干、恶心呕吐、头晕、皮疹等发生率。

**1.5 临床疗效判定标准** 治疗前后采用 NIHSS 进行评估,以 NIHSS 评分减分率(或增加率)作为疗效判断标准,即基本痊愈(减分率 $\geq 90\%$ )、显著进步(减分率 46% ~ <90%)、进步(减分率 18% ~ 46%)、无效(减分率<18% 或增加 $\leq 18\%$ )、恶化(增加率>18%)。总有效率=(基本痊愈+显著进步+进步)/总例数×100%。

**1.6 统计学方法** 使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。符合正态分布计量资料(不符合正态分布通过对数转换为正态分布)用  $\bar{x} \pm s$  表示,分别采用配对 t 检验(组内)、独立样本 t 检验(组间);计数资料用频数

或率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验或 U 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 2 组临床疗效比较** 治疗 2 周后,观察组总有效率为 94.23%,对照组为 74.51%,观察组总有效率高于对照组( $P < 0.01$ ),见表 2。

**2.2 2 组治疗前后血清炎性因子水平比较** 治疗 2 周后,2 组血清 CRP、IL-6、TNF- $\alpha$  均低于治疗前( $P < 0.01$ ),且观察组治疗后 CRP、IL-6、TNF- $\alpha$  低于对照组( $P < 0.01$ ),见表 3。

表 3 对照组与观察组 ACI 患者治疗前后血清炎性因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 3 Comparison of serum inflammatory factor levels between the control group and the observation group of ACI patients before and after treatment**

组 别	时间	CRP( mg/L )	IL-6( ng/L )	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L )
对照组 (n=51)	治疗前	19.34 ± 4.25	14.75 ± 2.52	52.56 ± 7.42
	治疗后	8.72 ± 1.35	9.42 ± 1.34	26.35 ± 4.56
观察组 (n=52)	治疗前	19.72 ± 4.34	15.24 ± 2.45	54.12 ± 7.56
	治疗后	6.45 ± 1.21	7.64 ± 1.23	22.45 ± 4.14
t/P 对照组内值		17.005/ $< 0.001$	13.356/ $< 0.001$	21.490/ $< 0.001$
t/P 观察组内值		21.218/ $< 0.001$	20.002/ $< 0.001$	26.494/ $< 0.001$
t/P 治疗后组间值		8.990/ $< 0.001$	7.025/ $< 0.001$	4.546/ $< 0.001$

**2.3 2 组治疗前后凝血功能比较** 治疗 2 周后,2 组 PT、TT、APTT 均高于治疗前,Fib 低于治疗前( $P < 0.01$ );观察组治疗后血清 PT、TT、APTT 高于对照组,Fib 低于对照组( $P < 0.01$ ),见表 4。

**2.4 2 组治疗前后血液流变学比较** 治疗 2 周后 2 组全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容均低于治疗前( $P < 0.01$ ),且观察组治疗后全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容均低于对照组( $P < 0.01$ ),见表 5。

**2.5 2 组治疗前后神经损伤因子水平比较** 治疗 2 周后 2 组血清 GFAP、S100B、NSE 均低于治疗前( $P < 0.01$ ),且观察组治疗后血清 GFAP、S100B、NSE 均低于对照组( $P < 0.01$ ),见表 6。

表 2 对照组与观察组 ACI 患者临床疗效比较 [例(%)]

**Tab. 2 Comparison of clinical efficacy between control group and observation group in ACI patients**

组 别	例数	基本痊愈	显著进步	进步	无变化	恶化	总有效率(%)
对照组	51	8(15.69)	16(31.37)	14(27.45)	12(23.53)	1(1.96)	74.51
观察组	52	14(26.92)	24(46.15)	11(21.15)	3(5.77)	0	94.23
$U/\chi^2$ 值					$U = 9.988$		$\chi^2 = 7.632$
P 值					0.012		0.006

表 4 对照组与观察组 ACI 患者治疗前后凝血功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Comparison of coagulation function between control group and observation group of ACI patients before and after treatment

组别	时间	PT(s)	TT(s)	APTT(s)	Fib(g/L)
对照组 (n=51)	治疗前	9.45 ± 0.71	13.72 ± 1.35	20.42 ± 4.25	5.42 ± 0.60
	治疗后	11.54 ± 0.64	15.36 ± 2.23	25.12 ± 4.16	3.76 ± 0.52
观察组 (n=52)	治疗前	9.24 ± 0.65	13.15 ± 1.42	19.24 ± 4.12	5.65 ± 0.52
	治疗后	12.25 ± 0.52	19.21 ± 2.45	31.45 ± 5.24	3.12 ± 0.47
t/P 对照组内值		15.548 / <0.001	4.487 / <0.001	5.641 / <0.001	15.006 / <0.001
t/P 观察组内值		26.151 / <0.001	15.441 / <0.001	13.201 / <0.001	26.063 / <0.001
t/P 治疗后组间值		6.185 / <0.001	8.336 / <0.001	6.782 / <0.001	6.683 / <0.001

表 5 对照组与观察组 ACI 患者治疗前后血液流变学指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 Comparison of hemorheological indicators between the control group and the observation group of ACI patients before and after treatment

组别	时间	全血黏度(mPa·s)	血浆黏度(mPa·s)	血小板聚集率(%)	红细胞比容(%)
对照组 (n=51)	治疗前	6.35 ± 1.04	1.76 ± 0.45	51.25 ± 7.10	48.56 ± 6.24
	治疗后	5.24 ± 0.72	1.43 ± 0.24	34.65 ± 5.16	30.24 ± 5.12
观察组 (n=52)	治疗前	6.43 ± 1.02	1.92 ± 0.43	53.12 ± 7.24	50.34 ± 6.75
	治疗后	4.76 ± 0.65	1.12 ± 0.31	23.36 ± 4.42	20.43 ± 4.34
t/P 对照组内值		6.291 / <0.001	4.261 / <0.001	13.502 / <0.001	14.901 / <0.001
t/P 观察组内值		9.953 / <0.001	10.885 / <0.001	25.307 / <0.001	26.893 / <0.001
t/P 治疗后组间值		3.553 / 0.001	5.667 / <0.001	11.933 / <0.001	10.497 / <0.001

表 6 对照组与观察组 ACI 患者治疗前后血清神经损伤因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 6 Comparison of serum levels of nerve injury factors between the control group and the observation group of ACI patients before and after treatment

组别	时间	GFAP(μg/L)	S100B(ng/L)	NSE(μg/L)
对照组 (n=51)	治疗前	10.78 ± 1.32	38.34 ± 5.23	35.54 ± 5.72
	治疗后	6.56 ± 1.14	25.32 ± 4.42	18.25 ± 3.42
观察组 (n=52)	治疗前	11.04 ± 1.21	39.21 ± 5.12	36.85 ± 6.12
	治疗后	5.21 ± 1.01	20.45 ± 4.24	15.12 ± 3.13
t/P 对照组内值		17.320 / <0.001	13.574 / <0.001	18.540 / <0.001
t/P 观察组内值		26.608 / <0.001	20.343 / <0.001	22.809 / <0.001
t/P 治疗后组间值		6.364 / <0.001	5.707 / <0.001	4.847 / <0.001

2.6 2 组治疗前后神经功能、认知功能和日常生活能力比较 治疗 2 周后 2 组神经功能、认知功能和日常生活能力均较治疗前改善, 即 NIHSS 评分降低, MMSE 评分和 BI 评分升高 ( $P < 0.01$ ), 且观察组治疗后 NIHSS 评分低于对照组, MMSE 评分和 BI 评分高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 见表 7。

2.7 2 组不良反应发生率比较 2 组治疗期间均有轻度恶心呕吐、头晕等不良反应发生, 2 组不良反应总发生率比较差异无统计学意义 (9.80% vs. 13.46%,  $\chi^2 = 0.335, P = 0.563$ ), 见表 8。

### 3 讨论

ACI 是一种突发性脑部血液供应障碍性疾病, 治疗原则在于及时疏通阻塞血管, 恢复缺血区脑组织血

表 7 对照组与观察组 ACI 患者治疗前后神经功能、认知功能和日常生活能力比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

Tab. 7 Comparison of neurological function, cognitive function, and daily living ability between the control group and the observation group of ACI patients before and after treatment

组别	时间	NIHSS	MMSE	BI
对照组 (n=51)	治疗前	28.33 ± 4.61	16.19 ± 4.38	56.22 ± 5.86
	治疗后	18.49 ± 3.02	20.62 ± 2.57	77.34 ± 8.09
观察组 (n=52)	治疗前	27.91 ± 5.05	16.84 ± 4.92	57.68 ± 6.47
	治疗后	13.22 ± 3.24	25.15 ± 3.76	88.72 ± 5.34
t/P 对照组内值		11.522 / <0.001	13.951 / <0.001	20.146 / <0.001
t/P 观察组内值		20.647 / <0.001	18.894 / <0.001	29.790 / <0.001
t/P 治疗后组间值		9.707 / <0.001	7.847 / <0.001	11.421 / <0.001

表 8 对照组与观察组 ACI 患者不良反应比较 [例(%)]

Tab. 8 Comparison of adverse reactions in ACI Patients between the control Group and the observation Group

组别	例数	恶心呕吐	口干	头晕	皮疹	总发生率(%)
对照组	51	2(3.92)	2(3.92)	1(1.96)	0	9.80
观察组	52	2(3.85)	1(1.92)	2(3.85)	2(3.85)	13.46

液供应, 挽救濒临死亡脑细胞。在“时间窗”内溶栓治疗是其关键, 超过“时间窗”可行抗血小板聚集、抗凝、降纤、抗氧化、营养神经等治疗, 也能使 ACI 患者临床获益, 但仍有高致残率、高病死率的风险<sup>[11]</sup>。ACI 属中医学“中风病”范畴, 与气血及阴阳亏虚等有关, 血

瘀贯穿于其整个病程, 治宜当活血散瘀, 疏经通络。DGMI 属第四代银杏制剂, 所含银杏内酯 A、B、K 高达 98%, 为最强效应组合, 且严格控制银杏酸含量<sup>[12]</sup>。银杏内酯 A、B、K 均有拮抗血小板活化因子(PAF)诱导血小板聚集的效果, 因此 DGMI 也被称为强效 PAF 受体拮抗剂<sup>[13]</sup>。PAF 持续升高是 ACI 的主要病理特征, DGMI 能够竞争性抑制 PAF 诱导的血小板聚集, 改善血液流变学, 缓解脑部供应障碍所致损伤<sup>[14]</sup>。银杏内酯类化合物有抗氧化应激、抑制炎性反应、降低血—脑屏障通透性等多种作用<sup>[15]</sup>。一项 Meta 分析(26 篇文献、2 332 例患者)表明, DGMI 联合西医治疗能提高 ACI 患者临床疗效( $RR = 1.22$ , 95% CI = 1.17 ~ 1.28,  $P < 0.05$ )、降低 NIHSS 评分( $MD = -3.08$ , 95% CI = -3.94 ~ 2.22,  $P < 0.05$ ), 且未增加不良反应( $RR = 0.76$ , 95% CI = 0.49 ~ 1.19,  $P = 0.23$ )<sup>[16]</sup>。本研究通过比较 2 组有效率、NIHSS 评分、不良反应, 所得结论也支持上述文献观点。

炎性反应既是 ACI 的诱发因素, 也是 ACI 的病理产物, 与 ACI 发生发展及预后密切相关。CRP 是由肝脏合成的一种急性期反应蛋白, 是血栓性疾病的危险因素。IL-6 可通过增强血小板活性、诱发微循环障碍、诱导动脉粥样硬化等途径, 增加 ACI 发病风险<sup>[17]</sup>。TNF- $\alpha$  可通过诱导内皮细胞黏附分子表达、损伤血脑屏障等途径, 加剧 ACI 后神经功能受损程度<sup>[18]</sup>。ACI 患者血清 CRP、IL-6、TNF- $\alpha$  明显升高, 抑制其表达水平是 ACI 综合治疗的关键靶点<sup>[19]</sup>。银杏内酯 K 可调节 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路, 下调脑组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达, 缓解缺血期脑卒中模型小鼠脑组织炎性浸润程度<sup>[20]</sup>。临床研究也报道, DGMI 单独或联合应用, 均可下调老年卒中患者血清 hs-CRP、IL-6、TNF- $\alpha$  水平<sup>[21]</sup>。本研究中, 观察组治疗 2 周后血清 CRP、IL-6、TNF- $\alpha$  低于对照组, 说明 DGMI 辅助治疗能够拮抗 ACI 患者炎性反应。

脑血流供应障碍是 ACI 发生的病理基础, 与动脉粥样硬化和血栓形成有关, 凝血系统与纤溶系统失衡所致高凝状态是导致动脉粥样硬化的关键。血液流变学紊乱是急性脑梗死主要发病原因<sup>[22]</sup>。PT、TT、APTT、Fib 是常用凝血功能指标, PT、TT、APTT 降低, Fib 升高是 ACI 的主要病理特征, 提升 PT、TT、APTT 水平, 抑制 Fib 表达, 是 ACI 综合治疗的关键<sup>[23]</sup>。银杏二萜内酯 A、B、K 为天然血小板因子受体拮抗剂, 具有良好的抗凝血效果。可通过有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路, 干预血小板活化<sup>[24]</sup>。本研究中, 观察组血清 PT、TT、APTT 高于对照组, Fib 低于对

照组, 与石雷云<sup>[25]</sup>研究结果类似。说明 DGMI 辅助治疗能够改善 ACI 患者凝血功能。银杏二萜内酯 A、B、K 具有活血通络、疏通血管的作用。临床研究也报道, 银杏二萜内酯葡胺辅助治疗能改善老年卒中患者血浆黏度、纤维蛋白原、红细胞比容<sup>[26]</sup>。本研究通过比较全血黏度、血浆黏度、血小板聚集率、红细胞比容, 所得结论也支持上述文献观点。

脑血流供应障碍也是诱发炎性因子过度表达、神经递质代谢紊乱的主要原因<sup>[27-29]</sup>。GFAP 是脑组织和脊髓星形胶质细胞标志物, 可通过参与细胞内脂肪酸转运、分解过程, 特异性高表达于 ACI 患者脑组织<sup>[30]</sup>。S100B 被称为中枢神经特异蛋白, NSE 是神经元和神经内分泌细胞分泌的特有酸性蛋白酶, 二者均为神经损伤敏感性标志物<sup>[31]</sup>。银杏内酯 B、K 在拮抗 PAF 的同时, 有抗神经细胞凋亡、增强神经元存活能力、保护神经细胞活性的作用<sup>[32]</sup>。银杏内酯 A、B 可通过抑制细胞线粒体凋亡, 银杏内酯 K 可通过拮抗神经细胞氧化应激反应, 保护 ACI 患者受损神经功能<sup>[33]</sup>。现代药理研究证实, 银杏内酯 B 可通过 PI3K/AKT 信号通路, 能剂量依赖性(5、8、10 mg/kg)调节脑皮质 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、GFAP、NSE 表达, 促进脑梗死模型大鼠神经干细胞增殖和分化<sup>[34]</sup>。银杏二萜内酯葡胺能呈剂量依赖性(1.3、2.6、5.2 mg/kg)上调沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)表达, 改善局灶性脑缺血模型大鼠受损神经功能<sup>[35]</sup>。本研究中, 观察组血清 GFAP、S100B、NSE 低于对照组, 说明 DGMI 辅助治疗能够降低 ACI 患者神经损伤因子水平。

ACI 引起的脑组织软化和坏死及神经元缺失使信息传递障碍, 神经递质失衡, 导致患者认知功能衰退, 加之中枢系统部分调节功能失控, 使正常运动的传导功能受到影响, 进而影响其日常生活能力<sup>[36]</sup>。本研究中, 观察组认知功能和日常生活能力评分改善均优于对照组, 说明 DGMI 辅助治疗能够改善 ACI 患者认知功能和日常生活能力。多项临床报道也证实, DGMI 能改善急性脑梗死或其他脑血管病引起的认知障碍<sup>[37-38]</sup>。

研究结果表明, DGMI 可能通过拮抗炎性反应、改善凝血功能和血液流变学、抑制神经损伤因子表达等途径, 达到提高 ACI 患者治疗效果, 改善神经功能和认知功能的目的。需要指出的是, 本研究尚缺乏 DGMI 影响炎性因子、凝血功能、血液流变学、神经损伤因子可能作用机制的深入分析, 也缺乏临床疗效与炎性因子、凝血功能、血液流变学、神经损伤因子的相关性分

析。需要后续研究中扩大样本、优化指标,进一步完善研究方案。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

戴静怡:课题设计与实施,论文撰写;尹江宁:提出研究思路,研究项目指导,文献调研及整理,设计论文框架,论文审核;高俊、赵静、彭易根:资料收集与整理,数据统计;张士卿:数据统计分析,课题实施

#### 参考文献

- [1] Hasan TF, Hasan H, Kelley RE. Overview of acute ischemic stroke evaluation and management [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (10) : 1486. DOI: 10. 3390/biomedicines9101486.
- [2] 刘会霞,魏丽,陈雪娇,等.5 种活血类中药注射剂联合化学药治疗急性缺血性脑卒中的贝叶斯网状 Meta 分析[J].药物评价研究,2023,46(8):1759-1777. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-6376. 2023. 08. 021.
- [3] Chen R, Yan L, Xie P, et al. Use of diterpene ginkgolides meglumine injection to regulate plasma levels of PAI-1 and t-PA in patients with acute atherosclerotic cerebral infarction [J]. *Neurologist*, 2022, 27 (6) : 299-303. DOI: 10. 1097/NRL. 0000000000000399.
- [4] 叶荣洲,吴海云,杨志燕,等.茴拉西坦配合血塞通对老年急性脑梗死患者脑血流及血清 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J].中国老年学杂志,2022,42(15):3649-3653. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2022. 15. 008.
- [5] 凌雪辉,许文杰,秦勇,等.急性脑梗死患者血清 miR-22-3p、NLRP3 水平与炎性因子及预后不良的关系[J].疑难病杂志,2024,23(1):86-92. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2024. 01. 015.
- [6] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会.中国急性缺血性脑卒中中西医急诊诊治专家共识[J].中华危重病急救医学,2018,30(3):193-197. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-4352. 2018. 03. 001.
- [7] 刘丽萍,周宏宇,段婉莹,等.中国脑血管病临床管理指南(第 2 版)(节选)——第 4 章缺血性脑血管病临床管理推荐意见[J].中国卒中杂志,2023,18(8):910-933.
- [8] Pezzella FR, Picconi O, De Luca A, et al. Development of the Italian version of the National Institutes of Health Stroke Scale: It-NIHSS [J]. *Stroke*, 2009, 40 (7) : 2557-2559. DOI: 10. 1161/STROKEAHA. 108. 534495.
- [9] Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician[J]. *J Psychiatr Res*, 1975, 12 (3) : 189-198. DOI: 10. 1016/0022-3956(75)90026-6.
- [10] 卓大宏.中国康复医学[M].北京:华夏出版社,1990:144-147.
- [11] 王蒙,黄婷,刘宇恺,等.时间窗与组织窗管理对老年急性脑梗死静脉溶栓预后的影响[J].实用老年医学,2020,34(8):798-801. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-9198. 2020. 08. 011.
- [12] Zhang D, Wang Y, Meng Z, et al. Efficacy of Diterpene Ginkgolides Meglumine injection in elderly patients with ischemic stroke: A post hoc analysis of a randomized controlled trial [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154391. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2022. 154391.
- [13] Chen C, Lv H, Shan L, et al. Antiplatelet effect of ginkgo diterpene lactone meglumine injection in acute ischemic stroke: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (5) : 1986-1996. DOI: 10. 1002/ptr. 7720.
- [14] 马驰千,郭效宁,张全全,等.银杏二萜内酯葡胺注射液联合氯吡格雷治疗冠心病合并脑梗死的疗效分析[J].中华中医药学刊,2022,40(1):34-37. DOI: 10. 13193/j. issn. 1673-7717. 2022. 01. 009.
- [15] 中国卒中学会免疫分会.血小板活化因子受体拮抗剂治疗缺血性卒中的中国专家共识[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2020,27(1):1-5,8. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2963. 2020. 01. 001.
- [16] 张令霖,连新福,赵晶,等.银杏二萜内酯葡胺注射液联合西药治疗脑梗死的疗效和安全性 Meta 分析[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2021,28(2):152-157. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2963. 2021. 02. 011.
- [17] Papadopoulos A, Palaiopanos K, Bjorkbacka H, et al. Circulating interleukin-6 levels and incident ischemic stroke: A systematic review and Meta-analysis of prospective studies [J]. *Neurology*, 2022, 98 (10) : e1002-e1012. DOI: 10. 1212/WNL. 0000000000013274.
- [18] 刘冰,霍会永,赵聪慧,等.急性缺血性脑卒中患者血清 DKK1 水平与炎性反应及氧化应激的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(21):2667-2671. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2021. 21. 024.
- [19] 彭飞飞,陶晓晓,闻熠,等.急性脑梗死患者外周血微 RNA 的表达及其与炎性因子的关系[J].重庆医学,2020,49(22):3772-3777,3782. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2020. 22. 020.
- [20] 刘佳,唐启瑛,叶岩荣,等.银杏内酯 B 对恢复期缺血性脑中风小鼠神经功能及脑组织炎症的影响[J].中国初级卫生保健,2023,37(10):103-107. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-568X. 2023. 10. 0027.
- [21] 李金霞,许伟,崔二平,等.银杏二萜内酯葡胺联合 rt-PA 静脉溶栓辅助综合康复训练治疗老年脑卒中的临床疗效[J].中国老年学杂志,2023,43(21):5143-5145. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2023. 21. 007.
- [22] Watanabe N, Kitahara H, Honda T, et al. High incidence of disseminated intravascular coagulation and acute cerebral infarction in acute myeloid leukemia with cup-like nuclei [J]. *J Clin Exp Hematop*, 2022, 62 (4) : 249-252. DOI: 10. 3960/jshrt. 22020.
- [23] 耿倩雯,胡健强,张东伟,等.凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、纤维蛋白原、凝血酶时间、心肌指标检测在冠心病诊断中的意义[J].陕西医学杂志,2022,51(10):1309-1312. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-7377. 2022. 10. 033.
- [24] 徐小波,武子寅,张新庄,等.银杏二萜内酯葡胺注射液及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞氧糖剥夺损伤的转录组学研究[J].中成药,2023,54(13):4233-4244. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2023. 13. 016.
- [25] 石雷云.银杏二萜内酯葡胺联合硫酸氢氯吡格雷治疗缺血性脑卒中临床研究[J].新中医,2022,54(2):42-45. DOI: 10. 13457/j. cnki. jnem. 2022. 02. 012.
- [26] 李金霞,许伟,崔二平,等.银杏二萜内酯葡胺联合 rt-PA 静脉溶栓辅助综合康复训练治疗老年脑卒中的临床疗效[J].中国老年

- 学杂志, 2023, 43 (21) : 5143-5145. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2023. 21. 007.
- [27] 张应魏, 贝宁, 张润泽, 等. 丁苯酞联合马来酸桂哌齐特对急性脑梗死患者脑血流及神经功能相关指标水平的影响 [J]. 疑难病杂志, 2021, 20(3) : 217-221. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2021. 03. 001.
- [28] 彭祥, 陈春梅, 王任华. 血清 Hcy、S100 $\beta$ 、BDNF、NSE 水平与皮质下脑梗死后血管性认知功能障碍的关系 [J]. 临床误诊误治, 2022, 35 (2) : 97-101. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-3429. 2022. 02. 022.
- [29] 李松, 贺兴友, 汪波, 等. NBP 联合 LiPostC 对脑梗死患者神经功能及侧支循环的影响 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22 (9) : 909-913, 918. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2023. 09. 003.
- [30] Barba L, Vollmuth C, Abu-Rumeileh S, et al. Serum  $\beta$ -synuclein, neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein as prognostic biomarkers in moderate-to-severe acute ischemic stroke [J]. Sci Rep, 2023, 13 (1) : 20941. DOI: 10. 1038/s41598-023-47765-7.
- [31] Amoo M, Henry J, O'Halloran PJ, et al. S100B, GFAP, UCH-L1 and NSE as predictors of abnormalities on CT imaging following mild traumatic brain injury: A systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy [J]. Neurosurg Rev, 2022, 45 (2) : 1171-1193. DOI: 10. 1007/s10143-021-01678-z.
- [32] 徐丽丽, 高明, 王利存, 等. 银杏二萜内酯调控 PI3K/Akt/Nrf2 通路改善糖尿病大鼠认知功能的机制研究 [J]. 心脑血管病防治, 2023, 23 (11) : 4-10. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-816x. 2023. 03. 002.
- [33] Wang TJ, Wu ZY, Yang CH, et al. Multiple mechanistic models reveal the neuroprotective effects of diterpene ginkgolides against astrocyte-mediated demyelination via the PAF-PAFR pathway [J]. Am J Chin Med, 2022, 50 (6) : 1565-1597. DOI: 10. 1142/S0192415X22500665.
- [34] 刘刚, 魏丽群, 黄文智. 银杏骨酯 B 在脑梗死模型大鼠中的作用通路及影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20 (15) : 1574-1578. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-4695. 2021. 15. 002.
- [35] 王辉, 宋爽, 赵建传. 银杏二萜内酯葡萄糖注射液对局灶性脑缺血大鼠 SIRT1/HIF- $\alpha$ /VEGF 信号通路及突触可塑性的影响 [J]. 西部医学, 2021, 33 (6) : 823-828. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2021. 06. 009.
- [36] 史帝, 王暖, 周昊, 等. 疏血通联合替罗非班治疗急性脑梗死的疗效分析 [J]. 疑难病杂志, 2024, 23 (3) : 297-301. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2024. 03. 008.
- [37] 陈凯歌, 杜迎春, 高彦伦. 高压氧联合银杏二萜内酯对中青年急性缺血性脑卒中患者脑血流及 ESM-1, LP-PLA2, PTX-3 水平的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35 (1) : 139-142. DOI: 10. 16448/j. cjem. 2023. 0131.
- [38] 常芸倩. 银杏二萜内酯葡萄糖注射液辅助治疗对缺血性脑卒中患者认知功能及 TGF- $\beta$ /Smad 通路的影响 [J]. 临床医药实践, 2023, 32 (12) : 907-909, 952. DOI: 10. 16047/j. cnki. cn14-1300/r. 2023. 12. 009.

(收稿日期:2024-06-18)

(上接 1197 页)

- [15] Luo X, Zhou N, Wang L, et al. Long noncoding RNA GATA3-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by suppression of PTEN, CDKN1A, and TP53 [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2019, 2019: 1389653. DOI: 10. 1155/2019/1389653.
- [16] Dong P, Xiong Y, Yue J, et al. Long noncoding RNA NEAT1 drives aggressive endometrial cancer progression via miR-361-regulated networks involving STAT3 and tumor microenvironment-related genes [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38 (1) : 295. DOI: 10. 1186/s13046-019-1306-9.
- [17] Liu YX, Yuan S, Liu XJ, et al. LncRNA GATA3-AS1 promoted invasion and migration in human endometrial carcinoma by regulating the miR-361/ARRB2 axis [J]. J Mol Med (Berl), 2022, 100 (9) : 1271-1286. DOI: 10. 1007/s00109-022-02222-2.
- [18] 刘洋, 杨秀梅, 邵迎华, 等. 青蒿琥珀酯对子宫内膜癌细胞凋亡及 PARP-1 蛋白的影响 [J]. 疑难病杂志, 2020, 19 (11) : 1157-1160. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2020. 11. 017.
- [19] 于丽丽, 任威, 陈超, 等. S100A4、TLR7 及 NF- $\kappa$ Bp65 在子宫内膜癌中表达及对病情进展和预后的评估作用 [J]. 临床误诊误治, 2021, 34 (10) : 68-73. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-3429. 2021. 10. 002.
- [20] Cao S, Li N, Liao X. miR-362-3p acts as a tumor suppressor by targeting SERBP1 in ovarian cancer [J]. J Ovarian Res, 2021, 14 (1) : 23. DOI: 10. 1186/s13048-020-00760-2.
- [21] Meng Z, Zhu S, Liu N, et al. miR-362-3p suppresses sinonasal squamous cell carcinoma progression via directly targeting pituitary tumor-transforming gene 1 [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2022, 42 (1) : 43-51. DOI: 10. 1080/10799893. 2020. 1839766.
- [22] Wang D, Wang H, Li Y, et al. miR-362-3p functions as a tumor suppressor through targeting MCM5 in cervical adenocarcinoma [J]. Biosci Rep, 2018, 38 (3) : BSR20180668. DOI: 10. 1042/BSR20180668.
- [23] Ye M, Hu C, Chen T, et al. FABP5 suppresses colorectal cancer progression via mTOR-mediated autophagy by decreasing FASN expression [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19 (10) : 3115-3127. DOI: 10. 7150/ijbs. 85285.
- [24] 罗健玮, 黄泓轲, 胡艳丽. LncRNA GATA3-AS1 通过调控 miR-362-3p/FABP5 轴抑制宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32 (6) : 1009-1016. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4992. 2024. 06. 005.

(收稿日期:2024-06-27)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 011

论著 · 临床

# Neurotrophin-3、LncRNA H19 与小儿癫痫持续状态严重程度的关系及对预后预测效能研究

何米兰, 王立和, 赵国晓, 李诗雅, 夏勇波



基金项目: 山西省卫健委科研课题项目(2023151)

作者单位: 044000 山西运城,山西医科大学附属运城市中心医院儿内科(何米兰、王立和、赵国晓、李诗雅),检验科(夏勇波)

通信作者: 王立和, E-mail: yeszxyerke@163.com

**【摘要】 目的** 探讨神经营养因子-3(Neurotrophin-3)、长链非编码核糖核酸H19(LncRNA H19)与小儿癫痫持续状态(SE)严重程度的关系及对预后预测效能。**方法** 选取2020年1月—2023年12月山西医科大学附属运城市中心医院儿内科收治的SE患儿152例为SE组,根据儿童癫痫持续状态严重程度评分(STEPSS)分为轻度亚组67例、中度亚组52例、重度亚组33例;根据院内结局分为良好预后亚组91例和不良预后亚组61例。另选取同期医院健康体检儿童60例为健康对照组。采用酶联免疫吸附法检测血清Neurotrophin-3,实时荧光定量聚合酶链反应检测LncRNA H19水平;Spearman法分析血清Neurotrophin-3、LncRNA H19水平与SE患儿STEPSS评分的相关性;多因素Logistic回归分析SE患儿不良预后的影响因素;受试者工作特征(ROC)曲线分析血清Neurotrophin-3、LncRNA H19水平对小儿SE不良预后的预测价值。**结果** SE组血清Neurotrophin-3水平低于健康对照组,LncRNA H19水平高于健康对照组( $t/P = 11.877 / < 0.001, 20.966 / < 0.001$ );随着病情加重,轻度亚组、中度亚组、重度亚组血清Neurotrophin-3水平依次降低,LncRNA H19水平依次升高( $F/P = 184.107 / < 0.001, 114.394 / < 0.001$ );152例SE患儿不良预后发生率为41.13%(61/152)。不良预后亚组STEPSS评分、SE发作时间 $\geq 1$  h、全面性发作、气管插管比例、血清LncRNA H19水平高于良好预后亚组,血清Neurotrophin-3水平低于良好预后亚组( $\chi^2/t/P = 8.090 / < 0.001, 11.931 / 0.001, 11.566 / 0.001, 8.752 / 0.003, 6.467 / < 0.001, 7.846 / < 0.001$ );SE患儿STEPSS评分与血清Neurotrophin-3水平呈负相关,与LncRNA H19水平呈正相关( $r_s/P = -0.764 / < 0.001, 0.748 / < 0.001$ );多因素Logistic回归分析显示,SE发作时间 $\geq 1$  h、STEPSS评分升高、全面性发作、LncRNA H19升高为小儿SE不良预后的独立危险因素[ $OR(95\% CI) = 3.216(1.406 \sim 7.354), 2.001(1.366 \sim 2.931), 3.970(1.229 \sim 11.691), 1.592(1.245 \sim 2.034)$ ],Neurotrophin-3升高为独立保护因素[ $OR(95\% CI) = 0.943(0.919 \sim 0.967)$ ];血清Neurotrophin-3、LncRNA H19水平及二者联合预测SE患儿不良预后的AUC分别为0.808、0.780、0.891,二者联合的AUC大于单独预测( $Z/P = 3.194 / 0.001, 3.521 / < 0.001$ )。**结论** 血清Neurotrophin-3水平降低和LncRNA H19水平升高与SE患儿病情加重和不良预后有关,血清Neurotrophin-3、LncRNA H19水平联合对SE患儿不良预后有较高的预测效能。

**【关键词】** 癫痫持续状态;神经营养因子-3;长链非编码核糖核酸 H19;严重程度;预后;诊断效能;儿童

**【中图分类号】** R742.1

**【文献标识码】** A

**A study of the relationship between Neurotrophin-3, LncRNA H19 and the severity of persistent status epilepticus in pediatric patients and its predictive efficacy for prognosis** He Milan\*, Wang Lihe, Zhao Guoxiao, Li Shiya, Xia Yongbo. \* Department of Pediatrics, Yuncheng Central Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Province, Yuncheng 044000, China

**Funding program:** Scientific Research Project of Shanxi Provincial Health Commission (2023151)

**Corresponding author:** Wang Lihe, E-mail: yeszxyerke@163.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between Neurotrophin-3, long non-coding ribonucleic acid H19 (LncRNA H19) and the severity of pediatric status epilepticus (SE) and the efficacy in predicting prognosis. **Methods** One hundred and fifty-two children with SE admitted to the Department of Pediatrics of Yuncheng Central Hospital of Shanxi Medical University from January 2020 to December 2023 were selected as the SE group, and the children with SE were classified into 67 cases in the mild subgroup, 52 cases in the moderate subgroup, and 33 cases in the severe subgroup

according to the status epilepticus in pediatric severity score (STEPSS); according to the in-hospital outcome, children with SE were divided into good prognosis subgroup of 91 cases and poor prognosis subgroup of 61 cases. Another 60 children were selected for health check-ups in hospitals during the same period as healthy control group. The enzyme-linked immunosorbent assay and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction were used to detect serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels; Spearman's method was used to analyze the correlation between serum Neurotrophin-3, LncRNA H19 levels and the STEPSS scores of the children with SE; multifactorial logistic regression analysis was used to analyze the factors influencing poor prognosis in children with SE; the predictive value of serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels on poor prognosis of pediatric SE was analyzed using receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** Serum Neurotrophin-3 levels were lower and LncRNA H19 levels were higher in the SE group than in the healthy control group ( $t/P = 11.877 / < 0.001, 20.966 / < 0.001$ ); as the disease aggravated, the serum Neurotrophin-3 levels in the mild subgroup, the moderate subgroup, and the severe subgroup decreased in the order of. LncRNA H19 levels increased sequentially ( $F/P = 184.107 / < 0.001, 114.394 / < 0.001$ ); the incidence of poor prognosis in 152 children with SE was 41.13% (61/152). STEPSS score, SE episode duration  $\geq 1$  h, full-blown seizures, proportion of tracheal intubation, and serum LncRNA H19 levels were higher in the poor prognosis subgroup than in the good prognosis subgroup, and serum Neurotrophin-3 levels were lower than in the good prognosis subgroup ( $\chi^2/t/P = 8.090 / < 0.001, 11.931/0.001, 11.566/0.001, 8.752/0.003, 6.467 / < 0.001, 7.846 / < 0.001$ ); STEPSS score in children with SE was negatively correlated with serum Neurotrophin-3 levels and positively correlated with LncRNA H19 levels ( $r_s/P = -0.764 / < 0.001, 0.748 / < 0.001$ ); multifactorial logistic regression analysis showed that SE episodes lasted for  $\geq 1$  h, high STEPSS score, full-blown seizures, and high LncRNA H19 were independent risk factors for poor prognosis of pediatric SE [ $OR(95\% CI) = 3.216(1.406 - 7.354), 2.001 (1.366 - 2.931), 3.970 (1.229 - 11.691)$ , and  $1.592 (1.245 - 2.034)$ ], and high Neurotrophin-3 was an independent protective factor [ $OR(95\% CI) = 0.943 (0.919 - 0.967)$ ]; the AUCs of serum Neurotrophin-3, LncRNA H19 levels and the combination of the two for predicting poor prognosis in children with SE were 0.808, 0.780, and 0.891, respectively, and the AUCs of the combination of the two were greater than those predicted by serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels alone ( $Z/P = 3.194/0.001, 3.521 / < 0.001$ ). **Conclusion** Decreased serum Neurotrophin-3 levels and increased LncRNA H19 levels were associated with exacerbation and poor prognosis in children with SE, and the combination of serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels had a high predictive efficacy for poor prognosis in children with SE.

**[Key words]** Status epilepticus; Neurotrophin-3; Long non-coding ribonucleic acid H19; Severity; Prognosis; Diagnostic efficacy; Children

癫痫持续状态(status epilepticus, SE)是指癫痫发作持续时间延长或连续发作,无法自行中止或发作停止后立即再次发作的状态,儿童SE年发病率为(17~23)/10万,有较高的残疾率和病死率,且幸存患儿常遗留神经系统功能障碍<sup>[1,2]</sup>。神经营养因子缺乏和神经炎性反应在癫痫中发挥重要作用<sup>[3,4]</sup>。神经营养因子(Neurotrophin)-3是一种营养因子,通过结合其受体维持神经元存活和突触形成,发挥神经保护作用<sup>[5]</sup>。据报道,Neurotrophin-3在SE患儿血清中低表达。长链非编码核糖核酸(long noncoding ribonucleic acid, LncRNA)能通过影响靶基因表达参与癫痫发生发展<sup>[6,7]</sup>。LncRNA H19是一种脑组织特异性表达的LncRNA,能通过激活多种炎性反应信号通路促进神经炎性反应发生发展<sup>[8]</sup>。研究显示<sup>[9]</sup>,LncRNA H19基因多态性与中国人群癫痫易感性有关。然而,关于血清Neurotrophin-3、LncRNA H19对小儿SE的临床意义尚缺乏报道,现对其研究并报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2020年1月—2023年12月山西医科大学附属运城市中心医院儿内科收治的SE患儿152例为SE组,男84例,女68例;年龄1~12( $5.72 \pm 2.22$ )岁;体质量6.56~38.00( $23.72 \pm 6.11$ )kg;病因:热性惊厥者57例,急性症状性者24例,进展脑病性者24例,慢性症状性者28例,未知病因者19例。根据儿童癫痫持续状态严重程度评分(status epilepticus in pediatric severity score, STEPSS)<sup>[10]</sup>将SE患儿分为3个亚组,轻度亚组67例(0~1分)、中度亚组52例(2~3分)、重度亚组33例(4~6分)。另选取同期医院健康体检儿童60例为健康对照组,男33例,女27例;年龄1~12( $5.65 \pm 2.15$ )岁;体质量6.71~40.25( $23.61 \pm 5.83$ )kg。2组性别、年龄、体质量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(伦审[2020]043号),受试儿童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符合《癫痫持续状态的定义和分类》<sup>[11]</sup>诊断标准:失神发作>15 min、伴意识障碍的局灶性发作>10 min、强直阵挛发作>5 min;②年龄1~14岁;③有完整的临床资料。(2)排除标准:①合并脑缺血、脑出血、器质性脑病等脑疾病,或痴呆、精神分裂症等其他神经系统疾病;②恶性肿瘤患儿;③脑部手术史;④先天性心脏疾病、自身免疫性疾病;⑤血液系统疾病或合并感染;⑥急性中毒、遗传代谢病等引起的癫痫发作;⑦近期使用免疫抑制剂。

### 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 血清 Neurotrophin-3 水平检测:**患儿于入院次日/健康对照组于体检当日采集空腹肘静脉血3 ml,离心留取上层血清待测。以上海威奥生物科技有限公司提供的 Neurotrophin-3 酶联免疫吸附法试剂盒(货号:EH6388M)检测 Neurotrophin-3 水平。

**1.3.2 血清 LncRNA H19 水平检测:**上述血清通过 Trizol(无锡百泰克生物技术有限公司,货号:RP2402)提取总 RNA,使用分光光度计[安捷伦科技(中国)有限公司,型号:Cary 6000i UV-Vis-NIR]鉴定 RNA 纯度和浓度,使用 Takara 试剂盒(北京云肽生物科技有限公司,型号:RR820A)逆转录互补 DNA。按照 Hifair® III One Step RT-qPCR Probe Kit 说明书[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,型号:11145ES50]构建反应体系[2×Hifair® III P buffer 10.0 μl、Hifair® UH III Enzymes 1.0 μl、Hieff® 50×High Rox or Low Rox 0.4 μl、上游引物 0.4 μl、下游引物 0.4 μl、TaqMan Probe (10 μM)0.2 μl、模板 RNA 1 μl、RNase free ddH<sub>2</sub>O 加至 20 μl]进行实时荧光定量聚合酶链式反应,反应条件:50℃ 15 min 1 次,95℃ 30 s 1 次,95℃ 10 s、60℃ 30 s,共计 45 次;引物序列:LncRNA H19,上游引物 5'-GGTGGGGATGTTGATT-3',下游引物 5'-CCTGTT-TATGGGCTGAT-3';内参 GAPDH,上游引物 5'-CAG-GAGTTGAAC TGCTAGGAT-3',下游引物 5'-GAGCAAG-CAAAGTGACCATT-3'。用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法表示 LncRNA H19 表达水平。

**1.3.3 预后分组:**通过格拉斯哥预后量表(glasgow outcome scale, GOS)<sup>[12]</sup>评估 SE 患儿院内结局,总分值 1~5 分,>3 分为预后良好,≤3 分为预后不良。根据 GOS 评分将 SE 患儿分为良好预后亚组 91 例和不良预后亚组 61 例。

**1.4 统计学方法** 选用 SPSS 28.0 软件进行统计分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采

用两独立样本  $t$  检验,多组间两两比较采用 LSD-t 检验;Spearman 法分析血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平与 SE 患儿 STEPSS 评分的相关性;多因素 Logistic 回归分析 SE 患儿不良预后的影响因素;受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平预测 SE 患儿不良预后的效能。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1 2 组血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平比较** SE 组血清 Neurotrophin-3 水平低于健康对照组,而血清 LncRNA H19 水平高于健康对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 健康对照组与 SE 组血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels between healthy control group and SE group

组 别	例数	Neurotrophin-3 (ng/L)	LncRNA H19
健康对照组	60	114.77 ± 23.09	1.02 ± 0.10
SE 组	152	68.55 ± 26.41	1.83 ± 0.29
<i>t</i> 值		11.877	20.966
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

**2.2 不同病情程度 SE 患儿血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平比较** 随着病情加重,轻度亚组、中度亚组、重度亚组 SE 患儿血清 Neurotrophin-3 水平依次降低,血清 LncRNA H19 水平依次升高( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 不同病情程度 SE 患儿血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels in SE children with different severity of disease

组 别	例数	Neurotrophin-3 (ng/L)	LncRNA H19
轻度亚组	67	90.60 ± 16.64	1.59 ± 0.19
中度亚组	52	62.36 ± 11.32 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.17 <sup>a</sup>
重度亚组	33	33.54 ± 13.15 <sup>ab</sup>	2.13 ± 0.19 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		184.107	114.394
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

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

**2.3 不同预后 SE 患儿临床/病理特征比较** 152 例 SE 患儿不良预后发生率为 41.13% (61/152)。不良预后亚组患儿 STEPSS 评分、SE 发作时间≥1 h、全面性发作、气管插管比例、血清 LncRNA H19 水平高于良好预后亚组,血清 Neurotrophin-3 水平低于良好预后亚组( $P < 0.01$ ),见表 3。

**2.4 血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平与 SE 患**

儿 STEPSS 评分的相关性 Spearman 相关性分析显示,SE 患儿血清 Neurotrophin-3 水平与 STEPSS 评分呈负相关,血清 LncRNA H19 水平与 STEPSS 评分呈正相关( $r_s/P = -0.764/ < 0.001, 0.748/ < 0.001$ )。

**2.5 多因素 Logistic 回归分析 SE 患儿不良预后的影响因素** 以 SE 患儿预后为因变量(不良/良好 = 1/0),表 3 中有差异项目[SE 发作时间( $\geq 1$  h/ $< 1$  h = 1/0)、STEPSS 评分、全面性发作(是/否 = 1/0)、气管插管(是/否 = 1/0)、Neurotrophin-3、LncRNA H19]为自变量进行多因素 Logistic 回归分析。结果显示:SE 发作时间 $\geq 1$  h、STEPSS 评分升高、全面性发作、LncRNA H19

升高为 SE 患儿不良预后的独立危险因素,Neurotrophin-3 升高为独立保护因素( $P < 0.05$ ),见表 4。

**2.6 血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平对 SE 患儿不良预后的预测价值** 绘制血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平单独与联合预测 SE 患儿不良预后的 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC),结果显示:血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平及二者联合预测 SE 患儿不良预后的 AUC 分别为 0.808、0.780、0.891,二者联合的 AUC 大于血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平单独预测的 AUC ( $Z = 3.194, 3.521, P = 0.001, < 0.001$ ),见表 5、图 1。

表 3 不同预后 SE 患儿临床/病理特征比较

Tab. 3 Comparison of clinical/pathological characteristics of SE patients with different prognoses

项 目		良好预后亚组(n=91)	不良预后亚组(n=61)	$\chi^2/t$ 值	P 值
性别[例(%)]	男	48(52.75)	36(59.02)	0.581	0.446
	女	43(47.25)	25(40.98)		
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		5.79 ± 2.15	5.61 ± 2.34	0.501	0.617
体质量( $\bar{x} \pm s$ ,kg)		23.65 ± 5.92	23.82 ± 6.43	0.166	0.869
病因[例(%)]	热性惊厥	32(35.16)	25(40.98)	2.570	0.632
	急性症状性	12(13.19)	12(19.67)		
	进展脑病性	16(17.58)	8(13.11)		
	慢性症状性	18(19.78)	10(16.39)		
	未知病因	13(14.29)	6(9.84)		
STEPSS 评分( $\bar{x} \pm s$ ,分)		1.82 ± 0.86	3.23 ± 1.29	8.090	< 0.001
SE 发作时间[例(%)]	≥1 h	43(47.25)	46(75.41)	11.931	0.001
	<1 h	48(52.75)	15(24.59)		
全面性发作[例(%)]		56(61.54)	53(86.89)	11.566	0.001
伴发热[例(%)]		63(69.23)	45(73.77)	0.366	0.545
气管插管[例(%)]		5(5.49)	13(21.31)	8.752	0.003
治疗药物种类[例(%)]	单药治疗	60(65.93)	36(59.02)	0.761	0.684
	2 种抗癫痫药物	19(20.88)	15(24.59)		
	3 种抗癫痫药物	12(13.19)	10(16.39)		
Neurotrophin-3( $\bar{x} \pm s$ ,ng/L)		80.18 ± 22.40	51.20 ± 22.19	7.846	< 0.001
LncRNA H19( $\bar{x} \pm s$ )		1.72 ± 0.24	2.00 ± 0.29	6.467	< 0.001

表 4 多因素 Logistic 回归分析 SE 患儿不良预后的影响因素

Tab. 4 Multivariate logistic regression analysis of factors affecting poor prognosis in children with SE

变 量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
SE 发作时间 $\geq 1$ h	1.168	0.422	7.661	0.006	3.216	1.406 ~ 7.354
STEPSS 评分高	0.694	0.195	12.675	< 0.001	2.001	1.366 ~ 2.931
全面性发作	1.332	0.575	5.374	0.020	3.970	1.229 ~ 11.691
气管插管	0.730	0.773	0.892	0.345	2.076	0.466 ~ 9.446
Neurotrophin-3 高	-0.059	0.013	21.102	< 0.001	0.943	0.919 ~ 0.967
LncRNA H19 高	0.465	0.125	13.790	< 0.001	1.592	1.245 ~ 2.034

表 5 血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平对 SE 患儿不良预后的预测价值

Tab. 5 The predictive value of serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels for poor prognosis in SE patients

指 标	截断值	AUC	95% CI	P 值	敏感度	特异度	Youden 指数
Neurotrophin-3	67.15 ng/L	0.808	0.736 ~ 0.867	< 0.001	0.525	0.923	0.448
LncRNA H19	1.89	0.780	0.706 ~ 0.843	< 0.001	0.656	0.769	0.425
二者联合		0.891	0.830 ~ 0.936	< 0.001	0.754	0.901	0.655

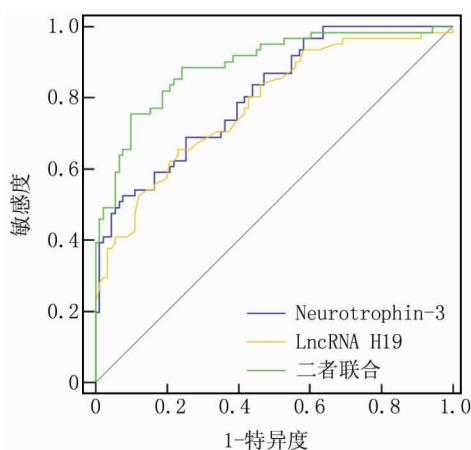


图 1 血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平预测 SE 患儿不良预后的 ROC 曲线

Fig. 1 ROC curve for predicting poor prognosis in SE patients based on serum Neurotrophin-3 and LncRNA H19 levels

### 3 讨 论

癫痫是一种由大脑异常电活动引起的慢性疾病,由于儿童大脑尚处于发育阶段,神经系统不成熟、神经细胞不稳定、神经介质释放不平衡等易在惊厥、光刺激、疲劳、应激、睡眠紊乱等因素影响下引起癫痫<sup>[12]</sup>。SE 是最常见的儿童癫痫类型,持续的癫痫发作常引起不可逆神经系统功能损害,尽管近年来抗癫痫药物取得一定进展,但仍有部分患儿对药物无反应导致癫痫持续发作或复发,最终进展为难治性癫痫而危及患儿生命安全<sup>[13-14]</sup>。及时、准确地对小儿 SE 严重程度与预后进行评估和预测,对缓解癫痫症状和降低致残、致死风险具有重要意义。

神经营养因子是一类在神经系统中发挥营养和保护作用的蛋白质,它们通过与特定受体结合,调节神经元的生存、生长、分化和突触可塑性,癫痫过程中神经营养因子通常处于缺乏状态,导致神经元高度同步化异常放电,促进癫痫的发生发展<sup>[15]</sup>。Neurotrophin-3 是一种由神经细胞表达的神经营养因子,能通过结合神经细胞表面的高亲和力受体原肌球蛋白相关激酶 C ( tropomyosin receptor kinase C, TrkC) 发挥重要的神经保护作用<sup>[5]</sup>。比如神经雪旺细胞损伤模型中,补充 Neurotrophin-3 能激活 TrkC/细胞外信号调节激酶/c-Jun 氨基末端激酶,维持神经雪旺细胞修复,以促进神经再生<sup>[16]</sup>。补充 Neurotrophin-3 能促进海马体突触形成和可塑性,以维持神经元间信号传递,改善记忆功能<sup>[17]</sup>。另有学者报道<sup>[18]</sup>,颞叶皮质中 Neurotrophin-3 表达与颞叶癫痫患者病情严重程度有关。然而,关于血清 Neurotrophin-3 与小儿 SE 严重程度和预后的关系尚未可知。本研究结果显示,SE 患儿血清 Neurotrophin-3 水平降低,并随着病情加重而降低,Neurotrophin-3 升高为小儿 SE 不良预后的独立保护因素,这说明血清 Neurotrophin-3 水平升高与小儿 SE 病情减轻和预后改善有关。分析原因可能与 Neurotrophin-3/TrkC 信号具有以下神经保护作用有关:(1)促进神经细胞增殖、分化、生存,有助于维持神经元的正常结构和功能;(2)促进神经元间的突触形成和可塑性,有助于神经元间的正常通信和信息传递;(3)调节神经元的兴奋性和抑制性,有助于维持神经网络的稳定性和平衡性<sup>[19-20]</sup>。

LncRNA 是一种长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA,能在转录和/或转录后水平上影响靶基因表达,通过影响神经炎性反应、神经元兴奋性和稳定性、突触形成和可塑性、神经细胞增殖和凋亡而参与癫痫发生发展<sup>[7]</sup>。LncRNA H19 位于人染色体 11p15.5 上,是人脑白质和灰质中表达稳定性最高的 LncRNA 之一,其表达部位提示其与中枢神经系统疾病有密切联系<sup>[21]</sup>。全转录组研究发现,LncRNA H19 可能通过炎性反应、细胞凋亡等参与大鼠 SE 发生<sup>[22]</sup>。实验报道,LncRNA H19 在颞叶癫痫大鼠海马神经元中上调,敲低 LncRNA H19 能激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路,抑制大鼠神经元凋亡、自噬和炎性反应<sup>[23]</sup>。而上调 LncRNA H19 表达能靶向信号传导及转录激活蛋白 3 与微小 RNA ( microRNA, miRNA ) let-7b 竞争性结合,促进大鼠海马胶质细胞活化和癫痫发作<sup>[24]</sup>。这些研究说明 LncRNA H19 参与癫痫过程。有学者指出<sup>[9]</sup>,LncRNA H19 基因多态性是癫痫的危险因素,但关于血清 LncRNA H19 与小儿 SE 严重程度和预后的关系尚未可知。本研究结果显示,SE 患儿血清 LncRNA H19 水平升高,并随着病情加重而升高,为小儿 SE 不良预后的独立保护因素,这说明血清 LncRNA H19 水平升高与小儿 SE 病情加重和不良预后有关。究其原因,LncRNA H19 能抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路,增强海马神经细胞自噬诱导神经细胞凋亡,并因此诱导胶质细胞活化增强神经炎性反应,导致神经系统损伤加重,进而增加病情和降低预后<sup>[23-25]</sup>。同时,LncRNA H19 能靶向 miRNA-29a-3p 激活核因子-κB 信号通路,加剧海马神经炎性反应损伤,增强神经异常电活动导致病情加重和预后降低<sup>[26]</sup>。

本研究结果还发现,除 STEPSS 评分外,SE 发作时间≥1 h 和全面性发作的 SE 患儿不良预后风险更高,原因可能是,发作时间越长和全面性发作也反映了患儿病情更严重,因此不良预后风险更高。ROC 曲线显示,血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平联合预测的 AUC 大于血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平单独预测。这说明血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平

有助于小儿 SE 不良预后预测,同时检测血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平可以更准确地预测小儿 SE 不良预后。

综上所述,SE 患儿血清 Neurotrophin-3 水平降低,LncRNA H19 水平升高,与 SE 严重程度和预后密切相关,血清 Neurotrophin-3、LncRNA H19 水平联合预测小儿 SE 不良预后的效能较高。但本研究结果还有待多中心研究验证。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

何米兰:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王立和:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;赵国晓:实施研究过程,资料搜集整理;李诗雅:实施研究过程,资料搜集整理;夏勇波:进行统计学分析

#### 参考文献

- [1] Shu Y, Wu Z, Yang X, et al. The burden of epilepsy in the People's republic of China from 1990 to 2019: Epidemiological trends and comparison with the global burden of epilepsy [J]. *Front Neurol*, 2023, 12(14):1303531. DOI:10.3389/fneur.2023.1303531.
- [2] 儿童癫痫持续状态协作组. 儿童癫痫持续状态诊断治疗的中国专家共识(2022) [J]. 癫痫杂志, 2022, 8(5):383-389. DOI:10.7507/2096-0247.202207002.
- [3] 肖秋杰. 脑源性神经营养因子诱发癫痫机制的研究进展 [J]. 海南医学, 2023, 34(3):435-439. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2023.03.033.
- [4] 毕翻, 姜俊杰, 潘恒恒, 等. 癫痫相关炎症介质的研究进展 [J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2023, 32(2):117-120. DOI:10.19984/j.cnki.1674-8972.2023.02.10.
- [5] Ateaque S, Merkouris S, Barde YA. Neurotrophin signalling in the human nervous system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 7(16):1225373. DOI:10.3389/fnmol.2023.1225373.
- [6] Bakri AH, Hassan MH, Ahmed AE, et al. Serum levels of growth-associated protein-43 and neurotrophin-3 in childhood epilepsy and their relation to zinc levels [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2023, 201(2):689-697. DOI:10.1007/s12011-022-03213-7.
- [7] 黄小妹, 李欢, 刁丽梅. 长链非编码 RNA 在癫痫发生发展中的作用及机制研究进展 [J]. 医学综述, 2022, 28(13):2504-2509. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2022.13.002.
- [8] 田烨楠, 吕鹤群, 冯瑶婷, 等. 长链非编码 RNA H19 在中枢神经系统疾病中的研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2024, 27(1):113-118. DOI:10.12083/SYSJ.230883.
- [9] Zheng Z, Yan Y, Guo Q, et al. Genetic interaction of H19 and TGF-BR1 polymorphisms with risk of epilepsy in a Chinese population [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, 14:77-86. DOI:10.2147/PGPM.S279664.
- [10] Sidharth, Sharma S, Jain P, et al. Status epilepticus in pediatric patients severity score (STEPSS): A clinical score to predict the outcome of status epilepticus in children- a prospective cohort study [J]. *Seizure*, 2019, 10(71):328-332. DOI:10.1016/j.seizure.2019.09.005.
- [11] Fisher RS, Cross JH, French JA, et al. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: position paper of the ILAE commission for classification and terminology [J]. *Epilepsia*, 2017, 58(4):522-530. DOI:10.1111/epi.13670.
- [12] 中国抗癫痫协会药物治疗专业委员会. 终止癫痫持续状态发作的专家共识 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(7):639-646. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2022.07.0639.
- [13] 北京协和医院罕见病多学科协作组, 中国罕见病联盟. 氯巴占治疗难治性癫痫专家共识 (2022) [J]. 协和医学杂志, 2022, 13(5):768-782. DOI:10.12290/xhyxxz.2022-0421.
- [14] 余书婷, 姚宝珍. 儿童难治性癫痫研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2023, 22(5):546-551. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2023.05.021.
- [15] Ferraguti G, Terracina S, Micangeli G, et al. NGF and BDNF in pediatrics syndromes [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 145:105015. DOI:10.1016/j.neubiorev.2022.105015.
- [16] Xu X, Song L, Li Y, et al. Neurotrophin-3 promotes peripheral nerve regeneration by maintaining a repair state of Schwann cells after chronic denervation via the TrkB/ERK/c-Jun pathway [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):733. DOI:10.1186/s12967-023-04609-2.
- [17] Tan JW, An JJ, Deane H, et al. Neurotrophin-3 from the dentate gyrus supports postsynaptic sites of mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent cognitive functions [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 29(4):1192-1204. DOI:10.1038/s41380-023-02404-5.
- [18] Vega-García A, Orozco-Suárez S, Villa A, et al. Cortical expression of IL1-β, Bcl-2, Caspase-3 and 9, SEMA-3a, NT-3 and P-glycoprotein as biological markers of intrinsic severity in drug-resistant temporal lobe epilepsy [J]. *Brain Res*, 2021, 1758:147303. DOI:10.1016/j.brainres.2021.147303.
- [19] Omar NA, Kumar J, Teoh SL. Neurotrophin-3 and neurotrophin-4: The unsung heroes that lies behind the meninges [J]. *Neuropeptides*, 2022, 92:102226. DOI:10.1016/j.npep.2022.102226.
- [20] Hernández-Echeagaray E. Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission [J]. *Vitam Horm*, 2020, 114:71-89. DOI:10.1016/bs.vh.2020.04.008.
- [21] 毛元元, 袁静静. 长链非编码 RNA H19 在中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(23):3021-3026. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2023.23.001.
- [22] Han CL, Liu YP, Zhao XM, et al. Whole-transcriptome screening reveals the regulatory targets and functions of long non-coding RNA H19 in epileptic rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(2):262-269. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.05.161.
- [23] Ju H, Yang Z. H19 silencing decreases kainic acid-induced hippocampus neuron injury via activating the PI3K/AKT pathway via the H19/miR-206 axis [J]. *Exp Brain Res*, 2022, 240(7-8):2109-2120. DOI:10.1007/s00221-022-06392-w.
- [24] Han CL, Liu YP, Guo CJ, et al. The lncRNA H19 binding to let-7b promotes hippocampal glial cell activation and epileptic seizures by targeting Stat3 in a rat model of temporal lobe epilepsy [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(8):e12856. DOI:10.1111/cpr.12856.
- [25] 李华晓, 麦浩坚, 宋同均, 等. LncRNA H19 通过 PI3K/Akt 通路对海人酸致癫痫大鼠海马神经细胞自噬的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(1):56-62. DOI:10.12102/j.issn.1672-1349.2023.01.009.
- [26] Xie Y, Wang M, Shao Y, et al. LncRNA H19 regulates P-glycoprotein expression through the NF-κB signaling pathway in the model of status epilepticus [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(3):929-941. DOI:10.1007/s11064-022-03803-w.

(收稿日期:2024-05-30)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 012

论著 · 临床

# 布地奈德/福莫特罗与糖皮质激素治疗 EOS 增多表型和非 EOS 增多表型 AECOPD 的短期疗效比较

艾力扎提·艾则孜, 周海霞, 罗茜, 张杰, 李争争



基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2020D01C407)

作者单位: 830001 乌鲁木齐, 中国人民解放军新疆军区总医院呼吸内科

通信作者: 艾力扎提·艾则孜, E-mail: ai29005600@163.com

**【摘要】 目的** 观察布地奈德/福莫特罗与糖皮质激素(GC)治疗嗜酸性粒细胞(EOS)增多表型和非EOS增多表型慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)的短期疗效比较。**方法** 选取2020年6月—2023年6月中国人民解放军新疆军区总医院呼吸内科诊治的AECOPD患者168例,根据EOS比例分为EOS增多表型组(EOS>2%,n=42)、非EOS增多表型组(EOS≤2%,n=126);EOS增多表型组随机分为I亚组(n=21)、II亚组(n=21),非EOS增多表型组随机分为III亚组(n=63)、IV亚组(n=63)。I、III亚组给予布地奈德/福莫特罗吸入治疗,II、IV亚组口服或静脉滴注GC治疗。比较入院时、治疗5d后静脉血EOS计数、血气分析指标[氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)、动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)]、慢性阻塞性肺疾病评估测试量表(CAT)评分及住院时间。**结果** 治疗5d后,I亚组、II亚组静脉血EOS计数低于入院时,且II亚组静脉血EOS计数低于I亚组( $t/P = 2.641/0.012$ ),III、IV亚组静脉血EOS计数比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗5d后,II亚组PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>高于I亚组,PaCO<sub>2</sub>、CAT评分低于I亚组( $t/P = 4.331/ < 0.001, 3.351/0.002, 2.884/0.006$ ),而III亚组、IV亚组PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、CAT评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗5d后,I亚组PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>高于III亚组,PaCO<sub>2</sub>、CAT评分低于III亚组( $t/P = 8.856/ < 0.001, 6.588/ < 0.001, 1.964/0.049$ ),II亚组PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>高于IV亚组,PaCO<sub>2</sub>、CAT评分低于IV亚组( $t/P = 12.456/ < 0.001, 10.350/ < 0.001, 5.356/ < 0.001$ );II亚组住院时间短于I亚组( $t/P = 2.718/0.010$ ),I亚组住院时间短于III亚组( $t/P = 4.394/0.010$ ),II亚组住院时间短于IV亚组( $t/P = 6.700/ < 0.001$ )。**结论** EOS增多表型AECOPD患者,GC全身给药短期疗效均优于布地奈德/福莫特罗雾化吸入,而非EOS增多表型AECOPD患者,雾化吸入疗法和GC全身给药短期疗效相似,雾化吸入疗法可替代GC全身给药。

**【关键词】** 慢性阻塞性肺疾病急性加重期;嗜酸性粒细胞表型;布地奈德/福莫特罗;糖皮质激素;雾化吸入;全身性应用;嗜酸性粒细胞;血气分析

【中图分类号】 R563.9

【文献标识码】 A

**Short term efficacy difference of budesonide/formoterol in treatment of EOS hypertrophic phenotype and non-EOS hypertrophic phenotype AECOPD** Ailizhati Aizezi, Zhou Haixia, Luo Qian, Zhang Jie, Li Zhengzheng. Department of Respiratory, Xinjiang Military Region General Hospital of the People's Liberation Army of China, Xinjiang, Urumqi 830001, China

Funding program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020D01C407)

Corresponding author: Ailizhati Aizezi, E-mail: ai29005600@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the short term efficacy of budesonide/formoterol and glucocorticoid (GC) in the treatment of eosinophilic (EOS) hyperplasia and non-EOS hyperplasia acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). **Methods** The clinical data of 168 patients with AECOPD treated and treated by the respiratory Department of the General Hospital of Xinjiang Military Region of the Chinese People's Liberation Army from June 2020 to June 2023 were analyzed. According to the EOS ratio, they were divided into the EOS increased phenotype group (EOS > 2%, n = 42) and the non-EOS increased phenotype group (EOS ≤ 2%, n = 126). The EOS proliferation phenogroup was randomly divided into subgroup I (n = 21) and subgroup II (n = 21), and the non-EOS proliferation phenogroup was randomly divided into subgroup III (n = 63) and subgroup IV (n = 63). Subgroups I and III were given budesonide/formoterol inhalation therapy, and subgroups II and IV were given oral or intravenous glucocorticoid (GC) therapy. Venous blood EOS count, blood gas analysis index [PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>)], Chronic obstructive pulmonary disease

Evaluation Test Scale (CAT) score and length of stay were compared at admission and 5 days after treatment. **Results** After 5 days of treatment, the EOS count in venous blood of subgroup I and subgroup II was lower than that at admission, and the EOS count in venous blood of subgroup II was lower than that in subgroup I ( $t/P = 2.641/0.012$ ). After 5 days of treatment, the  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  of subgroup II was higher than that of subgroup I, and the  $\text{PaCO}_2$  and CAT scores were lower than those of subgroup I ( $t/P = 4.331/ < 0.001, 3.351/0.002, 2.884/0.006$ ). There was no significant difference in  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$  and CAT scores between subgroup III and subgroup IV ( $P > 0.05$ ). After 5 days of treatment, the  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  combination in subgroup I was higher than that in subgroup III ( $t/P = 8.856/ < 0.001, 6.588/ < 0.001, 1.964/0.049$ ), the  $\text{PaCO}_2$  and CAT scores were lower than those in subgroup III, the  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  scores in subgroup II were higher than those in subgroup IV, and the  $\text{PaCO}_2$  and CAT scores were lower than those in subgroup IV ( $t/P = 12.456/ < 0.001, 10.350/ < 0.001, 5.356/ < 0.001$ ); The length of hospitalization in subgroup II was shorter than that in subgroup I ( $t/P = 2.718/0.010$ ). The length of stay in subgroup I was shorter than that in subgroup III ( $t/P = 4.394/0.010$ ), and the length of stay in subgroup II was shorter than that in subgroup IV ( $t/P = 6.700/ < 0.001$ ). **Conclusion** In patients with EOS increased phenotype AECOPD, the short-term efficacy of GC systemic administration is better than budesonide/formoterol aerosol inhalation, while in non-EOS increased phenotype AECOPD patients, the short term efficacy of aerosol inhalation therapy is similar to GC systemic administration, and aerosol inhalation therapy can replace GC systemic administration.

**[Key words]** Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; Eosinophilic granulocyte phenotype; Budesonide/Formoterol; Glucocorticoid; Atomizing inhalation; Systemic application; Therapeutic effect; Eosinophils; Blood gas analysis

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是呼吸科常见、多发疾病,发病率、致残率及病死率均较高,目前已成为全球第三大死因,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。急性加重是 COPD 患者肺功能恶化的危险因素,显著增加 COPD 病死率和医疗支出<sup>[2]</sup>。因此,对 COPD 急性加重期 (AECOPD) 患者予以合理有效的治疗显得尤为重要。COPD 稳定期患者存在轻度全身炎性反应,而 AECOPD 患者全身炎性反应水平显著提高<sup>[3]</sup>。糖皮质激素 (glucocorticoids, GC) 是一种有效的抗炎药,临床研究表明<sup>[4]</sup>, AECOPD 患者采用 GC 治疗,可减少住院时间,加速肺功能恢复。且研究报道<sup>[5]</sup>, AECOPD 患者全身性应用 GC 的短期疗效优于其他用药途径。但为减少 AECOPD 患者全身性应用 GC 的潜在隐患,临床常采用雾化吸入布地奈德/福莫特罗<sup>[6]</sup>。嗜酸性粒细胞 (EOS) 增多是哮喘常见炎性反应表型。研究发现<sup>[7]</sup>,部分 AECOPD 患者诱导痰及外周血中存在 EOS 增多现象,AECOPD 发生与 EOS 性炎性反应密切相关。目前研究认为<sup>[8]</sup>, EOS 性气道炎性反应可能是 COPD 一种表型,此表型对局部或全身应用 GC 反应良好。但关于 EOS 增多表型和非 EOS 增多表型 AECOPD 局部或全身应用 GC 短期疗效差异临床鲜有研究。基于此,本研究对此展开探讨,旨在为个体化治疗提供参考,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2020 年 6 月—2023 年 6 月中国人民解放军新疆军区总医院呼吸内科诊治 AECOPD 患者 168 例,根据 EOS 比例分为 EOS 增多表型组

(EOS > 2%,  $n = 42$ )、非 EOS 增多表型组 (EOS ≤ 2%,  $n = 126$ ), EOS 增多表型组随机分为 I 亚组 ( $n = 21$ )、II 亚组 ( $n = 21$ ), 非 EOS 增多表型组随机分为 III 亚组 ( $n = 63$ )、IV 亚组 ( $n = 63$ )。4 个亚组患者性别、年龄、吸烟、COPD 病程、合并症、病情程度及入院时氧合指数 ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ )、动脉血二氧化碳分压 ( $\text{PaCO}_2$ )、慢性阻塞性肺疾病评估测试量表 (CAT) 评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); I 亚组、II 亚组静脉血 EOS 计数高于 III 亚组、IV 亚组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。本研究已经获得医院伦理委员会批准(202004-009),患者或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均符合 COPD 诊断标准<sup>[9]</sup>;②因急性加重而住院,符合 AECOPD 诊断标准<sup>[10]</sup>。(2)排除标准:①合并高 EOS 血症、支气管哮喘、过敏性疾病及外周 EOS 增高的其他疾病;②合并自身免疫性疾病、恶性肿瘤、肝肾功能不全等其他系统疾病;③合并肺栓塞、肺炎、支气管扩张等肺部疾病;④入院前 1 个月内采用 GC 治疗;⑤入院 5 d 内病情危重采用机械通气治疗。

1.3 治疗方法 患者均给予支气管舒张剂—多索茶碱(开封康诺药业有限公司)0.3 g/次静脉滴注,每天 1 次;祛痰剂—盐酸氨溴索注射液(上海勃林格殷格翰药业有限公司)30 mg/次静脉滴注,每天 2 次;抗感染(选择适当抗菌药物)治疗。在此基础上, I 、III 亚组给予布地奈德/福莫特罗 (AstraZeneca AB) 吸入治疗,1 吸/次,每天 2 次,连用 5 d 以上; II 、IV 亚组患者口服泼尼松片(天津天生药业有限公司)20~60 mg/d,早 8

表 1 4 亚组 AECOPD 患者临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical data of 4 subgroups of AECOPD patients

项目		I 亚组(n=21)	II 亚组(n=21)	III 亚组(n=63)	IV 亚组(n=63)	F/χ <sup>2</sup> 值	P 值
性别[例(%)]	男	11(52.38)	12(57.14)	36(57.14)	35(55.56)	0.161	0.984
	女	10(47.62)	9(42.86)	27(42.86)	28(44.44)		
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		68.51 ± 9.47	69.08 ± 10.26	69.44 ± 9.82	68.93 ± 10.55	0.053	0.984
吸烟[例(%)]		14(66.67)	13(61.90)	41(65.08)	39(61.90)	0.249	0.969
COPD 病程( $\bar{x} \pm s$ ,年)		19.06 ± 3.82	18.75 ± 3.76	19.28 ± 4.05	18.81 ± 3.94	0.184	0.907
并发症[例(%)]	高血压	4(19.05)	3(14.29)	11(17.46)	12(19.05)	0.271	0.966
	糖尿病	2(9.52)	1(4.76)	5(7.94)	6(9.52)	0.520	0.915
病情程度[例(%)]	Ⅱ级	11(52.38)	12(57.14)	34(53.97)	33(52.38)	0.160	0.984
	Ⅲ级	10(47.62)	9(42.86)	29(46.03)	30(47.62)		
EOS 计数( $\bar{x} \pm s$ ,个/ $\mu\text{l}$ )		274.59 ± 46.38	271.64 ± 45.73	165.97 ± 58.76	171.55 ± 56.61	37.803	<0.001
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,mmHg)		269.53 ± 15.84	272.39 ± 16.41	270.55 ± 16.19	271.56 ± 16.48	0.149	0.930
PaCO <sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,mmHg)		66.29 ± 4.95	66.57 ± 5.28	65.97 ± 5.68	66.39 ± 5.71	0.090	0.965
CAT 评分( $\bar{x} \pm s$ ,分)		26.28 ± 6.43	26.85 ± 6.71	25.93 ± 6.82	26.49 ± 6.51	0.130	0.942

时顿服,或甲泼尼龙琥珀酸钠(辉瑞制药有限公司)40~80 mg 静脉滴注,每天 1 次,连用 5 d 以上。

#### 1.4 观察指标与方法

1.4.1 静脉血 EOS 计数检测:于入院时、治疗 5 d 后抽取患者外周静脉血 2 ml 于 EDTA 抗凝管,以美国雅培公司 Cell DYN-3500 血细胞分析仪检测静脉血 EOS 计数。

1.4.2 血气分析指标检测:入院时、治疗 5 d 后抽取患者外周静脉血 2 ml,采用德国拜耳血气分析仪检测血气分析指标(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>)。

1.4.3 CAT 评分评定<sup>[11]</sup>:入院时、治疗 5 d 后,从咯痰、胸闷、咳嗽、家务活动能力、爬楼爬坡、外出情况、精力、睡眠质量等方面进行评估,CAT 总分 0~40 分,得分越高,生活质量越差。

1.4.4 住院时间:记录患者入院至出院时间。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件统计分析数据。计数资料以频数或率(%)表示,比较采用  $\chi^2$  检验;符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较采用 F 检验,两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

2.1 4 亚组患者入院时、治疗 5 d 后 EOS 计数比较 治疗 5 d 后,I 亚组、II 亚组静脉血 EOS 计数低于入院时,且 II 亚组静脉血 EOS 计数低于 I 亚组( $P < 0.01$ );入院时、治疗 5 d 后 III 亚组及 IV 亚组静脉血 EOS 计数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

2.2 4 亚组患者入院时、治疗 5 d 后血气分析指标比较 治疗 5 d 后,4 亚组 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 高于入院时,PaCO<sub>2</sub> 低于入院时( $P < 0.01$ );治疗 5 d 后,II 亚组 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 高于 I 亚组,PaCO<sub>2</sub> 低于 I 亚组( $P < 0.01$ );治疗

5 d 后,III 亚组、IV 亚组 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> 差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗 5 d 后,I 亚组 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 高于 III 亚组,PaCO<sub>2</sub> 低于 III 亚组( $t/P = 8.856 / < 0.001, 6.588 / < 0.001$ ),II 亚组 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 高于 IV 亚组,PaCO<sub>2</sub> 低于 IV 亚组( $t/P = 12.456 / < 0.001, 10.350 / < 0.001$ ),见表 3。

表 2 4 亚组 AECOPD 患者入院时、治疗 5 d 后静脉血 EOS 计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,个/ $\mu\text{l}$ )

Tab. 2 Comparison of EOS counts in venous blood of AECOPD patients in 4 subgroups at admission and after 5 days of treatment

组别	例数	入院时	治疗 5 d 后	t 值	P 值
I 亚组	21	274.59 ± 46.38	219.82 ± 39.65	4.113	<0.001
II 亚组	21	271.64 ± 45.73	186.51 ± 42.06	6.279	<0.001
III 亚组	63	165.97 ± 58.76	159.63 ± 60.51	0.597	0.552
IV 亚组	63	171.55 ± 56.61	155.72 ± 59.76	1.526	0.130
t/P I 与 II 亚组比值	0.208/0.837	2.641/0.012			
t/P III 与 IV 亚组比值	0.543/0.588	0.365/0.716			

2.3 4 亚组患者入院时、治疗 5 d 后 CAT 评分比较 治疗 5 d 后,4 个亚组 CAT 评分低于入院时( $P < 0.01$ ),II 亚组低于 I 亚组( $P < 0.05$ ),III 亚组、IV 亚组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );治疗 5 d 后, I 亚组 CAT 评分低于 III 亚组,II 亚组 CAT 评分低于 IV 亚组( $t/P = 1.964 / 0.049, 5.356 / < 0.001$ ),见表 4。

2.4 4 亚组患者住院时间比较 住院时间 II 亚组为( $8.47 \pm 1.86$ )d,短于 I 亚组的( $10.06 \pm 1.93$ )d,2 亚组比较差异有统计学意义( $t/P = 2.718 / 0.010$ );III 亚组( $12.75 \pm 2.57$ )d、IV 亚组( $13.25 \pm 3.08$ )d 比较差异无统计学意义( $t/P = 0.989 / 0.324$ );I 亚组住院时间短于 III 亚组,II 亚组住院时间短于 IV 亚组( $t/P = 4.394 / 0.010, 6.700 / < 0.001$ )。

表 3 4 亚组 AECOPD 患者入院时、治疗 5 d 后血气分析指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mmHg)

Tab. 3 Comparison of blood gas analysis indicators between 4 subgroups of AECOPD patients at admission and after 5 days of treatment

组别	时间	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$	t/P 值	$\text{PaCO}_2$	t/P 值
I 亚组 (n=21)	入院时	269.53 ± 15.84	12.850/ <0.001	66.29 ± 4.95	12.319/ <0.001
	治疗 5 d 后	349.82 ± 23.85		49.08 ± 4.06	
II 亚组 (n=21)	入院时	272.39 ± 16.41	15.402/ <0.001	66.57 ± 5.28	14.275/ <0.001
	治疗 5 d 后	385.61 ± 29.42		44.53 ± 4.71	
III 亚组 (n=63)	入院时	270.55 ± 16.19	5.466/ <0.001	65.97 ± 5.68	9.869/ <0.001
	治疗 5 d 后	291.97 ± 26.56		56.74 ± 4.78	
IV 亚组 (n=63)	入院时	271.56 ± 16.48	5.325/ <0.001	66.39 ± 5.71	9.617/ <0.001
	治疗 5 d 后	293.41 ± 28.09		57.25 ± 4.93	
$t/P$ 值 I 与 II 亚组入院时		0.575/0.569		0.177/0.860	
$t/P$ 值 I 与 II 亚组治疗 5 d 后		4.331/ <0.001		3.351/0.002	
$t/P$ 值 III 与 IV 亚组入院时		0.347/0.729		0.414/0.680	
$t/P$ 值 III 与 IV 亚组治疗 5 d 后		0.296/0.768		0.590/0.557	

表 4 4 亚组 AECOPD 患者入院时、治疗 5 d 后 CAT 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

Tab. 4 Comparison of CAT scores among 4 subgroups of AECOPD patients at admission and after 5 days of treatment

时间	例数	入院时	治疗 5 d 后	t 值	P 值
I 亚组	21	26.28 ± 6.43	15.49 ± 4.97	6.084	<0.001
II 亚组	21	26.85 ± 6.71	11.25 ± 4.55	8.818	<0.001
III 亚组	63	25.93 ± 6.82	17.89 ± 4.81 <sup>a</sup>	7.647	<0.001
IV 亚组	63	26.49 ± 6.51	18.53 ± 5.64 <sup>b</sup>	7.335	<0.001
$t/P$ 值 I 与 II 比较		0.281/0.780	2.884/0.006		
$t/P$ 值 III 与 IV 比较		0.471/0.638	0.685/0.494		

注: 与 I 亚组治疗 5 d 后比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 II 亚组治疗 5 d 后比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

AECOPD 病情严重且进展快, 严重者可出现呼吸衰竭, 是 COPD 患者不良预后的重要因素<sup>[12]</sup>。因此, 针对 AECOPD 患者, 早期尽快采取有效治疗干预措施, 对改善患者预后至关重要。

福莫特罗是新型吸入型长效  $\beta_2$  受体激动剂, 可快速减轻气道痉挛, 减轻气流受限, 但 COPD 患者治疗时, 不推荐单独使用  $\beta_2$  受体激动剂<sup>[13]</sup>。炎性反应是 AECOPD 发病的关键。GC 对多种介导因子(类花生酸类、组胺、细胞因子类)及细胞(EOS、中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等)参与的炎性反应具有广泛抑制作用, 抗炎效应强大, 是 AECOPD 患者首选药物治疗方法的重要部分<sup>[14]</sup>。但 GC 全身给药可引起骨质疏松、高血压、糖尿病等多种并发症。研究报道, GC 雾化吸入可作用于气道黏膜上皮细胞膜受体, 减轻气道炎性反应。布地奈德是具有强效 GC 活性的抗炎性皮质类固醇药物, 可抑制气道炎性反应, 缓解支气管痉挛及气道高反应性, 对哮喘患者吸入性布地奈德制剂可获得更高的局部抗炎作用。本研究采用的布

地奈德/福莫特罗雾化吸入及 GC 全身给药, 均常用于 AECOPD 患者临床治疗。

AECOPD 有明显异质性, 不同表型患者对 GC 治疗反应不同, EOS 增多表型对 GC 反应性较好<sup>[15]</sup>。因此, 识别 AECOPD 表型, 指导个体化治疗, 可避免 GC 滥用。本研究通过外周血 EOS 计数变化, 判断不同 EOS 表型 AECOPD 患者应用不同途径 GC 治疗的疗效差异, 与既往研究报道一致<sup>[16]</sup>。AECOPD 患者病情严重, 多难以进行肺功能检查, 因此, 本研究采用动脉血气指标来评估肺功能。 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 、动脉血  $\text{PaO}_2$  评估肺换气功能,  $\text{PaCO}_2$  评估肺通气功能, 但  $\text{PaO}_2$  受吸氧浓度影响, 而  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  可客观判断不同吸氧浓度下氧合状态, 因此, 本研究采用  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  作为评估肺换气功能的指标。CAT 是广泛用于 COPD 综合评估的量表, 有助于治疗方案制定及疗效评估。住院时间是评价患者最终疗效的客观实用指标<sup>[17]</sup>。本研究显示, 在外周血 EOS 计数、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 、动脉血  $\text{PaCO}_2$ 、CAT 评分、住院时间等方面, 布地奈德/福莫特罗雾化吸入及 GC 全身给药对 EOS 增多表型 AECOPD 患者的疗效均优于非 EOS 增多表型, 提示 EOS 增多表型对局部或全身应用 GC 反应较好, 与文献报道一致<sup>[18]</sup>。

本研究显示, 对于 EOS 增多表型 AECOPD 患者, GC 全身给药在外周血 EOS 计数、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 、动脉血  $\text{PaCO}_2$ 、CAT 评分、住院时间等方面的效果均优于布地奈德/福莫特罗雾化吸入。提示 EOS 增多表型 AECOPD 患者 GC 全身给药短期疗效更佳。分析原因: 相较于 GC 全身给药, 雾化吸入剂量远远减小, 且由于经过肝脏首过效应, 雾化吸入的 GC 全身性活性降低。2 种途径 GC 用量虽无等效剂量关系, 但本研究目的是探讨临床常用的雾化吸入疗法能否替代 GC 全身给药, 而非比较用药途径差异。本研究也发现, EOS 增

多表型 AECOPD 患者布地奈德/福莫特罗雾化吸入及 GC 全身给药,均可有效降低外周血 EOS 计数,改善 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、动脉血 PaCO<sub>2</sub>、CAT 评分等指标,提示 2 种方法均有显著疗效,雾化吸入疗法可减少潜在隐患,仍适用于 EOS 增多表型 AECOPD 患者。布地奈德具有高效抗炎作用,并可维持 β2 受体的高敏感性,加强福莫特罗的支气管扩张作用,二者联合协同可降低外周血 EOS 计数。

对于非 EOS 增多表型 AECOPD 患者,本研究发现,布地奈德/福莫特罗雾化吸入及 GC 全身给药疗效相当,表明非 EOS 增多表型 AECOPD 患者布地奈德/福莫特罗雾化吸入疗法可替代 GC 全身给药。本研究考虑病情非常严重的病例(特别是需机械通气),雾化吸入疗法实施难度大,且机械通气治疗可对血气指标产生影响,排除入院 5 d 内采用机械通气治疗的患者,入组病例 CAT 评分均值 <30 分,对健康状态的影响未达到极重度。

综上可知,EOS 增多表型 AECOPD 患者,GC 全身给药短期疗效均优于布地奈德/福莫特罗雾化吸入,而非 EOS 增多表型 AECOPD 患者,雾化吸入疗法和 GC 全身给药短期疗效相似,雾化吸入疗法可替代 GC 全身给药。本研究不足之处在于,样本量较小,且未按照 CAT 评分疾病状态分类标准进行亚组分析,未展现雾化吸入疗法在不同疾病状态患者中的应用效果。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

艾力扎提·艾则孜:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,论文修改;周海霞:实施研究过程,统计学分析;罗茜、张杰、李争争:实施研究过程,数据整理

## 参考文献

- [1] 梁振宇,王凤燕,陈子正,等.2023 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、管理及预防全球策略更新要点解读[J].中国全科医学,2023,26(11):1287-1298. DOI: 10.12114/j. issn. 1007-9572. 2023.0052.
- [2] 吴国斌,陈兴峰,黄芳,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重期并发呼吸衰竭有创机械通气患者撤机失败的危险因素分析[J].中国中西医结合急救杂志,2023,30(1):46-50. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-9691.2023.01.010.
- [3] 杨益成,丁国正.呼出气一氧化氮在慢性阻塞性肺疾病急性加重患者激素使用中的应用价值研究[J].中国新药杂志,2023,32(5):507-512. DOI: 10.3969/j. issn. 1003-3734. 2023.05.010.
- [4] Baqdunes MW, Leap J, Young M, et al. Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Critical Care Nursing Quarterly, 2021, 44(1):74-90. DOI: 10.1097/CNQ.0000000000000341.
- [5] 王晶,郭伟,侯丽萍,等. FeNO 与 IL-6 指导 AECOPD 患者应用糖皮质激素治疗的临床研究[J].中国免疫学杂志,2021,37(5):595-599. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-484X. 2021.05.016.
- [6] 宋卫珍,董凌云.噻托溴铵吸入剂联合布地奈德福莫特罗治疗对老年急性加重期 COPD 患者肺功能及对 HMGB1、Copeptin 的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(9):1847-1851. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-9202. 2020.09.018.
- [7] Macdonald MI, Osadnik CR, Bulfin L, et al. Low and high blood eosinophil counts as biomarkers in hospitalised acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chest, 2019, 156(1):92-100. DOI: 10.1016/j.chest.2019.02.406.
- [8] 陈泽霖,焦瑞,武思羽,等.不同炎症表型 AECOPD 及 ACO 患者临床特征和糖皮质激素治疗反应比较[J].中国全科医学,2022,25(14):1730-1735. DOI: 10.12114/j. issn. 1007-9572. 2022.0022.
- [9] Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD Executive Summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(5):557-582. DOI: 10.1164/rccm.201701-0218PP.
- [10] 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治专家组.慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治中国专家共识(2017 年更新版)[J].国际呼吸杂志,2017,37(14):1041-1057. DOI: 10.3760/cma.j. issn. 1673-436X. 2017.14.001.
- [11] 宋伟伟,常双喜,禹彩霞,等.慢性阻塞性肺疾病合并肺部感染者 Th17/Treg,IL-17 水平与肺功能及 CAT 评分的关系[J].中国老年学杂志,2022,42(8):1843-1846. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-9202. 2022.08.016.
- [12] De Araujo BE, Kowalski V, Leites GM, et al. AND-ASPEN and ESPEN consensus, and GLIM criteria for malnutrition identification in AECOPD patients: A longitudinal study comparing concurrent and predictive validity [J]. Eur J Clin Nutr, 2022, 76(5):685-692. DOI: 10.1038/s41430-021-01025-x.
- [13] 方佳,肖翔,李瑞金,等.噻托溴铵联合福莫特罗/布地奈德治疗哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠综合征的疗效分析[J].临床内科杂志,2018,35(3):203-204. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-9057. 2018.03.021.
- [14] Kichloo A, Aljada M, Vipparla N, et al. Optimal glucocorticoid dose and the effects on mortality, length of stay, and readmission rates in patients diagnosed with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) [J]. J Investig Med, 2019, 67(8):1161-1164. DOI: 10.1136/jim-2019-001105.
- [15] 魏东晖,李津娜,周宁,等.不同水平血嗜酸性粒细胞的慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者临床特征及预后比较[J].实用医学杂志,2022,38(16):2037-2041. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-5725. 2022.16.010.
- [16] 彭樱,凌琳,缪晔红,等.伴有外周血嗜酸粒细胞增多的慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的临床特征分析[J].国际呼吸杂志,2018,38(19):1453-1459. DOI: 10.3760/cma.j. issn. 1673-436X. 2018.19.004.
- [17] Wang LH, Guo YM, Wang M, et al. A mobile health application to support self-management in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial [J]. Clin Rehabil, 2021, 35(1):90-101. DOI: 10.1177/0269215520946931.
- [18] 陈泽霖.不同炎症表型 AECOPD 及 ACO 患者临床特征和糖皮质激素治疗反应比较[D].石家庄:河北医科大学,2021.

(收稿日期:2024-05-13)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 013

论著 · 临床

# 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 与重症急性胰腺炎患者并发急性胃肠损伤的相关性研究

马家驹, 邹晗, 晏倩, 李玉卓, 浦秦华



基金项目: 江苏省医学科研项目(H2020241)

作者单位: 215200 江苏苏州, 苏州大学附属苏州市第九人民医院重症医学科

通信作者: 浦秦华, E-mail: puqinhua@163.com

**【摘要】 目的** 探讨血清长链非编码 RNA-肺腺癌转移相关转录本 1 (LncRNA-MALAT1)、血管生成素-2 (Ang-2) 与重症急性胰腺炎 (SAP) 患者并发急性胃肠损伤 (AGI) 的相关性。**方法** 选取 2021 年 1 月—2023 年 1 月苏州大学附属苏州市第九人民医院重症医学科收治的轻症急性胰腺炎 (AP) 患者 78 例为轻症 AP 组、中度 AP 患者 78 例为中度 AP 组、SAP 患者 145 例为 SAP 组, 根据是否并发 AGI 将 SAP 患者分为 AGI 亚组 83 例和非 AGI 亚组 62 例。采用实时荧光定量 PCR 检测血清 LncRNA-MALAT1 水平, 酶联免疫吸附法检测血清 Ang-2 水平; 多因素 Logistic 回归分析 SAP 患者并发 AGI 的影响因素; 受试者工作特征 (ROC) 曲线评价血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平对 SAP 患者并发 AGI 的预测价值。**结果** 轻症 AP 组、中度 AP 组、SAP 组血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平依次升高 ( $F/P = 659.197 / < 0.001, 682.682 / < 0.001$ ; 145 例 SAP 患者 AGI 发生率为 57.24% (83/145), AGI 亚组 SAP 患者多器官功能障碍综合征 (MODS) 比例、急性生理和慢性健康评估 II (APACHE II) 评分、ICU 停留时间及血清 D-乳酸、LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平高于非 AGI 亚组 ( $\chi^2 / t/P = 19.273 / < 0.001, 5.052 / < 0.001, 5.308 / < 0.001, 4.085 / < 0.001, 6.864 / < 0.001, 6.824 / < 0.001$ ); 多因素 Logistic 回归结果显示, MODS、APACHE II 评分高、D-乳酸高、LncRNA-MALAT1 高、Ang-2 高为 SAP 患者并发 AGI 的独立危险因素 [ $OR(95\% CI) = 4.496 (1.335 \sim 15.138), 1.331 (1.142 \sim 1.551), 1.070 (1.020 \sim 1.123), 1.101 (1.055 \sim 1.148), 1.571 (1.239 \sim 1.994)$ ]; 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平及二者联合预测 SAP 患者并发 AGI 的 AUC 分别为 0.790、0.785、0.895, 二者联合的 AUC 大于血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平单独预测 ( $Z/P = 3.143 / 0.002, 3.650 / < 0.001$ )。**结论** 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平升高与 SAP 患者并发 AGI 独立相关, 血清 LncRNA-MALAT1 联合 Ang-2 水平预测 SAP 患者并发 AGI 的价值较高。

**【关键词】** 重症急性胰腺炎; 长链非编码 RNA-肺腺癌转移相关转录本 1; 血管生成素-2; 急性胃肠损伤

**【中图分类号】** R576

**【文献标识码】** A

**Correlation between serum LncRNA-MALAT1, Ang-2 and concurrent acute gastrointestinal injury in patients with severe acute pancreatitis** Ma Jiaju, Zou Han, Yan Qian, Li Yuzhuo, Pu Qinhua. Department of Intensive Care Medicine, Suzhou Ninth People's Hospital Affiliated to Suzhou University, Jiangsu Province, Suzhou 215200, China

**Funding program:** Jiangsu Medical Research Project (H2020241)

**Corresponding author:** Pu Qinhua, E-mail: puqinhua@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the correlation between serum long non-coding RNA-metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (LncRNA-MALAT1), angiopoietin-2 (Ang-2) and acute gastrointestinal injuries (AGI) in patients with severe acute pancreatitis (SAP) with complications. **Methods** Seventy-eight patients with mild AP admitted to the Department of Intensive Care Medicine of the Suzhou Ninth People's Hospital Affiliated to Suzhou University were selected as the mild AP group, 78 patients with moderate SAP were selected as the moderate SAP group, and 145 patients with SAP were selected as the SAP group, and the patients with SAP were divided into the AGI subgroup of 83 and the non-AGI subgroup of 62 based on the presence or absence of concomitant AGI. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect serum LncRNA-MALAT1 levels, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum Ang-2 levels; multifactorial Logistic regression was used to analyze the influencing factors of SAP patients with concurrent AGI; and receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate the predictive value of serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels on SAP patients' predictive value of concurrent AGI. **Results** Serum LncRNA-MALAT1 and Ang-

2 levels were sequentially increased in the mild AP, moderate SAP, and SAP groups ( $F/P = 659.197 / < 0.001, 682.682 / < 0.001$ ); The complication rate of AGI in 145 SAP patients was 57.24% (83/145), and the proportion of multiple organ dysfunction syndrome (MODS), acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) scores, duration of ICU stay, and serum D-lactate, LncRNA-MALAT1, and Ang-2 levels were higher in the SAP patients in the AGI subgroup than in the non-AGI subgroup ( $\chi^2/t/P = 19.273 / < 0.001, 5.052 / < 0.001, 5.308 / < 0.001, 4.085 / < 0.001, 6.864 / < 0.001, 6.824 / < 0.001$ ); The results of multifactorial Logistic regression showed that high MODS, high APACHE II score, high D-lactate, high LncRNA-MALAT1, and high Ang-2 were the independent risk factors for the complication of AGI in patients with SAP [ $OR (95\% CI) = 4.496 (1.335 - 15.138), 1.331 (1.142 - 1.551), 1.070 (1.020 - 1.123), 1.101 (1.055 - 1.148), 1.571 (1.239 - 1.994)$ ]; the AUCs of serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels and the combination of the two for predicting concurrent AGI in SAP patients were 0.790, 0.785, and 0.895, respectively, and the AUCs of the combination of the two were greater than the AUCs predicted by serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels alone ( $Z/P = 3.143/0.002, 3.650 / < 0.001$ ). **Conclusion** Elevated serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels were independently associated with concurrent AGI in SAP patients, and serum LncRNA-MALAT1 combined with Ang-2 levels were of high value in predicting concurrent AGI in SAP patients.

**[Key words]** Severe acute pancreatitis; Long non-coding RNA-metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1;Angiopoietin-2;Acute gastrointestinal injury

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种由于胰腺腺泡细胞破坏引起的急腹症,尽管相关防治措施取得较大进展,但重症 AP(severe AP, SAP)仍然严重威胁患者生命健康<sup>[1-3]</sup>。急性胃肠损伤(acute gastrointestinal injury, AGI)是重症 AP 的常见并发症,也是导致其死亡的重要原因<sup>[4]</sup>。研究表明,长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)与炎性反应和血管通透性增加有关,在 SAP 并发 AGI 中发挥至关重要的作用<sup>[5-6]</sup>。肺腺癌转移相关转录本 1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)是一种高度保守的 LncRNA,实验报道 LncRNA-MALAT1 在 AP 组织中表达上调<sup>[7]</sup>。血管生成素(angiopoietin, Ang)-2 是一种血管生长因子,能引起炎性介质释放参与炎性反应和增加血管通透性<sup>[8]</sup>。研究报道,血清 Ang-2 水平升高与 AP 患者病情加重和预后有关<sup>[9]</sup>。然而,关于血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 与 SAP 患者并发 AGI 的相关性鲜见报道,本课题对此进行研究,以期为降低 SAP 患者并发 AGI 发生提供更多依据,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 选取 2021 年 1 月—2023 年 1 月苏州大学附属苏州市第九人民医院重症医学科收治的 SAP 患者 145 例为 SAP 组,男 86 例、女 59 例;年龄 36~84 (59.15 ± 8.93) 岁;AP 病因:酒精性 12 例,脂源性 41 例,胆源性 56 例,特发性 11 例,其他 25 例。选取同期医院收治的轻症 AP 患者 78 例为轻症 AP 组、中度 AP 患者 78 例为中度 AP 组,轻症 AP 组男 46 例、女 32 例;年龄 32~80 (59.08 ± 8.72) 岁;AP 病因:酒精性 6 例,脂源性 21 例,胆源性 33 例,特发性 6 例,其他 12 例。中度 AP 组男 48 例、女 30 例;年龄 25~82 (59.21 ±

8.87) 岁;AP 病因:酒精性 7 例,脂源性 24 例,胆源性 32 例,特发性 5 例,其他 10 例。3 组性别、年龄、AP 病因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(KT202109003),患者或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年龄 ≥ 18 岁;②AP 符合《中国急性胰腺炎诊治指南(2021)》<sup>[10]</sup> 诊断标准;③初次发生 AP;④临床资料完整。(2)排除标准:①自动出院或放弃治疗;②急慢性胃炎、阑尾炎、消化性溃疡等胃肠道疾病;③慢性胰腺炎、胰腺囊性病变等其他胰腺疾病;④恶性肿瘤;⑤精神病患者;⑥自身免疫性疾病或近期使用免疫抑制剂;⑦急慢性感染;⑧妊娠及哺乳期妇女;⑨AP 前严重心肝肾功能损害;⑩血液系统疾病或近期接受抗凝治疗。

## 1.3 观测指标与方法

**1.3.1 血清 LncRNA-MALAT1 水平检测:**于患者入院时采集空腹肘静脉血 3 ml,离心留取上层血清后 -80℃ 冰箱保存待测。采用实时荧光定量 PCR 检测血清 LncRNA-MALAT1 水平。使用上海瑶韵生物科技有限公司的 QIAzol Lysis Reagent 试剂(货号:79306)提取部分血清总 RNA, NanoDrop 8000 超微量紫外分光光度计(赛默飞世尔科技公司)鉴定 RNA 浓度、纯度合格后,使用天根生化科技(北京)有限公司的 InRcute LncRNA cDNA 第一链合成试剂(货号:KR202-02)转录合成 cDNA。按照 2 × SYBR Green qPCR 试剂(武汉益普生物科技有限公司,货号:CSB-DKT030)说明书进行实时荧光定量 PCR。引物序列如下, LncRNA-MALAT1: 上游引物 5'-GAGCATAACCTGAACAAGAT-GTC-3', 下游引物 5'-TAACCATATCCTCATCAAAGCC-

3'; 内参 GAPDH: 上游引物 5'-CCGCCATTAAGCT-GTCTAGTC-3', 下游引物 5'-CCGCCATTAAGCT-GTCTAGTC-3'。反应体系: 2 × SYBR Green qPCR Mix 10 μl、50 × ROX Reference Dye 0.4 μl、正反向引物各 0.4 μl、cDNA 0.5 μl、ddH<sub>2</sub>O 补足到 20 μl; 反应程序: 95°C 5 min 1 次, 95°C 10 s、60°C 30 s、60°C 30 s, 合计 40 次。以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法表示 LncRNA-MALAT1 相对表达量。

**1.3.2 血清 Ang-2 水平检测:** 上述血清采用酶联免疫吸附法检测血清 Ang-2 水平, 试剂购自上海屹科生物科技有限公司(货号:XK-E2202)。

**1.3.3 AGI 诊断及分组:** 参考急性生理和慢性健康评估 II (APACHE II)<sup>[11]</sup> 以及《欧洲危重病医学会关于急性胃肠损伤的定义和处理指南》<sup>[12]</sup> 诊断 AGI。AGI I 级: 发生胃肠道功能障碍或功能衰竭的风险增加(胃肠道功能部分受损, 病因明确的暂时的胃肠道症状); AGI II 级: 胃肠道功能不全(胃肠道功能不能满足机体对水和营养的需求, 但还未影响到全身情况); AGI III 级: 肠道功能衰竭(胃肠道功能丧失, 尽管采取治疗干预也不能恢复胃肠道功能和改善全身情况); AGI IV 级: 胃肠功能衰竭且严重影响其他脏器功能(AGI 发展至危及生命的阶段, 伴有多脏器功能不全和休克)。根据是否并发 AGI 将 SAP 患者分为 AGI 亚组 83 例和非 AGI 亚组 62 例。

**1.4 统计学方法** 选用 SPSS 28.0 软件进行统计学分析。计数资料以频数或率(%)表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用 F 检验; 多因素 Logistic 回归分析 SAP 患者并发 AGI 的影响因素; 绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平对 SAP 患者并发 AGI 的预测价值。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平比较** 随着病情加重, 轻症 AP 组、中度 AP 组、SAP 组患者血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平依次升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

**2.2 2 亚组 SAP 患者临床/病理特征比较** 145 例 SAP 患者 AGI 发生率为 57.24% (83/145)。AGI 亚组 SAP 患者多器官功能障碍综合征(MODS)比例、APACHE II 评分、ICU 停留时间及血清 D-乳酸、LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平高于非 AGI 亚组 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

**2.3 多因素 Logistic 回归分析 SAP 患者并发 AGI 的**

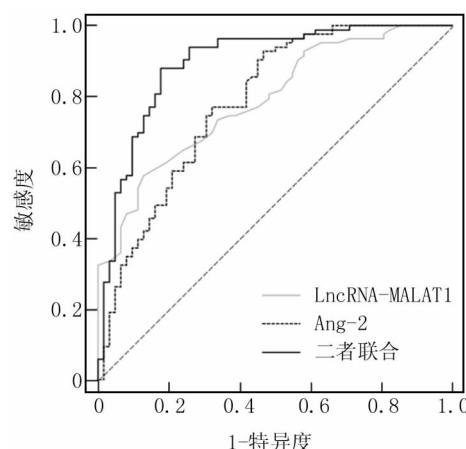
**影响因素** 以 SAP 患者是否并发 AGI 为因变量(是/否 = 1/0), 表 2 中有差异项目 [MODS(有/无 = 1/0)、APACHE II 评分、ICU 停留时间、D-乳酸、LncRNA-MALAT1、Ang-2(连续变量均原值录入)] 为自变量进行多因素 Logistic 回归分析。结果显示: MODS、APACHE II 评分高、D-乳酸高、LncRNA-MALAT1 高、Ang-2 高为 SAP 患者并发 AGI 的独立危险因素( $P < 0.01$ ), 见表 3。

**表 1 轻症 AP 组、中度 AP 组、SAP 组血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平比较** ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 1 Comparison of serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels among mild AP group, moderate SAP group, and SAP group patients**

组别	例数	LncRNA-MALAT1	Ang-2(μg/L)
轻症 AP 组	78	0.73 ± 0.10	5.00 ± 1.87
中度 AP 组	78	1.02 ± 0.14	9.94 ± 2.38
SAP 组	145	1.27 ± 0.17	15.69 ± 3.56
F 值		659.197	682.682
P 值		<0.001	<0.001

**2.4 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平对 SAP 患者并发 AGI 的预测价值** 绘制血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平单独与联合预测 SAP 患者并发 AGI 的 ROC 曲线, 并计算曲线下面积(AUC), 结果显示: 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平及二者联合预测 SAP 患者并发 AGI 的 AUC 分别为 0.790、0.785、0.895, 二者联合的 AUC 大于血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平单独预测 ( $Z/P = 3.143/0.002, 3.650/ < 0.001$ ), 见图 1、表 4。



**图 1 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平预测 SAP 患者并发 AGI 的 ROC 曲线**

**Fig. 1 ROC curve for predicting AGI in SAP patients based on serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels**

表 2 非 AGI 亚组与 AGI 亚组 SAP 患者临床/病理特征比较

Tab. 2 Comparison of clinical/pathological characteristics between Non-AGI subgroup and AGI subgroup SAP patients

项目		非 AGI 亚组 (n = 62)	AGI 亚组 (n = 83)	$\chi^2/t$ 值	P 值
性别[例(%)]	男	33(53.23)	53(63.86)	1.662	0.197
	女	29(46.77)	30(36.14)		
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		57.95 ± 8.46	60.04 ± 9.22	1.395	0.165
饮酒史[例(%)]		19(30.65)	33(39.76)	1.282	0.258
吸烟史[例(%)]		17(27.42)	30(36.14)	1.233	0.267
基础疾病[例(%)]	冠心病	8(12.90)	13(15.66)	0.218	0.640
	糖尿病	12(19.35)	19(22.89)		
AP 病因[例(%)]	高血压	22(35.48)	39(46.99)	1.927	0.165
	酒精性	5(8.06)	7(8.43)		
腹部症状/体征[例(%)]	脂源性	14(22.58)	27(32.53)	2.613	0.625
	胆源性	26(41.94)	30(36.14)		
MODS[例(%)]	特发性	4(6.45)	7(8.43)	0.264	0.607
	其他	13(20.97)	12(14.46)		
MODS[例(%)]	腹胀	54(87.10)	78(93.98)	0.039	0.151
	腹痛	60(96.77)	82(98.80)		
MODS[例(%)]	肠鸣音减弱	62(100.00)	78(93.98)	0.039	0.798
	腹膜刺激征	37(59.68)	53(63.86)		
MODS[例(%)]	排气排便停止	17(27.42)	24(28.92)	<0.001	0.132
		19(30.65)	56(67.47)		
APACHE II 评分( $\bar{x} \pm s$ ,分)		12.65 ± 4.67	17.19 ± 5.81	5.052	<0.001
ICU 停留时间( $\bar{x} \pm s$ ,d)		7.13 ± 2.79	10.39 ± 4.19	5.308	<0.001
血小板计数( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		257.50 ± 72.85	237.44 ± 72.56	1.644	0.102
白细胞计数( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )		12.25 ± 5.22	13.42 ± 5.60	1.281	0.202
血红蛋白( $\bar{x} \pm s$ ,g/L)		145.48 ± 13.90	141.03 ± 14.08	1.890	0.061
C 反应蛋白( $\bar{x} \pm s$ ,mg/L)		110.25 ± 42.05	125.05 ± 52.10	1.834	0.069
血尿素氮( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		6.44 ± 2.46	6.82 ± 2.75	0.861	0.391
血淀粉酶( $\bar{x} \pm s$ ,U/L)		901.34 ± 169.51	968.84 ± 252.04	1.926	0.056
血肌酐( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{mol}/L$ )		126.22 ± 41.27	130.91 ± 36.78	0.720	0.473
D-乳酸( $\bar{x} \pm s$ ,mg/L)		40.71 ± 10.77	50.58 ± 18.14	4.085	<0.001
LncRNA-MALAT1( $\bar{x} \pm s$ )		1.17 ± 0.15	1.34 ± 0.15	6.864	<0.001
Ang-2( $\bar{x} \pm s$ , $\mu\text{g}/L$ )		13.66 ± 3.56	17.21 ± 2.72	6.824	<0.001

表 3 多因素 Logistic 回归分析 SAP 患者并发 AGI 的影响因素

Tab. 3 Multivariate Logistic regression analysis of factors influencing AGI in SAP patients

自变量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
MODS	1.503	0.619	13.125	<0.001	4.496	1.335 ~ 15.138
APACHE II 评分高	0.286	0.078	13.351	<0.001	1.331	1.142 ~ 1.551
ICU 停留时间长	0.015	0.008	3.351	0.067	1.015	0.999 ~ 1.031
D-乳酸高	0.068	0.024	7.676	0.006	1.070	1.020 ~ 1.123
LncRNA-MALAT1 高	0.096	0.022	19.923	<0.001	1.101	1.055 ~ 1.148
Ang-2 高	0.452	0.121	13.861	<0.001	1.571	1.239 ~ 1.994

表 4 血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平对 SAP 患者并发 AGI 的预测价值

Tab. 4 The predictive value of serum LncRNA-MALAT1 and Ang-2 levels for AGI in SAP patients

指 标	截断值	AUC	95% CI	P 值	敏感度	特异度	约登指数
LncRNA-MALAT1	1.26	0.790	0.714 ~ 0.853	<0.001	0.578	0.871	0.449
Ang-2	15.47 $\mu\text{g}/L$	0.785	0.709 ~ 0.849	<0.001	0.928	0.532	0.460
二者联合		0.895	0.834 ~ 0.940	<0.001	0.880	0.823	0.703

### 3 讨 论

AGI 是指危重症患者因急性疾病引起的胃肠道功能障碍,以呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道症状为主要临床表现,病情发展迅速并在短时间内恶化,不仅能引起电解质紊乱、脱水等并发症,严重者还可引起内出血、消化道穿孔、失血性休克和多脏器功能不全,危及生命安全<sup>[12]</sup>。SAP 患者由于炎性反应持续加重和胰蛋白酶异常激活,可引起胃肠道屏障损伤并使胰腺外分泌酶进入胃肠道,导致 AGI 发生,并进一步恶化 SAP 患者病情而增加死亡率<sup>[13]</sup>。本研究中,57.24% 的 SAP 患者并发 AGI,与国内学者姚朝光等<sup>[14]</sup>报道的 62.70% 接近,提示 SAP 患者 AGI 并发率较高。早期、准确地预测 SAP 患者并发 AGI,对指导临床早期预防 AGI 发生和改善 AP 患者预后具有重要意义。

LncRNA 是长度超过 200 个核苷酸且无蛋白质编码能力的 RNA 分子,可通过调控基因表达,影响炎性反应、增强肠道屏障通透性和细胞凋亡等参与 SAP 并发 AGI 的发生发展<sup>[5]</sup>。LncRNA-MALAT1 定位于人染色体 11q13.1,不仅参与多种肿瘤过程,还在多种炎性疾病中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。重复注射雨蛙素诱导的 AP 大鼠模型中,下调 LncRNA-MALAT1 能减少炎性细胞因子表达和胰腺腺泡细胞损伤<sup>[16]</sup>。另一个小鼠 AP 模型研究中,LncRNA-MALAT1 上调能诱导小鼠巨噬细胞 M1(炎性反应型)极化,进而促进 AP 的发展<sup>[17]</sup>。这些研究提示,LncRNA-MALAT1 与 AP 发生发展密切相关。Zhu 等<sup>[18]</sup>报道,LncRNA-MALAT1 过表达能促进人结肠上皮细胞凋亡。Lai 等<sup>[19]</sup>报道,LncRNA-MALAT1 在 SAP 小鼠胰腺和肠道组织中高表达,下调 LncRNA-MALAT1 能减轻胰腺和肠道损伤,预防胃肠运动功能障碍。因此推测血清 LncRNA-MALAT1 可能与 SAP 患者并发 AGI 有关。本研究结果显示,SAP 患者血清 LncRNA-MALAT1 水平升高,是并发 AGI 的独立危险因素,说明血清 LncRNA-MALAT1 水平升高会增加 SAP 患者并发 AGI 的风险。分析原因,LncRNA-MALAT1 能靶向微小 RNA (micro RNA, miRNA)-194 和 miR-181a-5p,激活 yes 相关蛋白 1 和高迁移率族蛋白 B1/Toll 样受体 4 信号通路,减少炎性介质表达对胃肠道的损伤,进而增加 SAP 患者并发 AGI 风险<sup>[16-17]</sup>。同时,LncRNA-MALAT1 能与 CCAAT/增强子结合蛋白 β 相互作用激活细胞外信号调节激酶信号通路,通过增强炎性反应和细胞凋亡加剧胃肠道细胞损伤,导致 SAP 患者 AGI 风险增加<sup>[19-20]</sup>。

Ang-2 是主要由血管内皮细胞产生的一种糖蛋白,在炎性反应和血管损伤时被大量释放表达,能通过

结合并抑制具有免疫球蛋白样和 EGF 样结构域的酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 2, TIE2) 信号通路,导致炎性状态下血管内皮不稳定和血管通透性增加<sup>[8]</sup>。在腹腔内注射 L-精氨酸溶液诱导的大鼠 AP 模型中,Ang-2 升高可激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路,促进 AP 发生<sup>[21]</sup>。近年来,血清 Ang-2 水平被报道为预测 AP 严重程度和并发器官衰竭的新型标志物<sup>[22-23]</sup>。在本研究中,血清 Ang-2 水平随着 AP 患者病情程度加重而升高,说明血清 Ang-2 水平与 AP 严重程度相关,符合既往研究报道。肠道屏障损伤在 SAP 并发 AGI 中发挥至关重要的作用,SAP 持续失控性炎性反应能引起肠道内皮细胞损伤、凋亡和肠黏膜缺血缺氧,进而引起肠道屏障损伤,后者再通过增加有害物质穿过黏膜屏障的可能性,促进 AGI 的发生发展<sup>[6]</sup>。且有实验指出,Ang-2 水平与高血压患者肠道炎性反应和肠道屏障功能障碍有关<sup>[24]</sup>,因此推测血清 Ang-2 可能与 SAP 患者并发 AGI 有关。本研究结果也显示,SAP 患者并发 AGI 的风险随着血清 Ang-2 水平升高而增加。分析原因,Ang-1 与 Ang-2 均可结合受体 TIE2,Ang-1 结合 TIE2 后能通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B、丝裂原活化蛋白激酶等信号通路,诱导附近的血管支持细胞如平滑肌细胞和周细胞至血管内皮细胞周围,使内皮细胞和周围支持细胞紧密连接,达到稳定血管的作用;而 Ang-2 升高能与 Ang-1 竞争性结合 TIE2,抑制 Ang-1/TIE2 信号通路对血管的稳定作用,使血管通透性增强并诱导内皮细胞活化释放多种炎性介质,加剧对肠道屏障的损伤,进而增加 SAP 患者并发 AGI 风险<sup>[8]</sup>。

本研究结果还发现,MODS、APACHE II 评分增加和 D-乳酸升高的 SAP 患者,并发 AGI 风险更高。分析原因,患有 MODS 的 SAP 患者伴有更多的器官或系统损害,因此更易出现 AGI<sup>[25]</sup>;APACHE II 评分越高的 SAP 患者病情更加危重,更易引起胃肠损害而增加 AGI 风险<sup>[14]</sup>;D-乳酸是肠道菌群的代谢产物,其水平越高提示肠道黏膜受损引起细菌移位,因此 AGI 风险更高<sup>[26]</sup>。ROC 曲线显示,血清 LncRNA-MALAT1 联合 Ang-2 水平预测 SAP 患者并发 AGI 的曲线下面积,大于血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平单独预测。表明血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平有助于预测 SAP 患者并发 AGI,同时检测血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平可以更准确地进行预测。

综上所述,SAP 患者血清 LncRNA-MALAT1、Ang-2 水平升高,是 SAP 患者并发 AGI 的独立危险因素,二

者联合对其有较高的预测价值。但本研究也存在选择偏倚,还需进一步多中心研究验证。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

马家驹:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;邹晗:提出研究思路,进行文献调研与整理,论文审核;晏倩:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;李玉卓:实施研究过程,资料搜集整理,进行统计学分析;浦秦华:课题设计,论文修改

#### 参考文献

- [1] 中华医学会急诊分会,京津冀急诊急救联盟,北京医学会急诊分会,等.急性胰腺炎急诊诊断及治疗专家共识[J].中华急诊医学杂志,2021,30(2):161-172. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.02.005.
- [2] 中国医疗保健国际交流促进会急诊医学分会,脓毒症预防与阻断联盟.重症急性胰腺炎预防与阻断急诊专家共识[J].中国急救医学,2022,42(5):369-379. DOI:10.3969/j.issn.1002-1949.2022.05.001.
- [3] 陶丽华,左爽,孙飞,等.血清α-MSH 和 MCP-1 对急性胰腺炎严重程度早期评估及预后的预测价值[J].疑难病杂志,2022,21(10):1035-1039. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2022.10.007.
- [4] Tao FZ,Jiang RL,Jin SF.Implementation of gastrointestinal function protection in severe acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2024,23(5):521-522. DOI:10.1016/j.hbpd.2024.04.006.
- [5] Deng J,Song Z,Li X,et al.Role of lncRNAs in acute pancreatitis: Pathogenesis, diagnosis, and therapy[J]. Front Genet,2023,9(14):1257552. DOI:10.3389/fgene.2023.1257552.
- [6] 温聪聪,王颖,吴德卿,等.重症急性胰腺炎胃肠功能障碍的诊治和发生机制研究进展[J].中华胰腺病杂志,2019,19(2):143-145. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2019.02.018.
- [7] Zhen J,Chen W,Liu Y,et al.Baicalin protects against acute pancreatitis involving JNK signaling pathway via regulating miR-15a[J]. Am J Chin Med, 2021, 49 ( 1 ): 147-161. DOI: 10.1142/S0192415X21500087.
- [8] Balta S.Endothelial dysfunction and inflammatory markers of vascular disease[J]. Curr Vasc Pharmacol,2021,19(3):243-249. DOI:10.2174/1570161118666200421142542.
- [9] 胡春玲,姚芳,杨宇莹.急性胰腺炎患者血清 Ang-2、sFlt-1 水平变化及意义[J].山东医药,2020,60(28):54-57. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.28.014.
- [10] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组.中国急性胰腺炎诊治指南(2021)[J].中华外科杂志,2021,59(7):578-587. DOI:10.3760/cma.j.cn112139-20210416-00172.
- [11] Knaus WA,Draper EA,Wagner DP,et al.APACHE II:A severity of disease classification system[J]. Crit Care Med, 1985, 13 ( 10 ): 818-829.
- [12] Reintam Blaser A, Malbrain ML, Starkopf J, et al. Gastrointestinal function in intensive care patients: Terminology, definitions and management. Recommendations of the ESICM working group on abdominal problems[J]. Intensive Care Med, 2012, 38 ( 3 ): 384-394. DOI:10.1007/s00134-011-2459-y.
- [13] 王惠雨,聂宁.重症急性胰腺炎肠黏膜屏障功能障碍的研究进展[J].临床急诊杂志,2022,23(10):738-742. DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2022.10.010.
- [14] 姚朝光,黄杰安,黄理,等.重症急性胰腺炎急性胃肠损伤的危险因素分析及相关预测模型的构建[J].现代消化及介入诊疗,2023,28(12):1543-1547. DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2023.12.017.
- [15] 冯文娟,罗骏.LncRNA MALAT1 在心血管疾病中的作用机制研究的进展[J].心血管康复医学杂志,2021,30(5):633-636. DOI:10.3969/j.issn.1008-0074.2021.05.32.
- [16] Gu L,Liu J,Xu D,et al.Reciprocal feedback loop of the MALAT1-MicroRNA-194-YAP1 pathway regulates progression of acute pancreatitis[J]. Med Sci Monit,2019,9(25):6894-6904. DOI:10.12659/MSM.915598.
- [17] Liu J,Niu Z,Zhang R,et al.MALAT1 shuttled by extracellular vesicles promotes M1 polarization of macrophages to induce acute pancreatitis via miR-181a-5p/HMGB1 axis[J]. J Cell Mol Med,2021,25(19):9241-9254. DOI:10.1111/jcmm.16844.
- [18] Zhu M,Xie J.LncRNA MALAT1 promotes ulcerative colitis by up-regulating lncRNA ANRIL[J]. Dig Dis Sci,2020,65(11):3191-3196. DOI:10.1007/s10620-020-06093-w.
- [19] Lai L,Wang G,Xu L,et al.CEBPB promotes gastrointestinal motility dysfunction after severe acute pancreatitis via the MALAT1/CIRBP/ERK axis[J]. Mol Immunol, 2023, 156: 1-9. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.02.001.
- [20] Niu Y,Ji H.Current developments in extracellular-regulated protein kinase (ERK1/2) inhibitors[J]. Drug Discov Today,2022,27(5):1464-1473. DOI:10.1016/j.drudis.2022.01.012.
- [21] 刘隽,王国良,徐贤刚,等.血管生成素-2在大鼠急性胰腺炎血清中的表达及其意义[J].中华实验外科杂志,2018,35(7):1268-1270. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.07.024.
- [22] 吕永才,姚燕华,雷静静,等.血管生成素 2 对早期急性胰腺炎严重程度预测价值的系统评价和 Meta 分析[J].胃肠病学和肝病学杂志,2020,29(12):1399-1407. DOI:10.3969/j.issn.1006-5709.2020.12.017.
- [23] Lv Y,Yao Y,Liu Q,et al.Accuracy of angiopoietin-2 for predicting organ failure in patients with acute pancreatitis: A systematic review and meta-analysis [J]. J Int Med Res, 2021, 49 ( 2 ): 300060520986708. DOI:10.1177/0300060520986708.
- [24] Kim S,Goel R,Kumar A,et al.Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132 ( 6 ): 701-718. DOI: 10.1042/CS20180087.
- [25] Chen JH,Zhang MF,Du WC,et al.Risk factors and their interactive effects on severe acute pancreatitis complicated with acute gastrointestinal injury[J]. World J Gastrointest Surg,2023,15(8):1712-1718. DOI:10.4240/wjgs.v15.i8.1712.
- [26] 程源.D-乳酸与 I-FABP 在肠屏障功能受损中作用的研究进展[J].中国临床新医学,2018,11(9):949-953. DOI:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.09.31.

(收稿日期:2024-06-23)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 014

论著 · 临床

# 糖尿病肾病患者血清 LCN-2、TSP-2 水平与肾功能及预后的相关性分析

石敏, 王琼, 周英旎, 张颖, 李晓苗



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573746)

作者单位: 710032 西安, 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院内分泌科

通信作者: 李晓苗, E-mail: xiaomiao@fmmu.edu.cn

**【摘要】 目的** 探讨糖尿病肾病(DN)患者血清脂质运载蛋白-2(LCN-2)、血小板反应蛋白-2(TSP-2)水平与肾功能及预后的相关性。**方法** 选取2018年1月—2020年12月中国人民解放军空军军医大学第一附属医院内分泌科收治的DN患者155例为DN组,同期单纯T2DM患者70例为单纯T2DM组,同期体检健康者70例为健康对照组,根据随访3年预后将DN患者分为不良预后亚组38例和良好预后亚组117例。检测血清LCN-2、TSP-2水平和肾功能指标[估计肾小球滤过率(eGFR)、尿白蛋白肌酐比(UACR)];采用Pearson法分析DN患者血清LCN-2、TSP-2水平与肾功能指标的相关性;Logistic回归模型分析DN患者不良预后的因素;绘制受试者工作特征(ROC)曲线评价血清LCN-2、TSP-2水平对DN患者不良预后的预测价值。**结果** 健康对照组、单纯T2DM组、DN组血清LCN-2、TSP-2水平和UACR依次升高,eGFR依次降低( $F/P = 48.365 / < 0.001, 57.480 / < 0.001, 218.946 / < 0.001, 253.488 / < 0.001$ );155例DN患者3年不良预后发生率为24.52% (38/155);与良好预后亚组比较,不良预后亚组血清LCN-2、TSP-2、UACR水平升高,eGFR降低( $t/P = 7.057 / < 0.001, 6.457 / < 0.001, 4.967 / < 0.001, 5.398 / < 0.001$ );DN患者血清LCN-2、TSP-2水平与eGFR呈负相关( $r/P = -0.745 / < 0.001, -0.731 / < 0.001$ ),与UACR呈正相关( $r/P = 0.703 / < 0.001, 0.691 / < 0.001$ );多因素Logistic回归显示,慢性肾脏病4期、糖化血红蛋白高、UACR高、LCN-2高、TSP-2高为DN患者不良预后的独立危险因素[ $OR(95\% CI) = 3.972 (1.121 \sim 14.076), 1.640 (1.024 \sim 2.628), 1.015 (1.002 \sim 1.030), 1.016 (1.005 \sim 1.027), 1.196 (1.077 \sim 1.328)$ ],eGFR高为独立保护因素[ $OR(95\% CI) = 0.959 (0.924 \sim 0.994)$ ];血清LCN-2、TSP-2水平及二者联合预测DN患者不良预后的曲线下面积(AUC)分别为0.795、0.783、0.882,二者联合的AUC大于血清LCN-2、TSP-2水平单独预测( $Z/P = 3.200 / 0.001, 2.680 / 0.007$ )。**结论** DN患者血清LCN-2、TSP-2水平升高与肾功能及不良预后密切相关,血清LCN-2联合TSP-2水平预测DN患者预后的价值较高。

**【关键词】** 糖尿病肾病;脂质运载蛋白-2;血小板反应蛋白-2;肾功能;预后

【中图分类号】 R587

【文献标识码】 A

**Correlation analysis of serum LCN-2, TSP-2 levels with renal function and prognosis in patients with diabetes nephropathy** Shi Min, Wang Qiong, Zhou Yingni, Zhang Ying, Li Xiaomiao. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of the Chinese People's Liberation Army Air Force Medical University, Shaanxi Province, Xi'an 710032, China  
Funding program: National Natural Science Foundation of China (81573746)

Corresponding author: Li Xiaomiao, E-mail: xiaomiao@fmnu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the correlation between serum lipocalin 2 (LCN-2), thrombospondin 2 (TSP-2) levels and renal function and prognosis in patients with diabetes nephropathy (DN).**Methods** One hundred and fifty-five DN patients admitted to the Endocrinology Department of the First Affiliated Hospital of the Chinese People's Liberation Army Air Force Medical University from January 2018 to December 2020 were selected as the DN group, 70 simple T2DM patients during the same period were selected as the simple T2DM group, and 70 healthy individuals during the same period were selected as the healthy control group. Based on the 3-year prognosis, DN patients were divided into 38 poor prognosis subgroups and 117 good prognosis subgroups. Serum LCN-2 and TSP-2 levels and renal function indicators were detected [estimated glomerular filtration rate (eGFR), urinary albumin creatinine ratio (UACR)]; Pearson's method was used to analyze the correlation between serum LCN-2, TSP-2 levels and renal function indicators in DN patients; Logistic regression model was used to analyze the factors contributing to poor prognosis in DN patients; Receiver operating characteristic (ROC)

curve was established to evaluate the predictive value of serum LCN-2 and TSP-2 levels for poor prognosis in DN patients.

**Results** The serum levels of LCN-2, TSP-2, and UACR in the healthy control group, simple T2DM group, and DN group increased sequentially, while eGFR decreased sequentially ( $F/P = 48.365 / < 0.001, 57.480 / < 0.001, 218.946 / < 0.001, 253.488 / < 0.001$ ); The 3 year incidence of poor prognosis in 155 DN patients was 24.52% (38/155); Compared with the subgroup with good prognosis, the subgroup with poor prognosis had higher LCN-2, TSP-2, UACR, and lower eGFR ( $t/P = 7.057 / < 0.001, 6.457 / < 0.001, 4.967 / < 0.001, 5.398 / < 0.001$ ); The serum levels of LCN-2 and TSP-2 in DN patients were negatively correlated with eGFR ( $r/P = -0.745 / < 0.001, -0.731 / < 0.001$ ), and positively correlated with UACR ( $r/P = 0.703 / < 0.001, 0.691 / < 0.001$ ); Multivariate logistic regression showed that stage 4 chronic kidney disease, high glycated hemoglobin, high UACR, high LCN-2, and high TSP-2 were independent risk factors for poor prognosis in DN patients [ $OR (95\% CI) = 3.972 (1.121 - 14.076), 1.640 (1.024 - 2.628), 1.015 (1.002 - 1.030), 1.016 (1.005 - 1.027), 1.196 (1.077 - 1.328)$ ], and high eGFR was an independent protective factor [ $OR (95\% CI) = 0.959 (0.924 - 0.994)$ ]; The area under the curve (AUC) of serum LCN-2, TSP-2 levels, and their combined prediction of adverse prognosis in DN patients were 0.795, 0.783, and 0.882, respectively. The combined AUC of the two was greater than the AUC predicted solely by serum LCN-2 and TSP-2 levels ( $Z/P = 3.200 / 0.001, 2.680 / 0.007$ ). **Conclusion** The elevated levels of serum LCN-2 and TSP-2 in DN patients are closely related to decreased renal function and prognosis. The combination of serum LCN-2 and TSP-2 levels has a high value in predicting the prognosis of DN patients.

**【Key words】** Diabetic nephropathy; Lipocalin 2; Thrombospondin 2; Renal function; Prognosis

糖尿病是以高血糖为主要特征的慢性代谢性疾病,2021年我国成人糖尿病患者数量为1.41亿,位居全世界第一位<sup>[1]</sup>。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最严重的并发症之一,亦是导致我国居民终末期肾病发生的重要原因,给糖尿病患者生命安全构成了严重威胁<sup>[2-3]</sup>。研究表明<sup>[4]</sup>,肾小管、肾小管间质损伤和炎性反应、纤维化在DN发生发展中扮演重要角色。脂质运载蛋白-2(lipocalin-2, LCN-2)是一种脂肪细胞因子,在肾小管细胞受损后大量释放,与肾损伤密切相关<sup>[5]</sup>。血小板反应蛋白-2(thrombospondin-2, TSP-2/THBS-2)是一种生长因子,通过调节炎性介质和成纤维细胞功能参与炎性反应、纤维化过程<sup>[6]</sup>。据报道, DN患者血清LCN-2、TSP-2水平升高,有助于2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者DN的早期诊断<sup>[7-8]</sup>。然而,关于DN患者血清LCN-2、TSP-2水平与肾功能及预后的相关性鲜见报道,本研究对其进行分析,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2018年1月—2020年12月中国人民解放军空军军医大学第一附属医院内分泌科收治的DN患者155例为DN组,其中男106例、女49例,年龄27~80(50.86±9.04)岁;T2DM病程12~219(90.28±49.02)月;慢性肾脏病分期<sup>[9]</sup>:1期38例,2期53例,3期45例,4期19例。选择同期单纯T2DM患者70例为单纯T2DM组,其中男48例、女22例,年龄18~80(50.72±8.63)岁;T2DM病程4~84(32.54±8.69)月。选择同期体检健康者70例为健

康对照组,男50例、女20例,年龄18~78(58.77±8.73)岁;3组人员的性别、年龄比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究已经获得医院伦理委员会批准(S2018-034-02号),受试者或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符合T2DM和DN诊断标准<sup>[10-11]</sup>;②年龄≥18岁;③病历资料完整。(2)排除标准:①多囊肾、肾病综合征、狼疮性肾炎、过敏性紫癜肾炎或其他肾疾病;②1型糖尿病或其他类型糖尿病;③恶性肿瘤;④已发展为终末期肾病(慢性肾脏病分期5期或接受透析治疗);⑤严重心脑血管疾病;⑥自身免疫性疾病或近期使用免疫抑制药物;⑦近期使用肾毒性药物;⑧合并糖尿病微血管并发症;⑨合并尿路梗阻、尿路感染、尿路损伤等影响蛋白尿疾病;⑩血液系统疾病、精神病患者;⑪拒绝随访或失访患者。

## 1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清LCN-2、TSP-2水平检测:患者于入院次日/健康对照组于体检当日采集空腹肘静脉血3ml,离心留取上清液,以酶联免疫吸附法[试剂盒(浙江羽翔生物科技有限公司,货号EYX-DD00776)、(江西江蓝纯生物试剂有限公司,货号JLC-A8811)]检测血清LCN-2、TSP-2水平。

1.3.2 肾功能指标检测:患者于入院次日/健康对照组于体检当日采集血液和尿液,离心留取血清和上清尿液以PA速率比色法[试剂盒(浙江羽翔生物科技有限公司,货号YX-DS02452)]检测血清和尿液肌酐

(Cr) 水平。尿白蛋白免疫比浊法[试剂盒(深圳市拓普生物科技有限公司,编号 E038-1-1)]检测尿白蛋白(Alb)水平。计算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate,eGFR,  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^{-2}$ ) = [186 × 血肌酐(mg/dl)] - (1.154 × 年龄) - 0.203 × 0.742(女性),尿白蛋白肌酐比(urinary albumin to creatinine ratio, UACR)(mg/g) = 尿白蛋白(mg/L)/尿肌酐(g/L)。

1.3.3 随访和预后分组:DN 患者入院后根据《中国糖尿病肾脏疾病防治临床指南》<sup>[11]</sup>接受相关治疗,出院后通过电话或者门诊复查随访 3 年(每 6 个月 1 次),随访截至 2023 年 12 月或发展为终末期肾病(eGFR < 15  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^{-2}$  或透析治疗)。根据 DN 患者是否发展为终末期肾病将其分为不良预后亚组 38 例和良好预后亚组 117 例<sup>[12]</sup>。

1.4 统计学方法 选用 SPSS 28.0 软件进行数据统计分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  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* 或 *F* 检验,组内两两比较采用 LSD 检验;Pearson 法分析 DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平与肾功能指标的相关性;多因素 Logistic 回归分析影响 DN 患者不良预后的因素;受试者工作特征(ROC)曲线分析血清 LCN-2、TSP-2 水平对 DN 患者不良预后的预测价值。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 3 组血清 LCN-2、TSP-2 水平和肾功能指标比较

健康对照组、单纯 T2DM 组、DN 组血清 LCN-2、TSP-2 水平和 UACR 依次升高,eGFR 依次降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),见表 1。

2.2 不同预后 DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平和肾功能指标比较 随访 3 年,155 例 DN 患者不良预后发生率为 38 例(24.52%)。不良预后亚组血清 LCN-2、TSP-2 及 UACR 高于良好预后亚组,eGFR 低于良好预后亚组,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见表 2。

2.3 不同预后 DN 患者临床/病理特征比较 2 亚组 DN 患者性别、吸烟、T2DM 病程、收缩压、舒张压、DN 家族史、基础病史、FPG、TC、TG、HDL-C、LDL-C、Alb 比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。不良预后亚组年龄、慢性肾脏病 4 期比例、HbA<sub>1c</sub>、SCr 均高于良好预后亚组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 3。

2.4 DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平与肾功能指标的相关性 Pearson 相关性分析显示,DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平与 eGFR 呈负相关(*P* < 0.01),与 UACR 呈正相关(*P* < 0.01),见表 4。

2.5 多因素 Logistic 回归分析 DN 患者预后不良的因素 以 DN 患者预后为因变量(赋值:不良为“1”;良好为“0”)。以上述结果中有差异项目[年龄、慢性肾脏病 4 期(是/否 = 1/0)、HbA<sub>1c</sub>、eGFR、UACR、LCN-2、TSP-2(连续变量原值录入,eGFR 由血肌酐计算得出,故排除血肌酐)]为自变量,进行 Logistic 回归分析。结果显示:慢性肾脏病 4 期、HbA<sub>1c</sub> 高、UACR 高、LCN-2 高、TSP-2 高为 DN 患者不良预后的独立危险因素,eGFR 高为独立保护因素(*P* < 0.05),见表 5。

2.6 血清 LCN-2、TSP-2 水平预测 DN 患者不良预后的价值 绘制血清 LCN-2、TSP-2 水平单独与联合预测 DN 患者不良预后的 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC),结果显示:血清 LCN-2、TSP-2 水平及二者联

表 1 3 组血清 LCN-2、TSP-2 水平和肾功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of serum LCN-2 and TSP-2 levels among three groups

组 别	例数	LCN-2(μg/L)	TSP-2(μg/L)	eGFR( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^{-2}$ )	UACR(mg/g)
健康对照组	70	48.40 ± 13.31	3.34 ± 2.36	109.02 ± 7.29	7.61 ± 3.56
单纯 T2DM 组	70	81.75 ± 21.87 <sup>a</sup>	7.25 ± 4.41 <sup>a</sup>	92.26 ± 7.36 <sup>a</sup>	22.23 ± 6.51 <sup>a</sup>
DN 组	155	114.69 ± 63.39 <sup>ab</sup>	11.22 ± 6.34 <sup>ab</sup>	68.69 ± 17.87 <sup>ab</sup>	109.61 ± 49.70 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		48.365	57.480	218.946	253.488
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与单纯 T2DM 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05。

表 2 不同预后 DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平和肾功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of serum LCN-2, TSP-2 levels and renal function indicators in DN patients with different prognoses

组 别	例数	LCN-2(μg/L)	TSP-2(μg/L)	eGFR( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73\text{m}^{-2}$ )	UACR(mg/g)
良好预后亚组	117	96.85 ± 52.27	9.56 ± 5.41	72.76 ± 16.61	99.09 ± 47.86
不良预后亚组	38	169.63 ± 63.66	16.36 ± 6.30	56.19 ± 15.86	142.01 ± 40.89
<i>t</i> 值		7.057	6.457	5.398	4.967
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 不同预后 DN 患者临床/病理特征比较

Tab. 3 Comparison of clinical/pathological characteristics of DN patients with different prognoses

项目		良好预后亚组(n=117)	不良预后亚组(n=38)	$\chi^2/t$ 值	P 值
性别[例(%)]	男	78(66.67)	28(73.68)	0.653	0.419
	女	39(33.33)	10(26.32)		
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)		49.86 ± 9.21	54.00 ± 7.81	2.507	0.013
吸烟[例(%)]		35(29.91)	15(39.47)	1.199	0.273
T2DM 病程( $\bar{x} \pm s$ ,月)		85.93 ± 47.74	103.68 ± 51.11	1.957	0.052
慢性肾脏病 4 期[例(%)]		8(6.84)	11(28.95)	13.037	<0.001
收缩压( $\bar{x} \pm s$ ,mmHg)		146.30 ± 19.83	151.00 ± 10.33	1.893	0.061
舒张压( $\bar{x} \pm s$ ,mmHg)		86.38 ± 12.83	90.08 ± 9.51	1.638	0.104
DN 家族史[例(%)]		16(13.68)	7(18.42)	0.511	0.475
基础病史[例(%)]	高血压	27(23.08)	14(36.84)	2.794	0.095
	高脂血症	9(7.69)	5(13.16)	0.484	0.487
	冠心病	8(6.84)	6(15.79)	1.814	0.178
FPG( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		9.32 ± 1.59	10.18 ± 2.49	2.001	0.051
HbA <sub>1c</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,%)		7.61 ± 1.11	8.40 ± 1.28	3.652	<0.001
TC( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		5.12 ± 1.51	5.38 ± 1.79	0.877	0.382
TG( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		1.90 ± 0.66	2.02 ± 0.63	1.044	0.298
HDL-C( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		1.15 ± 0.26	1.14 ± 0.30	0.204	0.839
LDL-C( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)		2.65 ± 1.21	3.23 ± 1.66	1.968	0.055
SCr( $\bar{x} \pm s$ ,μmol/L)		162.41 ± 42.12	199.04 ± 75.13	2.863	0.006
Alb( $\bar{x} \pm s$ ,g/L)		34.18 ± 4.85	31.72 ± 7.11	1.988	0.053

表 4 DN 患者血清 LCN-2、TSP-2 水平与肾功能指标的相关性

Tab. 4 Correlation between serum LCN-2, TSP-2 levels and renal function indicators in DN patients

指标	LCN-2		TSP-2	
	r 值	P 值	r 值	P 值
eGFR	-0.745	<0.001	-0.731	<0.001
UACR	0.703	<0.001	0.691	<0.001

表 5 多因素 Logistic 回归分析 DN 患者预后不良的因素

Tab. 5 Multivariate logistic regression analysis of factors contributing to poor prognosis in DN patients

变量	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
年龄大	0.046	0.035	1.746	0.186	1.047	0.978 ~ 1.120
慢性肾脏病 4 期	1.379	0.646	4.565	0.033	3.972	1.121 ~ 14.076
HbA <sub>1c</sub> 高	0.495	0.241	4.233	0.040	1.640	1.024 ~ 2.628
eGFR 高	-0.042	0.019	5.170	0.023	0.959	0.924 ~ 0.994
UACR 高	0.015	0.007	4.790	0.029	1.015	1.002 ~ 1.030
LCN-2 高	0.016	0.005	8.560	0.003	1.016	1.005 ~ 1.027
TSP-2 高	0.179	0.053	11.271	0.001	1.196	1.077 ~ 1.328

合预测 DN 患者不良预后的 AUC 分别为 0.795、0.783、0.882，二者联合的 AUC 大于血清 LCN-2、TSP-2 水平单独预测的 AUC ( $Z = 3.200, 2.680, P = 0.001, 0.007$ )，见表 6、图 1。

### 3 讨论

DN 是糖尿病患者慢性高血糖状态引起的肾脏损害，病变可累及全肾，主要特征为 eGFR 进行性降低

表 6 血清 LCN-2、TSP-2 水平预测 DN 患者不良预后的价值分析

Tab. 6 Value Analysis of Serum LCN-2 and TSP-2 Levels in Predicting Adverse Prognosis of DN Patients

指标	Cut-off	AUC	95% CI	敏感度	特异度	约登指数
LCN-2	108.01 μg/L	0.795	0.723 ~ 0.856	0.895	0.547	0.442
TSP-2	14.73 μg/L	0.783	0.710 ~ 0.845	0.605	0.803	0.408
二者联合		0.882	0.820 ~ 0.928	0.816	0.855	0.671

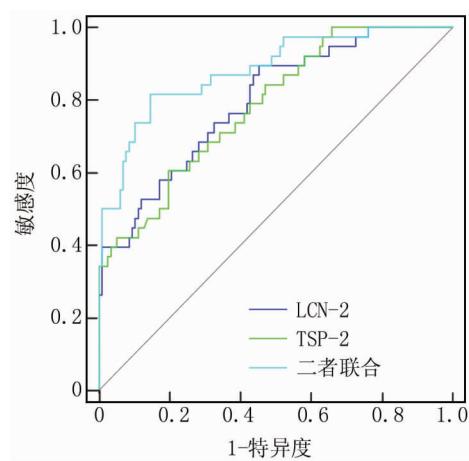


图 1 血清 LCN-2、TSP-2 水平预测 DN 患者不良预后的 ROC 曲线

Fig. 1 ROC curves of serum LCN-2 and TSP-2 levels predicting poor prognosis in DN patients

和/或持续性蛋白尿<sup>[13]</sup>。DN 为持续性进展性疾病,即使积极应用药物控制血糖、血压和蛋白尿,仍有 20%~30% 患者肾功能会持续性降低而进展为终末期肾病,此阶段患者仅能依靠肾移植或透析维系生命,不仅导致肾脏不良预后,还会增加各种心脑血管疾病和死亡风险<sup>[14]</sup>。本研究中 24.52% 的 DN 组患者发生不良预后,与国内学者董小伟等<sup>[15]</sup>报道的 26.25% 相近,说明 DN 患者预后较差。及时预测 DN 患者预后,对延缓其病情进展和改善长期预后具有重要意义。

eGFR、UACR 是反映 DN 患者肾功能及进展的重要指标<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, DN 组 eGFR 低于单纯 T2DM 组和健康对照组,UACR 高于单纯 T2DM 组和健康对照组,能独立影响 DN 患者预后。说明 DN 患者肾功能显著下降,且不良预后风险随着肾功能下降而增加。结果还显示,单纯 T2DM 组 eGFR 低于健康对照组,UACR 高于健康对照组,提示 T2DM 患者也伴有肾功能下降,考虑与 T2DM 患者长期高血糖作用于肾脏引起肾损害有关。DN 的发生发展与多种机制相关,糖尿病患者长期慢性高血糖能激活炎性反应、氧化应激等损伤肾组织并诱导肾血管、肾小管、肾间质、肾小球等细胞凋亡和纤维化,破坏肾组织结构和功能导致 DN 发生发展<sup>[4]</sup>。LCN-2 是一种由 198 个氨基酸组成的糖蛋白,属于脂钙蛋白超家族的成员,最初从人类感染、炎性反应部位释放的中性粒细胞颗粒和小鼠肾细胞中分离出来,且推测与肾疾病有关<sup>[5]</sup>。LCN-2 具有抑菌特性,通过结合载铁蛋白调节铁稳态发挥抗菌作用,这种特性使其在感染、氧化应激、损伤、炎性反应等多种细胞应激过程中发挥重要的保护作用<sup>[16]</sup>。近年研究发现,肾小管也是产生 LCN-2 的主要场所,正常血液中可检测到少量 LCN-2,当肾小管受损时 LCN-2 被大量释放,血液循环中 LCN-2 经肾小球滤过后又会被近端肾小管通过 meglin 受体依赖方式重吸收,以此增加血液中 LCN-2 浓度<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>实验显示,LCN-2 在高糖诱导的肾损伤小鼠血液和尿液中升高,敲除 LCN-2 基因可导致肾小管间质氧化应激、炎性反应和纤维化,加剧肾小管间质损害。Han 等<sup>[19]</sup>实验显示,抑制 LCN-2 表达能使半胱氨酸蛋白酶-3 mRNA 增加 4.5 倍,以促进脂多糖诱导的肾小管细胞凋亡。最近几项研究报道<sup>[7,20]</sup>,血清和尿液 LCN-2 水平对 DN 诊断具有一定价值。故推测血清 LCN-2 可能影响 DN 患者预后。本研究结果显示, DN 患者血清 LCN-2 水平升高,与 eGFR 呈负相关,与 UACR 呈正相关,是不良预后的独立危险因素,说明血清 LCN-2 水平升高与 DN 患者肾功能和预后下降密切相关。分析原因,血

清 LCN-2 水平升高是一种保护性反应,它被肾小管所调节,在肾小管及间质损伤后大量释放表达,旨在结合并转运铁离子通过抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等作用维持肾小管及间质功能,因此血清 LCN-2 水平越高间接说明肾小管及间质损伤越严重,导致肾功能降低和不良预后风险增加<sup>[21]</sup>。

TSP-2 是由血小板和成纤维细胞、内皮细胞、肌肉细胞、平滑肌细胞等产生的一种细胞外基质蛋白,当组织受损时 TSP-2 释放并促进炎性反应细胞活化导致炎性反应,并刺激成纤维细胞增殖和合成胶原蛋白等细胞外基质成分,促进组织纤维化<sup>[6]</sup>。如 TSP-2 能上调白介素-1β、白介素-6、白介素-17A 等炎性反应因子和 α 平滑肌肌动蛋白、纤连蛋白、I 型胶原蛋白等纤维化因子表达,促进肺泡炎性反应和肺组织纤维化<sup>[22]</sup>。脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠模型中,沉默 TSP-2 能减少炎性反应因子和凋亡因子表达,抑制小鼠肾小管上皮细胞炎性反应和凋亡<sup>[23]</sup>。高糖诱导的人肾近端小管细胞损伤模型中,下调 TSP-2 能提高肾小管细胞活力,抑制细胞凋亡<sup>[24]</sup>。Lee 等<sup>[25]</sup>报道,T2DM 患者血清 TSP-2 水平升高与 eGFR 下降(定义为持续 eGFR 下降 ≥40%) 独立相关。Lin 等<sup>[8]</sup>指出,TSP-2 在 T2DM、DN 患者血清和 DN 小鼠肾组织中升高,血清 TSP-2 为早期 DN 的独立危险因素。故推测血清 TSP-2 可能影响 DN 患者预后。本研究结果显示, DN 患者血清 TSP-2 水平升高,与 eGFR 呈负相关,与 UACR 呈正相关,是不良预后的独立危险因素,这说明血清 TSP-2 水平升高与 DN 患者肾功能和预后下降密切相关。分析原因,血清 TSP-2 水平升高能诱导更多炎性反应细胞活化引起大量炎性反应介质释放,并通过刺激成纤维细胞增殖和细胞外基质成分合成,加剧肾组织炎性反应和纤维化进程,导致肾功能降低和不良预后风险增加<sup>[22-23]</sup>。同时,TSP-2 能激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路,促进肾小管细胞凋亡,导致肾功能恶化和预后不良<sup>[24]</sup>。

本研究结果还显示,慢性肾脏病 4 期、糖化血红蛋白高的 DN 患者不良预后风险更高。考虑原因,慢性肾脏病 4 期说明患者肾功能更差,糖化血红蛋白高说明患者血糖紊乱更严重会加剧肾损伤,故不良预后风险更高<sup>[26]</sup>。ROC 曲线显示,血清 LCN-2、TSP-2 水平单独与联合预测 DN 患者不良预后的 AUC 分别为 0.795、0.783、0.882, 血清 LCN-2 联合 TSP-2 水平预测的 AUC 最大。说明血清 LCN-2、TSP-2 水平有助于预测 DN 患者预后,且二者联合预测价值更高。

综上所述,血清 LCN-2、TSP-2 水平升高与 DN 患

者肾功能降低及预后不良有关,二者联合对 DN 患者预后有较高的预测价值。但本研究也存在选择偏倚,还需进一步多中心研究。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

石敏:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王琼:数据收集,分析整理,论文审核;周英旎:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;张颖:进行统计学分析;李晓苗:进行文献调研与整理

#### 参考文献

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会,国家基本公共卫生服务项目基层糖尿病防治管理办公室.国家基层糖尿病肾脏病防治技术指南(2023)[J].中华内科杂志,2023,62(12):1394-1405. DOI: 10.3760/cma.j.cn112138-20231017-00223.
- [3] 中华医学会肾脏病学分会专家组.糖尿病肾脏疾病诊断、预后评估和生物标志物应用专家共识[J].中华肾脏病杂志,2022,38(8):771-784. DOI: 10.3760/cma.j.cn441217-20220106-00112.
- [4] Tuttle KR, Agarwal R, Alpers CE, et al. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(2): 248-260. DOI: 10.1016/j.kint.2022.05.012.
- [5] Jaberi SA, Cohen A, D'Souza C, et al. Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 10 (142): 112002. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112002.
- [6] Zhang K, Li M, Yin L, et al. Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(5): 1275-1293. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4507.
- [7] 朱明霞,陈志鑫,范暖东.血清 uⅡ-CysC、NGAL 水平联合检测对早期糖尿病肾病患者诊断效能的 ROC 曲线分析[J].医学检验与临床,2023,34(10):57-59. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5013.2023.10.014.
- [8] Lin Z, Zhang D, Zhang X, et al. Extracellular status of thrombospondin-2 in type 2 diabetes mellitus and utility as a biomarker in the determination of early diabetic kidney disease[J]. *BMC Nephrol*, 2023, 24(1): 154. DOI: 10.1186/s12882-023-03216-z.
- [9] 上海慢性肾脏病早发现及规范化诊治与示范项目专家组.慢性肾脏病筛查诊断及防治指南[J].中国实用内科杂志,2017,37(1):28-34. DOI: 10.19538/j.nk2017010108.
- [10] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南(2017 版)[J].中华糖尿病杂志,2018,10(1):4-67. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2018.01.003.
- [11] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组.中国糖尿病肾脏病防治临床指南[J].中华糖尿病杂志,2019,11(1):15-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2019.01.004.
- [12] Floege J, Barbour SJ, Catran DC, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): conclusions from a kidney disease; im-
- [13] 严翀,王杨,张令晖.血清 TG、TPOAb 表达与 2 型糖尿病肾病及远期预后的相关性[J].疑难病杂志,2022,21(12):1248-1252,1258. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.12.005.
- [14] 中华医学会肾脏病学分会专家组.终末期糖尿病肾脏病肾替代治疗的中国指南[J].中华肾脏病杂志,2022,38(1):62-75. DOI: 10.3760/cma.j.cn441217-20210322-00012.
- [15] 董小伟,房勃龙,齐琳,等.尿铜蓝蛋白、肾损伤因子 1 与糖尿病肾病患者肾功能的关系及对预后不良的预测价值研究[J].现代生物医学进展,2023,23(11):2083-2088. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.11.016.
- [16] Schröder SK, Gasterich N, Weiskirchen S, et al. Lipocalin 2 receptors: facts, fictions, and myths[J]. *Front Immunol*, 2023, 8(14): 1229885. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1229885.
- [17] Romejko K, Markowska M, Niemczyk S. The review of current knowledge on neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10470. DOI: 10.3390/ijms241310470.
- [18] Liu X, Zhao X, Duan X, et al. Knockout of NGAL aggravates tubulointerstitial injury in a mouse model of diabetic nephropathy by enhancing oxidative stress and fibrosis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 321. DOI: 10.3892/etm.2021.9752.
- [19] Han M, Li Y, Wen D, et al. NGAL protects against endotoxin-induced renal tubular cell damage by suppressing apoptosis[J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19(1): 168. DOI: 10.1186/s12882-018-0977-3.
- [20] 申宜梅,仲海峰,杨小华,等. PCX、NGAL、VCAM-1 联合检测对糖尿病肾病的诊断价值研究[J].国际泌尿系统杂志,2021,41(3):498-502. DOI: 10.3760/cma.j.cn431460-20200727-00031.
- [21] Liu H, Feng J, Tang L. Early renal structural changes and potential biomarkers in diabetic nephropathy [J]. *Front Physiol*, 2022, 11(13): 1020443. DOI: 10.3389/fphys.2022.1020443.
- [22] Liu Q, Bi Y, Song S, et al. Exosomal miR-17-5p from human embryonic stem cells prevents pulmonary fibrosis by targeting thrombospondin-2[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 234. DOI: 10.1186/s13287-023-03449-7.
- [23] Shen Y, Yu J, Jing Y, et al. MiR-106a aggravates sepsis-induced acute kidney injury by targeting THBS2 in mice model[J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(6): e201900602. DOI: 10.1590/s0102-865020190060000002.
- [24] Mo T, Fu Q, Hu X, et al. MicroRNA 1228 mediates the viability of high glucose-cultured renal tubule cells through targeting thrombospondin 2 and PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2022, 47(1): 1-12. DOI: 10.1159/000516791.
- [25] Lee CH, Lui DT, Cheung CY, et al. Circulating thrombospondin-2 level for identifying individuals with rapidly declining kidney function trajectory in type 2 diabetes: A prospective study of the Hong Kong west diabetes registry[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 2(28): gfad034. DOI: 10.1093/ndt/gfad034.
- [26] 于天宇,姜世敏,高红梅,等.糖尿病肾病慢性肾脏病 4 期患者肾脏临床及病理因素与预后的关系[J].首都医科大学学报,2022,43(5):707-712. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2022.05.007.

(收稿日期:2024-05-11)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 015

论著 · 临床

# 老年肌少症患者血清硬骨素和 n-3 脂肪酸表达水平及临床价值研究

王枚, 张晓阳, 张玉婷, 杨越, 侯静雯



基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C432)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学第五附属医院老年病科(王枚、张晓阳、张玉婷、侯静雯), 神经内科(杨越)

通信作者: 张晓阳, E-mail: 837459454@qq.com

**【摘要】 目的** 探讨血清硬骨素、n-3 脂肪酸在老年肌少症患者中的表达水平及临床意义。**方法** 收集 2021 年 5 月—2023 年 5 月新疆医科大学第五附属医院老年病科收治的老年肌少症患者 118 例为病例组, 根据病情程度分为肌少症前期( $n=39$ )、肌少症期( $n=46$ )和重度肌少症期( $n=33$ ), 选取同期医院健康体检者 60 例为健康对照组。酶联免疫吸附法检测血清硬骨素, 气相色谱法检测 n-3 脂肪酸水平; 人体成分分析仪和生物电阻抗体法检测体脂百分比、上臂围、内脏脂肪面积、蛋白质质量; 6M 步行法测量步速, Jamar 握力计测量双手握力, 双能 X 线吸收仪测量全身及四肢骨骼肌质量, 计算相对四肢骨骼肌质量指数(RSMI); 硬骨素和 n-3 脂肪酸与病情严重程度及上述指标的相关性用 Pearson 积矩相关或 Spearman 秩相关分析; 采用 Logistic 回归分析老年肌少症的影响因素, ROC 曲线评估血清硬骨素和 n-3 脂肪酸对老年肌少症的诊断价值。**结果** 病例组患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平低于健康对照组( $t/P = 13.342/ < 0.001, 13.116/ < 0.001$ ); 血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平比较, 肌少症前期 > 肌少症期 > 重度肌少症期( $F/P = 59.138/ < 0.001, 79.217/ < 0.001$ ); 病例组患者体脂百分比、内脏脂肪面积大于健康对照组( $t/P = 8.732/ < 0.001, 5.124/ < 0.001$ ), 上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI 水平低于健康对照组( $t/P = 3.859/ < 0.001, 8.459/ < 0.001, 5.758/ < 0.001, 12.492/ < 0.001, 7.006/ < 0.001, 10.334/ < 0.001, 11.813/ < 0.001$ ); 老年肌少症患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸与体脂百分比、内脏脂肪面积呈负相关(硬骨素: $r/P = -0.537/ < 0.001, -0.612/ < 0.001$ ; n-3 脂肪酸: $r/P = -0.498/ < 0.001, -0.523/ < 0.001$ ), 与上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI 呈正相关(硬骨素: $r/P = 0.593/ < 0.001, 0.624/ < 0.001, 0.639/ < 0.001, 0.597/ < 0.001, 0.601/ < 0.001, 0.607/ < 0.001, 0.638/ < 0.001$ ; n-3 脂肪酸: $r/P = 0.569/ < 0.001, 0.611/ < 0.001, 0.570/ < 0.001, 0.592/ < 0.001, 0.549/ < 0.001, 0.534/ < 0.001, 0.587/ < 0.001$ ); 年龄、体脂百分比、内脏脂肪面积升高是老年肌少症危险因素 [ $OR(95\% CI) = 1.702(1.115 \sim 2.600), 1.551(1.052 \sim 2.287), 1.387(1.006 \sim 1.913)$ ], BMI、上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI、硬骨素、n-3 脂肪酸升高是老年肌少症的保护因素 [ $OR(95\% CI) = 0.728(0.539 \sim 0.982), 0.768(0.593 \sim 0.995), 0.845(0.723 \sim 0.986), 0.815(0.668 \sim 0.995), 0.585(0.382 \sim 0.897), 0.746(0.573 \sim 0.972), 0.733(0.559 \sim 0.964), 0.713(0.541 \sim 0.940), 0.822(0.695 \sim 0.973), 0.803(0.664 \sim 0.971)$ ]; 血清硬骨素、n-3 脂肪酸及二者联合诊断老年肌少症的 AUC 分别为 0.822、0.818、0.894, 二者联合诊断老年肌少症的 AUC 大于其各自单独诊断( $Z=2.205, 2.328, P=0.002, 0.001$ )。**结论** 老年肌少症患者血清硬骨素和 n-3 脂肪酸降低, 两指标与病情严重程度密切相关, 早期联合检测可辅助临床诊断老年肌少症。

【关键词】 肌少症; 硬骨素; n-3 脂肪酸; 老年人

【中图分类号】 R685 【文献标识码】 A

## Study on the expression level and clinical value of serum sclerostin and n-3 fatty acid in elderly sarcopenia patients

Wang Mei\*, Zhang Xiaoyang, Zhang Yuting, Yang Yue, Hou Jingwen. \* Department of Geriatrics, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Province, Urumqi 830011, China

Funding program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01C432)

Corresponding author: Zhang Xiaoyang, E-mail: 837459454@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression level and clinical significance of serum sclerostin and n-3 fatty acid in elderly patients with sarcopenia. **Methods** One hundred and eighteen elderly patients with sarcopenia admitted to the Department of Geriatrics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from May 2021 to May 2023 were

collected as the case group, according to the severity of the disease, the patients were divided into pre-sarcopenia ( $n = 39$ ), sarcopenia ( $n = 46$ ) and severe sarcopenia ( $n = 33$ ), and 60 healthy subjects were selected as the control group. Serum sclerostin was detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and n-3 fatty acid level was detected by gas chromatography. Body composition analyzer and bioelectrical resistance antibody method were used to detect body fat percentage, upper arm circumference, visceral fat area and protein mass, the walking speed was measured by 6 m walking method, the grip strength of both hands was measured by Jamar grip strength meter, and the skeletal muscle mass of the whole body and limbs was measured by dual energy X-ray absorptiometry, and the relative skeletal muscle mass index (RSMI) of the limbs was calculated; the correlation of sclerostin and n-3 fatty acids with disease severity and body fat percentage, upper arm circumference, visceral fat area, protein mass, walking speed, grip strength, skeletal muscle mass and RSMI was analyzed by Pearson product moment correlation or Spearman rank correlation; Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of sarcopenia in the elderly. The diagnostic value of serum sclerostin and n-3 fatty acids for sarcopenia in the elderly was evaluated by ROC curve. **Results** Serum sclerostin and n-3 fatty acid levels in case group were less than those in control group ( $t/P = 13.342 / < 0.001, 13.116 / < 0.001$ ). Serum sclerostin and n-3 fatty acid levels in pre-sarcopenia stage were higher than those in sarcopenia stage and severe sarcopenia stage ( $F/P = 59.138 / < 0.001, 79.217 / < 0.001$ ). Percentage of body fat, and visceral fat area in case group were greater than those in control group ( $t/P = 8.732 / < 0.001, 5.124 / < 0.001$ ), upper arm circumference, protein mass, walking speed, grip strength, skeletal muscle mass of the whole body and limbs, RSMI in case group were less than those in control group ( $t/P = 3.859 / < 0.001, 8.459 / < 0.001, 5.758 / < 0.001, 12.492 / < 0.001, 7.006 / < 0.001, 10.334 / < 0.001, 11.813 / < 0.001$ ). Serum sclerostin and n-3 fatty acid levels were negative associated with percentage of body fat, and visceral fat area ( $r/P = -0.537 / < 0.001, -0.612 / < 0.001, -0.498 / < 0.001, -0.523 / < 0.001$ ), and positive associated with upper arm circumference, protein mass, walking speed, grip strength, skeletal muscle mass of the whole body and limbs, RSMI ( $r/P = 0.593 / < 0.001, 0.624 / < 0.001, 0.639 / < 0.001, 0.597 / < 0.001, 0.601 / < 0.001, 0.607 / < 0.001, 0.638 / < 0.001; 0.569 / < 0.001, 0.611 / < 0.001, 0.570 / < 0.001, 0.592 / < 0.001, 0.549 / < 0.001, 0.534 / < 0.001, 0.587 / < 0.001$ ). Age, body fat percentage, and increased visceral fat area are risk factors for sarcopenia in the elderly [ $OR (95\% CI) = 1.702 (1.115 - 2.600)$ , 1.551 (1.052 - 2.287), 1.387 (1.006 - 1.913)], while BMI, upper arm circumference, protein mass, pace, grip strength, whole-body skeletal muscle mass, limb skeletal muscle mass, RSMI, osteocalcin, and n-3 fatty acids are protective factors for sarcopenia in the elderly [ $OR (95\% CI) = 0.728 (0.539 - 0.982), 0.768 (0.593 - 0.995), 0.845 (0.723 - 0.986), 0.815 (0.668 - 0.995), 0.585 (0.382 - 0.897), 0.746 (0.573 - 0.972), 0.733 (0.559 - 0.964), 0.713 (0.541 - 0.940), 0.822 (0.695 - 0.973), 0.803 (0.664 - 0.971)$ ]; The AUC of serum osteocalcin, n-3 fatty acids, and their combined diagnosis of sarcopenia in the elderly were 0.822, 0.818, and 0.894, respectively. The AUC of their combined diagnosis of sarcopenia in the elderly was greater than that of their individual diagnosis ( $Z = 2.205, 2.328, P = 0.002, 0.001$ ). **Conclusion** Serum sclerostin and n-3 fatty acids decrease in elderly sarcopenia patients, which are related to disease progression. Early testing of two indicators can be used as biochemical indicators in clinical diagnosis of elderly sarcopenia patients.

**[Key words]** Sarcopenia; Sclerostin; n-3 fatty acids; Elderly

肌肉减少症又称肌少症,由蛋白质合成和分解失衡所致,以全身肌肉量减少、肌肉力量下降和/或肌肉生理功能减退为主要特征,好发于老年人<sup>[1-2]</sup>。肌少症发病隐匿,早期无特异性临床症状,大部分患者因跌倒或失能等并发症就诊时确诊,延误了最佳治疗时机<sup>[3]</sup>。简易五项问卷(SARC-F)及石井评分(Ishii 评分)等是肌少症的快速筛查问卷,但其准确性易受患者主观影响且有人群异质性<sup>[4]</sup>。硬骨素是主要由成熟骨细胞分泌的单体糖蛋白,通过调控Wnt信号转导通路抑制成骨细胞骨形成而参与骨质修复和重构<sup>[5]</sup>,通过促进骨骼肌中蛋白质合成增加肌肉含量而参与肌肉代谢过程<sup>[6]</sup>。n-3 脂肪酸是哺乳动物体内无法合成的必需营养素,可调节机体免疫功能<sup>[7]</sup>,通过激活细

胞内脂肪酸受体、修饰细胞膜脂筏结构抑制NF-κB通路,减少趋化因子和炎性因子分泌,减轻炎性反应和肌肉蛋白质降解,延缓肌肉衰减进程<sup>[8-9]</sup>。本研究旨在探讨血清硬骨素和n-3脂肪酸在老年肌少症患者中的表达水平及临床意义,报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2021年5月—2023年5月新疆医科大学第五附属医院老年病科收治的老年肌少症患者118例为研究对象(病例组),均符合《肌少症诊断和治疗专家共识》<sup>[10]</sup>。病例组:肌少症前期39例,肌少症期46例,重度肌少症期33例。于同期选取健康体检者60例为健康对照组。病例组患者年龄大于健康对照组( $P < 0.01$ ),BMI小于健康对照组( $P <$

0.01), 2 组其他临床资料比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。本研究得到医院伦理委员会批准 (2020-S125-06), 入选者或家属知情同意并签署知情同意书。

表 1 健康对照组与病例组临床资料比较

**Tab. 1** Comparison of clinical data between healthy control group and case group

项 目	健康对照组 (n=60)	病例组 (n=118)	t/χ <sup>2</sup> 值	P 值
性别[例(%)]	男 34(56.67) 女 26(43.33)	73(61.86) 45(38.14)	0.449	0.503
年龄(岁)	73.51 ± 7.08	78.29 ± 7.53	4.089	<0.001
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	22.02 ± 1.64	20.34 ± 1.30	7.456	<0.001
高血压史[例(%)]	7(11.67)	26(22.03)	2.831	0.093
糖尿病史[例(%)]	6(10.00)	20(16.95)	1.540	0.215
收缩压(mmHg)	132.34 ± 14.75	136.29 ± 15.80	1.617	0.109
舒张压(mmHg)	83.49 ± 8.86	85.73 ± 9.22	1.556	0.123
FPG(mmol/L)	6.21 ± 0.32	6.25 ± 0.34	0.761	0.450
TC(mmol/L)	4.26 ± 0.52	4.37 ± 0.58	1.249	0.218
TG(mmol/L)	1.67 ± 0.38	1.62 ± 0.35	0.886	0.383
HDL-C(mmol/L)	1.23 ± 0.15	1.20 ± 0.16	1.214	0.229
LDL-C(mmol/L)	2.22 ± 0.41	2.28 ± 0.45	0.879	0.388

1.2 病例选择标准 (1)纳入标准:①年龄≥60岁;②能配合相关检查、完成步速和握力测试。(2)排除标准:①心功能不全、肝肾功能障碍者;②先天性重症肌无力者;③代谢性骨病、股骨头坏死或者骨关节炎等骨疾病患者;④肢体创伤或有四肢手术史者;⑤急、慢性炎性反应性疾病和自身免疫性疾病患者;⑥无法独立行走及偏瘫患者;⑦恶性肿瘤及精神疾病患者;⑧其他研究者认为需要排除的患者。

### 1.3 观测指标与方法

1.3.1 血清硬骨素和 n-3 脂肪酸检测:患者于入院次日清晨治疗前/健康对照组体检时采取其空腹肘静脉血 5 ml, 离心留取血清, 置于 -80°C 冰箱中待测。以酶联免疫吸附法检测血清硬骨素(试剂盒购自于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号:E-EL-H1544), 气相色谱法检测 n-3 脂肪酸(安捷伦科技有限公司, 仪器型号:Agilent 8890)。

1.3.2 体脂百分比、上臂围、内脏脂肪面积、蛋白质质量检测:采用生物电阻抗分析法测量病例组患者体脂百分比、上臂围、内脏脂肪面积及蛋白质质量(检测人体成分分析仪, 北京四海华辰科技有限公司, 型号:海康 H-Key350)。患者测量前 2 h 避免进食和剧烈运动, 着轻便衣服赤足, 按照足形电极的形状踩在电极上, 检测过程中不能说话、移动, 测量结束后导出数据

获得相关指标。

1.3.3 步速、握力、肌质量及肌质量指数检测:6M 步行法测量步速, 测量 3 次取其中步速最快的一次;Jamar 握力计(上海瑞狮生物科技有限公司, 仪器型号:5030J1)测量双手握力, 取最大握力值;双能 X 线吸收仪(徐州品源电子科技有限公司, 仪器型号:DXA-800)测量全身及四肢骨骼肌质量, 相对四肢骨骼肌质量指数(relative skeletal muscle mass index, RSMI)=四肢骨骼肌质量(kg)/身高(m)<sup>2</sup>。

1.4 统计学方法 采用 SAS 9.4 软件对数据分析统计。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, 多组比较用单因素方差分析, 多重比较用 Dunnett-t 检验; 计数资料以频数或率(%)描述, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; Spearman 秩相关分析两指标与病情严重程度的关系, Pearson 积矩相关分析其与体脂百分比、上臂围、内脏脂肪面积、蛋白质质量、步速、握力、骨骼肌质量、RSMI 的相关性; Logistic 回归分析老年肌少症影响因素; 受试者工作特征(ROC)曲线评估血清硬骨素和 n-3 脂肪酸对老年肌少症诊断价值, 指标间 AUC 比较用 Z 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 2 组血清硬骨素和 n-3 脂肪酸比较 病例组患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平低于健康对照组( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 健康对照组和病例组血清硬骨素、n-3 脂肪酸比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 2** Comparison of serum levels of osteocalcin and n-3 fatty acids between the healthy control group and the case group

组 别	例数	硬骨素(pmol/L)	n-3 脂肪酸(g/L)
健康对照组	60	39.56 ± 6.58	0.23 ± 0.04
病例组	118	27.35 ± 5.34	0.16 ± 0.03
<i>t</i> 值		13.342	13.116
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 不同病情程度老年肌少症患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平比较 血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平比较, 肌少症前期 > 肌少症期 > 重度肌少症期( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 3。经 Spearman 秩相关分析, 血清硬骨素、n-3 脂肪酸与病情程度呈负相关( $r_s = -0.627, -0.611, P < 0.001$ )。

2.3 2 组临床/病理特征比较 病例组患者体脂百分比、内脏脂肪面积大于健康对照组, 上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI 水平低于健康对照组( $P$  均  $< 0.01$ ), 见表 4。

表 3 不同病情程度老年肌少症患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 3** Comparison of serum levels of osteocalcin and n-3 fatty acids in elderly patients with different degrees of sarcopenia

病情程度	例数	硬骨素 (pmol/L)	n-3 脂肪酸 (g/L)
肌少症前期	39	33.51 ± 4.79	0.21 ± 0.04
肌少症期	46	25.83 ± 4.58	0.16 ± 0.03
重度肌少症期	33	22.19 ± 4.26	0.11 ± 0.03
F 值		59.138	79.217
P 值		<0.001	<0.001

表 4 健康对照组和病例组临床/病理特征比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Tab. 4** Comparison of clinical/pathological characteristics between healthy control group and case group

项目	健康对照组 (n=60)	病例组 (n=118)	t/χ <sup>2</sup> 值	P 值
体脂百分比( $\bar{x} \pm s$ , %)	27.39 ± 4.11	33.68 ± 4.75	8.732	<0.001
上臂围( $\bar{x} \pm s$ , cm)	31.34 ± 5.61	28.04 ± 5.29	3.859	<0.001
内脏脂肪面积( $\bar{x} \pm s$ , cm <sup>2</sup> )	93.25 ± 16.90	107.92 ± 18.64	5.124	<0.001
蛋白质质量( $\bar{x} \pm s$ , kg)	9.37 ± 1.58	7.46 ± 1.34	8.459	<0.001
步速( $\bar{x} \pm s$ , m/s)	0.98 ± 0.33	0.72 ± 0.26	5.758	<0.001
握力( $\bar{x} \pm s$ , kg)	32.81 ± 5.67	22.39 ± 5.04	12.492	<0.001
全身骨骼肌质量( $\bar{x} \pm s$ , kg)	46.22 ± 7.30	38.83 ± 6.31	7.006	<0.001
四肢骨骼肌质量( $\bar{x} \pm s$ , kg)	21.09 ± 3.93	15.28 ± 3.34	10.334	<0.001
RSMI( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	6.95 ± 1.39	4.67 ± 1.12	11.813	<0.001

2.4 血清硬骨素、n-3 脂肪酸与老年肌少症相关指标的相关性 经 Pearson 积矩相关分析,老年肌少症患者血清硬骨素、n-3 脂肪酸与体脂百分比、内脏脂肪面积呈负相关( $P < 0.01$ ),与上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI 呈正相关( $P < 0.01$ ),见表 5。

表 5 血清硬骨素、n-3 脂肪酸与老年肌少症相关指标的相关性

**Tab. 5** Correlation between serum osteocalcin, n-3 fatty acids, and indicators related to sarcopenia in the elderly

指标	硬骨素		n-3 脂肪酸	
	r 值	P 值	r 值	P 值
体脂百分比	-0.537	<0.001	-0.498	<0.001
上臂围	0.593	<0.001	0.569	<0.001
内脏脂肪面积	-0.612	<0.001	-0.523	<0.001
蛋白质质量	0.624	<0.001	0.611	<0.001
步速	0.639	<0.001	0.570	<0.001
握力	0.597	<0.001	0.592	<0.001
全身骨骼肌质量	0.601	<0.001	0.549	<0.001
四肢骨骼肌质量	0.607	<0.001	0.534	<0.001
RSMI	0.638	<0.001	0.587	<0.001

2.5 老年肌少症的影响多因素 Logistic 回归模型分析

以是否为老年肌少症为因变量(1 = 是,0 = 无),以上述结果中有统计学意义( $P < 0.05$ )的项目为自变量构建多因素 Logistic 回归模型,自变量均以连续性变量形式纳入模型。结果显示:年龄、体脂百分比、内脏脂肪面积升高是老年肌少症危险因素( $P < 0.01$ ),BMI、上臂围、蛋白质质量、步速、握力、全身骨骼肌质量、四肢骨骼肌质量、RSMI、硬骨素、n-3 脂肪酸升高是老年肌少症的保护因素( $P < 0.01$ ),见表 6。

表 6 老年肌少症的影响多因素 Logistic 回归模型分析

**Tab. 6** Multivariate logistic regression model analysis of the impact of sarcopenia in the elderly

项目	$\beta$ 值	SE 值	Wald 值	P 值	OR 值	95% CI
年龄	0.532	0.216	6.064	0.001	1.702	1.115 ~ 2.600
BMI	-0.318	0.153	4.320	0.005	0.728	0.539 ~ 0.982
体脂百分比	0.439	0.198	4.916	0.003	1.551	1.052 ~ 2.287
上臂围	-0.264	0.132	4.000	0.006	0.768	0.593 ~ 0.995
内脏脂肪面积	0.327	0.164	3.976	0.009	1.387	1.006 ~ 1.913
蛋白质质量	-0.169	0.079	4.583	0.004	0.845	0.723 ~ 0.986
步速	-0.204	0.101	4.002	0.006	0.815	0.668 ~ 0.995
握力	-0.536	0.218	6.045	0.001	0.585	0.382 ~ 0.897
全身骨骼肌质量	-0.293	0.134	4.781	0.004	0.746	0.573 ~ 0.972
四肢骨骼肌质量	-0.311	0.139	5.007	0.001	0.733	0.559 ~ 0.964
RSMI	-0.338	0.141	5.746	0.001	0.713	0.541 ~ 0.940
硬骨素	-0.196	0.086	5.194	0.001	0.822	0.695 ~ 0.973
n-3 脂肪酸	-0.220	0.097	5.146	0.001	0.803	0.664 ~ 0.971

2.6 血清硬骨素、n-3 脂肪酸诊断老年肌少症的价值

绘制血清硬骨素、n-3 脂肪酸诊断老年肌少症的价值 ROC 曲线,并计算曲线下面积,结果显示:血清硬骨素、n-3 脂肪酸及二者联合诊断老年肌少症的 AUC 分别为 0.822、0.818、0.894,二者联合诊断老年肌少症的 AUC 大于其各自单独诊断的 AUC ( $Z = 2.205$ 、 $2.328$ ,  $P = 0.002$ ,  $0.001$ ),见表 7、见图 1。

表 7 血清硬骨素、n-3 脂肪酸对老年肌少症的诊断价值

**Tab. 7** Diagnostic value of serum osteocalcin and n-3 fatty acids for sarcopenia in the elderly

指标	截断值	AUC	标准误	敏感度	特异度	约登指数
硬骨素	32.19 pmol/L	0.822	0.025	0.83	0.60	0.43
n-3 脂肪酸	0.19 g/L	0.818	0.025	0.80	0.67	0.47
二者联合		0.894	0.021	0.92	0.74	0.66

### 3 讨论

老年人随着年龄的增长,骨骼肌肌肉质量不断减少,肌肉力量下降且肌肉功能减退,是肌少症高危人群,我国社区居民肌少症发生率 8.9% ~ 38.8%,≥80 岁老人人群中发生率高达 67.1%<sup>[11]</sup>。肌少症可引起

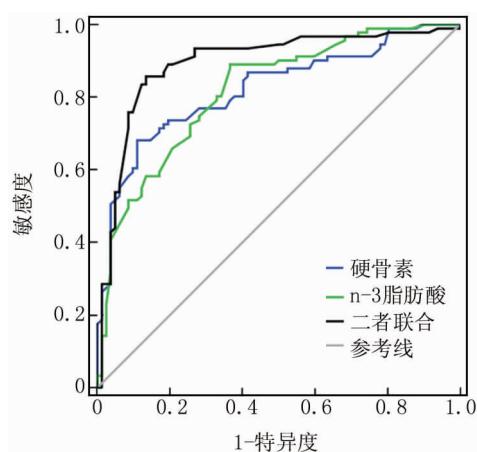


图 1 血清硬骨素、n-3 脂肪酸诊断老年肌少症的 ROC 曲线  
Fig. 1 ROC curve of serum osteocalcin and n-3 fatty acids for diagnosing sarcopenia in elderly patients

老年患者认知功能障碍,增加跌倒、骨折、残疾、住院和全因死亡发生风险<sup>[12]</sup>。我国已进入人口老龄化社会,65 岁以上人口比例高达 13.5%,可见,我国肌少症高危人群基数庞大且疾病负担非常重,老年肌少症很可能在未来成为更严重的公共卫生问题。老年肌少症发病机制复杂,尚无有效治愈手段,及早诊断并针对性干预有望延缓病情进展,降低不良结局发生风险。通过生物电阻抗法、计算机断层扫描及磁共振成像可诊断肌少症,但上述操作有辐射且成本高,临床推广难度大,一些肌少症筛查工具可快速筛查患者,但准确性不一,各量表适用人群也有一定差异,常给医务人员造成困扰<sup>[13-14]</sup>。血液学指标具有获取简便、结果客观、检查费用低等优点,寻找敏感度高且特异度好的血液标志物辅助临床诊断肌少症具有潜在应用价值。

硬骨素是一种糖蛋白,编码基因位于人第 17 号染色体,具有 C-末端半胱氨酸结构域,主要由成骨细胞分泌,广泛表达于软骨、骨、心脏及肝脏等组织器官中。硬骨素通过骨小管到达成骨细胞表面后与 Wnt/β-catenin 信号通路下游受体 LRP5/6 结合,负向调控 Wnt 信号传导通路以抑制成骨细胞形成<sup>[15]</sup>。吴晓惠等<sup>[16]</sup>发现,硬骨素通过介导骨质破坏、骨修复重构及骨吸收等骨代谢过程参与骨关节炎发生、发展。研究显示<sup>[17]</sup>,肌肉和骨骼都属于内分泌器官,两者分泌的肌促蛋白和骨促蛋白通过内分泌、自分泌和旁分泌机制参与调控肌肉和骨骼形成。Ahn 等<sup>[18]</sup>发现,肌肉和骨骼之间可能通过硬骨素产生联系,骨细胞可刺激肌肉生成和收缩,骨细胞分泌的硬骨素可能会促进肌肉合成,增加肌肉含量。本研究发现老年肌少症患者血清硬骨素水平下调,提示硬骨素参与了肌少症发病过

程。可能的机制是硬骨素促进骨骼肌中蛋白质合成而增加肌肉质量<sup>[19]</sup>,通过促进细胞增殖和修复有利于肌肉组织生长和恢复,当其水平降低时可能会影响肌肉细胞功能和修复能力,从而导致肌少症<sup>[20]</sup>;既往研究还显示<sup>[21]</sup>,硬骨素具有抗氧化作用,可减少氧自由基产生而减轻细胞损伤,有助于保护骨骼肌免受炎性反应和老化影响。

n-3 脂肪酸是人类必需的脂肪酸,主要来源于富含脂肪的鱼类及营养补充剂。n-3 脂肪酸包括 α-亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA) 和二十二碳六烯酸(DHA) 等,ALA 通过食用亚麻等植物可补充,EPA 和 DHA 通过鱼油及鱼肉等食物可补充。研究显示<sup>[22]</sup>,n-3 脂肪酸具有抗炎功能,可改善血管功能和抗动脉粥样硬化,n-3 脂肪酸增加可降低冠心病发病风险,减少心源性死亡发生风险,预防心血管疾病诱发的心理疾病。一份科学声明提到<sup>[23]</sup>,对于左心室功能减退的心力衰竭患者,推荐膳食补充 n-3 脂肪酸。n-3 脂肪酸还可调节免疫功能,减缓老年人肌肉衰减进程,临床研究表明<sup>[24]</sup>,通过补充 n-3 脂肪酸补充剂可增加大腿肌肉体积,改善肌肉力量和功能。本研究发现,n-3 脂肪酸可能参与了老年肌少症发病过程。可能是因为免疫系统失衡导致的慢性炎性反应以及促炎因子如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 增加导致老年人肌肉萎缩,而 n-3 脂肪酸具有抗炎特性,可一定程度缓解炎性反应<sup>[25]</sup>;此外,mTOR 信号通路是介导骨骼肌生成的关键合成代谢因子,n-3 脂肪酸可激活 mTOR 信号通路提高肌肉蛋白质合成率<sup>[26]</sup>;卫星细胞主要负责肌肉受到损伤性刺激后再生,n-3 脂肪酸通过激活卫星细胞可维持肌肉健康<sup>[27]</sup>;n-3 脂肪酸还可改善神经肌肉接头的传导性和肌肉收缩活动,从而增强肌肉力量和提高肌肉功能。

研究还发现,硬骨素、n-3 脂肪酸与肌少症病情呈负相关,提示临床通过检测两指标水平可评估肌少症病情严重程度,从而指导临床诊疗实践。肌少症主要表现为肌肉质量下降及肌肉力量和功能减退,本研究发现,血清硬骨素和 n-3 脂肪酸与步速、握力等反映肌肉质量、力量和功能的相关指标密切相关,该结果进一步证实两指标参与了肌少症病情的发展过程。而通过靶向改善硬骨素水平或补充 n-3 脂肪酸有望增加肌少症患者骨骼肌肌肉质量,以改善肌肉力量和功能。本研究还发现血清硬骨素和 n-3 脂肪酸可辅助临床诊断老年肌少症,且指标联合可提高诊断效能。结果表明,早期检测血清硬骨素和 n-3 脂肪酸可辅助临床早期诊断肌少症,尤其是联合检测,诊断价值更高。

综上所述,老年肌少症患者血清硬骨素和 n-3 脂肪酸水平降低,并与病情严重性密切相关,联合检测可辅助临床早期诊断肌少症,为制定针对性诊疗方案提供参考。本研究初步发现血清硬骨素和 n-3 脂肪酸参与了肌少症发病过程,但是其机制有待进一步证实,后续将开展高质量的多中心、随机对照试验进一步证实补充硬骨素和 n-3 脂肪酸对改善肌少症病情的有效性。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

王枚:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;张晓阳:分析试验数据,论文审核;张玉婷:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;杨越:实施研究过程,资料搜集整理;侯静雯:进行统计学分析

## 参考文献

- [1] Sayer AA, Cruz-Jentoft A. Sarcopenia definition, diagnosis and treatment: Consensus is growing [J]. Age Ageing, 2022, 51 (10) : afac220. DOI:10.1093/ageing/afac220.
- [2] Lin YC, Lu YC, Chen FP, et al. Selecting appropriate sarcopenia screening methods for Asian populations [J]. J Clin Med, 2020, 9 (8) : 2333. DOI: 10.3390/jcm9082333.
- [3] 于普林,高超,周白瑜,等.预防老年人肌少症核心信息中国专家共识(2021)[J].中华老年医学杂志,2021,40 (8) : 953-954. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.08.002.
- [4] 陈海青,贾星玲,陈静,等.社区老年人肌少症临床预测模型的研究进展[J].护理研究,2023,37(24):4436-4439. DOI:10.12102/j.issn.1009-6493.2023.24.014.
- [5] Miura A, Yukata K, Seki T, et al. Effects of sclerostin antibody on bone healing[J]. World J Orthop, 2021, 12 (9) : 651-659. DOI:10.5312/wjo.v12.i9.651.
- [6] Kim JA, Roh E, Hong SH, et al. Association of serum sclerostin levels with low skeletal muscle mass: The Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS) [J]. Bone, 2019, 128: 115053. DOI: 10.1016/j.bone.2019.115053.
- [7] Acharya P, Uppin V, Zarei M, et al. Role of n-3 fatty acids on bile acid metabolism and transport in dyslipidemia: A review [J]. Lipids, 2021, 56 (2) : 125-139. DOI:10.1002/lipd.12289.
- [8] Troesch B, Eggersdorfer M, Laviano A, et al. Expert opinion on benefits of long-chain omega-3 fatty acids (DHA and EPA) in aging and clinical nutrition [J]. Nutrients, 2020, 2 (9) : 2555. DOI: 10.3390/nu12092555.
- [9] 沈云海,付明生,刘秀平,等. n-3 多不饱和脂肪酸对大鼠酒精性脂肪肝炎性反应及肝纤维化的影响[J]. 疑难病杂志,2020,19 (2) : 180-183, 189. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450. 2020. 02.016.
- [10] Chen LK, Woo J, Assantachai P, et al. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment [J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21 (3) : 300-307. e2. DOI:10.1016/j.jamda.2019.12.012.
- [11] 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.
- [12] Lu JL, Ding LY, Xu Q, et al. Screening accuracy of SARC-F for sarcopenia in the elderly: a diagnostic meta-analysis [J]. J Nutr Health Aging, 2021, 25 (2) : 172-182. DOI:10.1007/s12603-020-1471-8.
- [13] Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis [J]. Age Ageing, 2019, 48 (1) : 16-31. DOI:10.1093/ageing/afy169.
- [14] 陈海青,贾星玲,陈静,等.社区老年人肌少症临床预测模型的研究进展[J].护理研究,2023,37(24):4436-4439. DOI:10.12102/j.issn.1009-6493.2023.24.014.
- [15] 李嘉,刘晓燕,彭慧云,等.血清硬骨素在维生素 D 缺乏性佝偻病诊断中的检测意义[J].中国实验诊断学,2021,25(3):411-413. DOI:10.3969/j.issn.1007-4287.2021.03.033.
- [16] 吴晓惠,王翠平,李敏,等.伴骨髓水肿的老年膝骨关节炎与护骨因子、dickkopf-1、硬骨素的相关性研究[J].华西医学,2021,36 (11) : 1545-1549. DOI:10.7507/1002-0179.201910036.
- [17] Fagundes Belchior G, Kirk B, Pereira da Silva EA, et al. Osteosarcopenia: Beyond age-related muscle and bone loss [J]. Eur Geriatr Med, 2020, 11 (5) : 715-724. DOI:10.1007/s41999-020-00355-6.
- [18] Ahn SH, Jung HW, Lee E, et al. Decreased serum level of sclerostin in older adults with sarcopenia [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2022, 37 (3) : 487-496. DOI:10.3803/EnM.2022.1428.
- [19] Li G, Zhang L, Wang D, et al. Muscle-bone crosstalk and potential therapies for sarco-osteoporosis [J]. J Cell Biochem, 2019, 120 (9) : 14262-14273. DOI:10.1002/jcb.28946.
- [20] Lara-Castillo N, Johnson ML. Bone-muscle mutual interactions [J]. Curr Osteoporos Rep, 2020, 18 (4) : 408-421. DOI: 10.1007/s11914-020-00602-6.
- [21] Moretti A, Iolascon G. Sclerostin: clinical insights in muscle-bone crosstalk [J]. J Int Med Res, 2023, 51 (8) : 3000605231193293. DOI:10.1177/03000605231193293.
- [22] 张志远,李烽,钱玲玲,等. n-3 多不饱和脂肪酸对室性心律失常发生的影响及其机制[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2023,37(1):60-63. DOI:10.13333/j.cnki.cjpe.2023.01.012.
- [23] Siscovick DS, Barringer TA, Fretts AM, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease: a science advisory from the american heart association [J]. Circulation, 2017, 135 (15) : e867-e884. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000482.
- [24] 郭惠兰,陆彦好,黄晓旭,等. n-3 多不饱和脂肪酸对老年人肌肉衰减影响的研究进展[J].营养学报,2021,43(3):302-306. DOI: 10.3969/j.issn.0512-7955.2021.03.018.
- [25] Jang IY, Jung HW, Park JH, et al. Lower serum n-3 fatty acid level in older adults with sarcopenia [J]. Nutrients, 2020, 12 (10) : 2959. DOI:10.3390/nu12102959.
- [26] Oh H, Park SY, Cho W, et al. Sclerostin aggravates insulin signaling in skeletal muscle and hepatic steatosis via upregulation of ER stress by mTOR-mediated inhibition of autophagy under hyperlipidemic conditions [J]. J Cell Physiol, 2022, 237 (11) : 4226-4237. DOI:10.1002/jcp.30873.
- [27] Tachtsis B, Camera D, Lacham-Kaplan O. Potential roles of n-3 PUFA s during skeletal muscle growth and regeneration [J]. Nutrients, 2018, 10 (3) : 309. DOI:10.3390/nu10030309.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 016

论著 · 临床

# 基于生物信息学构建绝经后子宫内膜癌患者生存预后模型及验证

安沛兴, 马晓红, 张玲, 崔俊芬, 单莉, 颜红丽



基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-572)

作者单位: 710061 西安, 西北妇女儿童医院计划生育科(安沛兴、马晓红), 妇产科(张玲、单莉、颜红丽); 719300 陕西神木, 神木市医院/西北大学附属神木医院产科(崔俊芬)

通信作者: 崔俊芬, E-mail: cjfl19890928@126.com

**【摘要】 目的** 通过构建临床预测模型探究在绝经后子宫内膜癌(EC)患者中发挥关键作用的基因并进行验证, 评价其在预测 EC 患者生存预后中的应用价值。**方法** 选取 2022 年 1 月—2023 年 10 月在西北妇女儿童医院妇产科就诊的 EC 患者 45 例, 通过手术获得 EC 患者癌组织及癌旁正常组织。从基因表达综合数据库(GEO)和癌症基因组图谱(TCGA)数据库中下载 EC 样本及正常组织样本的转录组数据, 通过加权基因共表达网络分析(WGCNA)确定与 EC 患者绝经后状态相关的重要基因模块和中心基因, 并利用 GO 和 KEGG 富集重叠基因所涉及的信号通路。通过在线工具(STRING)分析蛋白质相互作用关系, 并在 Cytoscape 软件中进行可视化, 利用 Degree 算法评价每个节点的重要性, 选取排名前 5 位的节点。构建 Logistic 回归模型和受试者工作特征(ROC)曲线, 分析关键基因在预测 EC 患者生存情况中的作用。利用免疫印迹法和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证关键基因在绝经后 EC 患者组织中的表达。**结果** WGCNA 分析发现, 在 GSE17025 数据集中共识别出 17 个模块, “红色”模块与 EC 呈高度正相关( $r = 0.650, P < 0.001$ ), 包括 1 019 个基因。在 TCGA\_UCEC 中共鉴定出 5 个模块, 其中“蓝色”模块与 EC 呈高度正相关( $r = 0.380, P < 0.001$ ), 包括 336 个基因。其中有 195 个基因重叠, 重叠基因主要与细胞周期、能量代谢等有关。通过 STRING 数据库对 KEGG 富集的前 10 位通路中 126 个基因进行蛋白质相互作用分析, 并基于 Degree 算法将 PKD1、ACTB、SRC、CDH1 和 COL1A1 作为潜在的核心基因。通过构建 Logistic 回归, 筛选出 PKD1( $OR = 2.930, P = 0.047$ )、SRC( $OR = 0.656, P = 0.041$ ) 和 CDH1( $OR = 0.612, P = 0.023$ ) 均可有效预测 EC 患者生存情况。绘制 ROC 曲线, 发现在 PKD1、SRC 和 CDH1 中, PKD1 对预测 EC 的生存情况具有较好的诊断价值( $AUC = 0.634, 95\% CI 0.540 \sim 0.727, P = 0.006$ )。**结论** PKD1 可作为影响绝经后 EC 患者预后生存情况的关键基因, 其机制可能是通过调控细胞周期或 PI3K-Akt 信号通路发挥作用。

**【关键词】** 子宫内膜癌, 绝经后; 蛋白激酶 D1; 生物信息学; 加权基因共表达网络分析; 预后生存

**【中图分类号】** R737.14

**【文献标识码】** A

**Construction and validation of PKD1 involved survival prognosis model of postmenopausal endometrial cancer patients** An Peixing\*, Ma Xiaohong, Zhang Ling, Cui Junfen, Shan Li, Yan Hongli. \* Department of Family Planning, Northwest Women and Children's Hospital, Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

**Funding program:** Key R&D Program Project in Shaanxi Province (2023-YBSF-572)

**Corresponding author:** Cui Junfen, E-mail: cjfl19890928@126.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the key genes in postmenopausal endometrial cancer (EC) patients by constructing and validating a clinical prediction model, and to discuss its role in predicting the survival prognosis of EC patients. **Methods** A total of 45 patients with EC in the Department of Obstetrics and Gynecology of Hospital from January 2022 to October 2023 were selected. Tumor tissues and adjacent normal tissues of EC patients were obtained by surgery. The transcriptome data of EC samples and normal tissue samples were downloaded from GEO data and the Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The important gene modules and hub genes related to postmenopausal status of EC patients were determined by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA), and the signaling pathways involved in overlapping genes were enriched by GO and KEGG. The protein interaction was analyzed by the online tool (STRING) and visualized in

Cytoscape software. The importance of each node was evaluated by the Degree algorithm in the CytoHubba plug in, and the top five nodes were selected. The Logistic regression model and ROC curve were constructed to analyze the role of key genes in predicting the survival of EC patients. Finally, Western blotting and real-time fluorescence quantitative PCR (RT qPCR) were used to verify the expression of key genes in postmenopausal EC tissues. **Results** WGCNA analysis of genes obtained by sequencing in GSE17025 dataset and TCGA\_UCEC transcriptome samples identified 17 modules in GSE17025 dataset. The "red" module was highly positively correlated with EC ( $r=0.650, P<0.001$ ). 1 019 genes were included. A total of 5 modules were identified in TCGA\_UCEC, of which the "blue" module was highly positively correlated with EC ( $r=0.380, P<0.001$ ), including 336 genes. GO and KEGG enrichment analysis were performed on overlapping genes. Protein interaction analysis was performed on 126 genes in the top ten KEGG enriched pathways through STRING database. PKD1, ACTB, SRC, CDH1 and COL1A1 were selected as potential core genes based on Degree algorithm. By constructing logistic regression, PKD1 ( $OR=2.930, P=0.047$ ), SRC ( $OR=0.656, P=0.041$ ) and CDH1 ( $OR=0.612, P=0.023$ ) could effectively predict the survival of EC patients. The ROC curve showed that among PKD1, SRC and CDH1, PKD1 had a better diagnostic value for predicting the survival of EC ( $AUC=0.634, 95\% CI=0.540-0.727, P=0.006$ ). The results of Western blot and RT qPCR showed that PKD1 protein and RNA levels in cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues (protein:  $3.17 \pm 1.09$  vs.  $0.98 \pm 0.36, t=10.090, P<0.001$ ; RNA:  $2.15 \pm 0.84$  vs.  $0.99 \pm 0.31, t=11.257, P<0.001$ ). **Conclusion** PKD1 may be a key gene affecting the prognosis and survival of postmenopausal EC patients by regulating the cell cycle or PI3K Akt signaling pathway. It provides a basis for further exploring the molecular mechanism of PKD1 in EC, which has important scientific value and significance.

**[Key words]** Endometrial cancer, postmenopausal; Protein kinase D1; Bioinformatics; Weighted gene co-expression network analysis; Prognosis

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是女性常见的恶性疾病,在全球范围内发病率和病死率均呈上升趋势,可能与肥胖、糖尿病、高血压、衰老、初潮早期和绝经晚期的发病率较高有关<sup>[1]</sup>。子宫内膜癌来源于雌激素相关的增生性子宫内膜(I型,子宫内膜样癌)或萎缩性子宫内膜(II型,非子宫内膜样癌)<sup>[2]</sup>。然而,大多数子宫内膜癌患者为60~70岁的绝经后女性,56%的I型EC女性是在绝经后被诊断的,表明雌激素不是I型EC患者的决定性因素<sup>[3]</sup>。因此,迫切需要研究绝经后I型子宫内膜癌的发病机制,并寻找新的分子生物标志物来预测其预后。

随着高通量测序技术的发展,基因表达谱已被广泛用于识别与子宫内膜癌进展相关的基因。然而,这些研究主要关注差异表达基因(differential expression gene, DEG),没有考虑这些基因之间的相互作用,其中具有相似表达模式的基因可能在功能上相关。仅仅在正常组织和癌症样本之间选择DEG是有局限性的,应该更加关注基因表达和临床特征之间的关联。加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)是一种常用的系统生物学方法,用于描述基因间的相关模式,并寻找高度相关的模块<sup>[4]</sup>。它被广泛用于探究疾病中的关键基因,如胰腺导管腺癌、肾透明细胞癌和乳腺癌<sup>[5]</sup>。本研究旨在寻找绝经后I型子宫内膜癌中新的关键基因,构建生存预后模型并进行验证,以探究其潜在分子机制与临床

价值,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2022年1月—2023年10月在西北妇女儿童医院妇产科就诊的EC患者45例为观察组,年龄45~76( $59.61 \pm 8.15$ )岁,绝经时间1~24( $11.08 \pm 4.52$ )年。纳入标准:①符合EC诊断标准,经组织病理学检查确诊;②初次确诊,入组前未接受化疗、放疗及肿瘤免疫治疗。排除标准:①严重心、肝、肾功能不全者;②合并其他恶性肿瘤者。通过根治性切除术获得EC患者癌组织及癌旁正常组织,组织样本置于液氮中保存。本研究获得医院伦理委员会审批(21-053),患者或家属知情同意并签署知情同意书。

**1.2 数据收集** 从基因表达综合数据库(GEO)和癌症基因组图谱(TCGA)UCEC XENA下载基因表达和临床数据(<https://xenabrowser.net/>),获取和应用方法符合各数据库的指南和政策。数据集GSE17025基于GPL570平台,由Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array处理,纳入的103例样本中包括91例EC患者和12例对照样本。TCGA基因表达水平以每百万次读取的转录本(TPM)衡量,纳入的572例样本中包括537例EC患者和35例对照样本。

**1.3 筛选差异表达基因** 利用R studio软件(4.2.3版)limma软件包分析差异表达基因,使用ggplot软件包绘制火山图,以 $P<0.05$ 和logFC绝对值 $>1.5$ 进行筛选。通过韦恩图筛选共同差异表达基因。利用京都基

因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集差异基因所涉及的信号通路<sup>[6]</sup>。

**1.4 WGCNA 构建与模块识别** 采用 R studio 软件中的 WGCNA 软件包进行分析。分析前使用 R 语言中的 Hclust 函数进行层次聚类分析以排除离群样本。通过模块特征基因(module eigengene, ME)总结各模块的表达谱,并计算 ME 与 EC 的相关性。聚焦与 EC 相关系数高的模块,并选择这些模块中的基因进行后续分析。

**1.5 蛋白质—蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络的建立** 使用在线工具(STRING)分析蛋白质相互作用关系,通过置信评分(>0.40)进行筛选,通过 Cytoscape 软件(V3.9.0 版本)进行可视化<sup>[7]</sup>,利用 CytoHubba 插件中 Degree 算法来评价每个节点的重要性,选取排名前 5 位的节点。

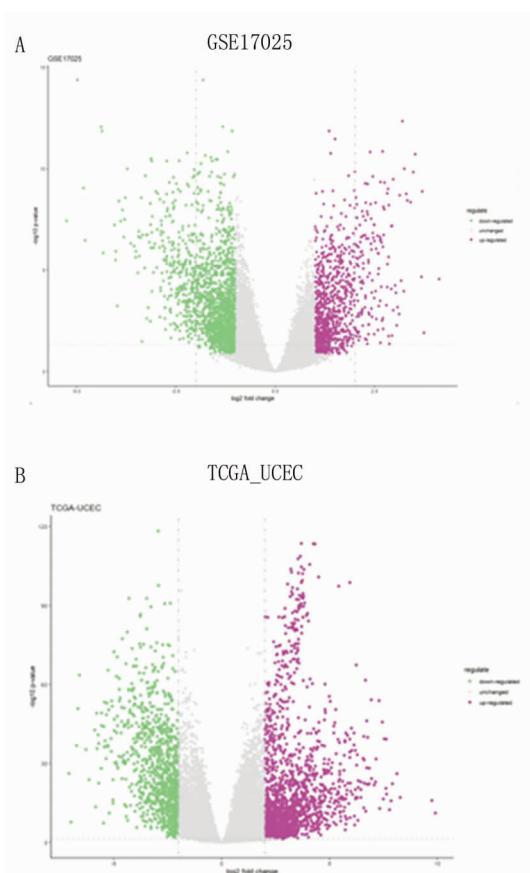
**1.6 Logistic 回归的构建和验证** 构建 Logistic 回归模型,并使用 pROC 软件包进行受试者工作特征(ROC)曲线分析,评估 Logistic 回归模型预测 EC 的生存情况。利用  $P < 0.05$  筛选出核心基因中的有效基因,并使用列线图预测 EC 的生存情况。

**1.7 统计学方法** 使用 R 软件和 GraphPad prism 8.0 进行统计分析和绘图。符合正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用  $t$  检验。所有分析都进行 3 次,并代表 3 个独立实验的数据。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 数据集信息** 分别对 GEO 数据库 GSE17025 数据集和 TCGA 数据库中 EC 患者转录组数据进行分析,并绘制火山图,结果显示,GSE17025 数据集中数据呈正态分布,与对照组健康样本比较,EC 患者组基因表达上调 1 703 个,表达下调 1 016 个,表达没有显著性差异的基因为 18 105 个。TCGA\_UCEC 数据库中基因表达上调 1 586 个,表达下调 960 个,表达没有显著性差异的基因为 16 774 个。

**2.2 WGCNA 构建与模块识别** 分别将 GSE17025 数据集和 TCGA\_UCEC 转录组样本中通过测序获得的基因进行 WGCNA 分析。在 GSE17025 中共识别出 17 个模块,每个颜色代表不同的模块。然后,根据 Spearman 相关系数绘制关于模块—特质关系的热图,以评估每个模块与疾病之间的关联(图 2A、B)。其中“红色”模块与 EC 呈高度正相关( $r = 0.650, P < 0.001$ ),包括 1 019 个基因;在 TCGA\_UCEC 中共鉴定出 5 个模块,其中“蓝色”模块与 EC 呈高度正相关( $r = 0.380, P < 0.001$ ),包括 336 个基因(图 2C、D)。



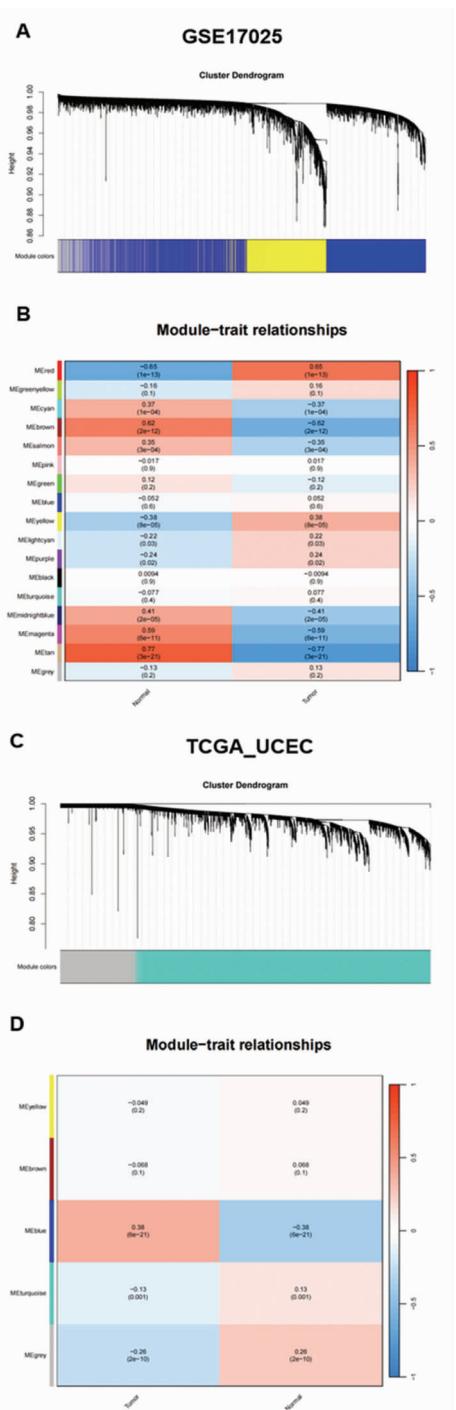
注: down-regulated. 下调; unchanged. 不变; up-regulated. 上调。

**图 1** GSE17025 数据集和 TCGA\_UCEC 相关转录组数据的差异表达基因火山图

**Fig. 1** Volcanic map of differentially expressed genes between the GSE17025 dataset and TCGA-UCEC related transcriptome data

**2.3 对重叠基因进行 GO 和 KEGG 富集分析** GSE17025 数据集“红色”模块和 TCGA\_UCEC 的“蓝色”模块中有 195 个基因重叠,并绘制 195 个基因的热图,以显示其在健康对照组与 EC 组中的表达情况(图 3A、B)。使用 GlueGo 对 195 个基因进行 GO 富集分析,GO-BP 的显著性指标主要与细胞周期相关;GO-MF 富集的通路主要与能量合成分解相关;GO-CC 分析显示,重叠基因显著富集于细胞核、线粒体和染色质(图 3C)。KEGG 分析显示,这些重叠的基因生物学机制与细胞周期、P53 信号通路、能量代谢和细胞黏附分子等密切相关(图 3D)。

**2.4 PPI 网络的建立** 通过 STRING 数据库对 KEGG 富集的前 10 条通路中 126 个基因进行 PPI 分析,并通过 Cytoscape 进行可视化(图 4A)。基于 Degree 算法将 PKD1、ACTB、SRC、CDH1 和 COL1A1 作为潜在的核心基因(图 4B)。

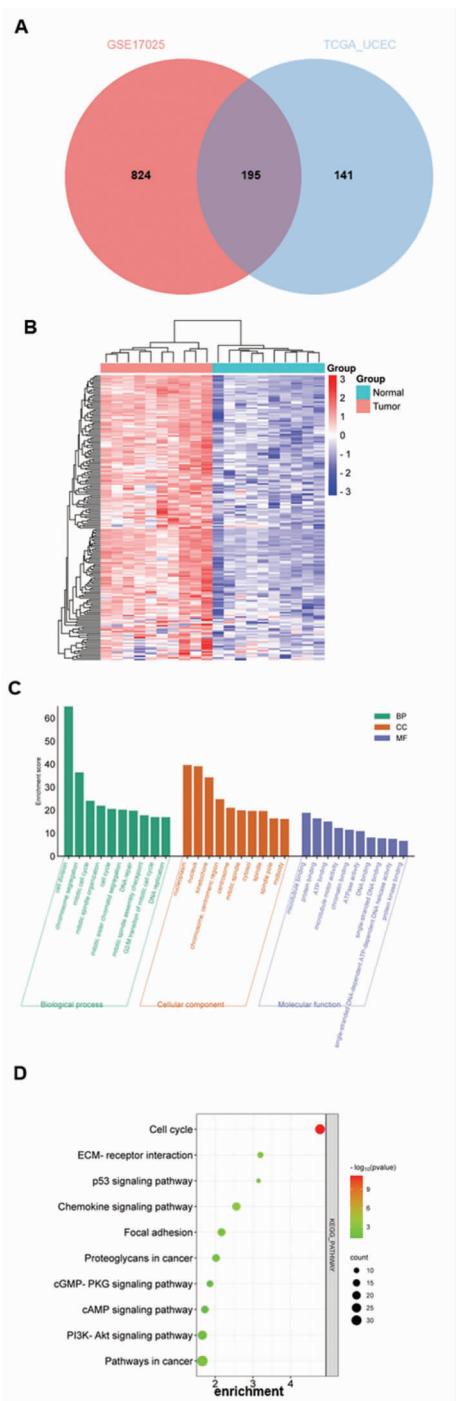


注: A. GSE17025 数据集表达基因的树状图; B. GSE17025 数据集中模块-特质关系(每个单元格包含相应的相关性  $r$  和  $P$  值); C. TCGA\_UCEC 中表达基因的树状图; D. TCGA\_UCEC 中模块-特质关系(每个单元格包含相应的相关性  $r$  和  $P$  值)。

图 2 WGCNA 构建与模块识别

Fig. 2 WGCNA construction and module identification

2.5 Logistic 回归的构建和验证 通过构建 Logistic 回归,筛选出 PKD1、SRC 和 CDH1 可有效预测 EC 患者生存情况,其中 PKD1 是 EC 死亡的危险因素( $OR = 2.930, P = 0.047$ ),而 SRC( $OR = 0.656, P = 0.041$ )和 CDH1( $OR = 0.612, P = 0.023$ )是 EC 死亡的保护因素。使用 ROC 曲线评价 Logistic 回归模型的性能( $PKD1: AUC = 0.634, 95\% CI = 0.540 \sim 0.727, P = 0.001$ ; $SRC: AUC = 0.608, 95\% CI = 0.514 \sim 0.702, P = 0.001$ ; $CDH1: AUC = 0.612, 95\% CI = 0.518 \sim 0.706, P = 0.001$ )。

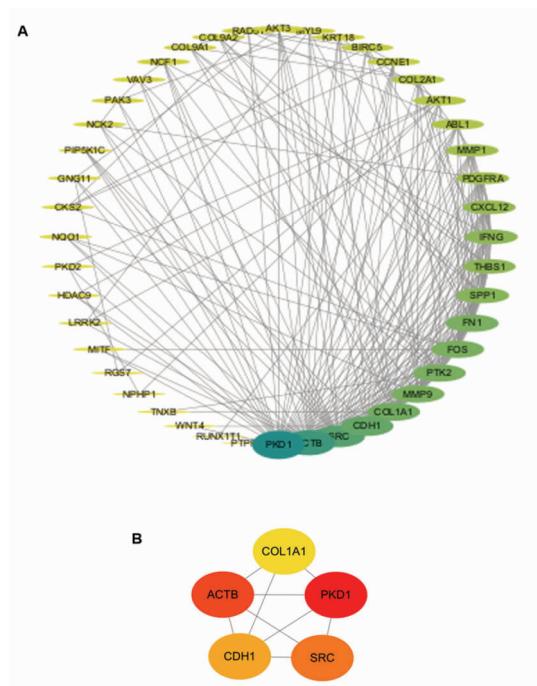


注: A. 韦恩图显示重叠基因; B. 热图显示重叠基因的表达情况(Normal. 正常组织; Tumor. 肿瘤组织); C. D. 对重叠基因进行 GO 和 KEGG 富集分析(BP. 生物过程, CC. 细胞组分, MF. 分子功能)。

图 3 重叠基因的 GO 和 KEGG 富集分析图

Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis of overlapping genes

$2.930, P = 0.047$ ),而 SRC( $OR = 0.656, P = 0.041$ )和 CDH1( $OR = 0.612, P = 0.023$ )是 EC 死亡的保护因素。使用 ROC 曲线评价 Logistic 回归模型的性能( $PKD1: AUC = 0.634, 95\% CI = 0.540 \sim 0.727, P = 0.001$ ; $SRC: AUC = 0.608, 95\% CI = 0.514 \sim 0.702, P = 0.001$ ; $CDH1: AUC = 0.612, 95\% CI = 0.518 \sim 0.706, P = 0.001$ )。



注:A. Cytoscape 软件分析 126 个基因的 PPI 网络(包括 44 个节点和 217 条边,两个节点之间的边表示 PP;根据交互作用程度确定每个基因对应的节点的大小和颜色,颜色梯度代表每个基因从高到低的程度变化); B. 基于 Degree 算法排名前 5 的核心基因。

图 4 PPI 网络的建立

Fig. 4 Establishment of PPI network

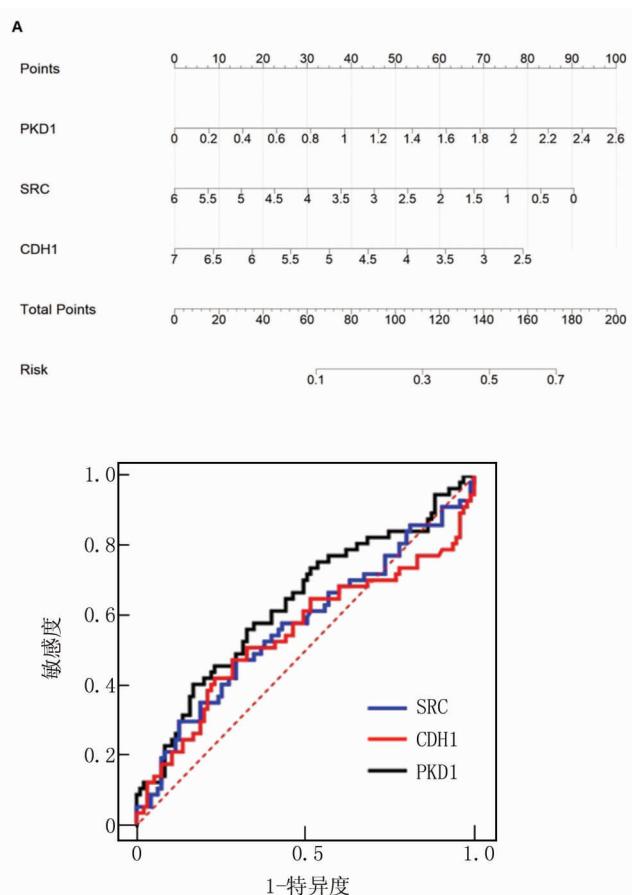
0.006; SRC:  $AUC = 0.547$ , 95% CI = 0.445 ~ 0.649,  $P = 0.031$ ; CDH1:  $AUC = 0.571$ , 95% CI = 0.472 ~ 0.669,  $P = 0.014$ ), 并使用列线图预测 EC 的生存情况(图 5A、B)。

**2.6 PKD1 在 EC 组织中的表达** 采用免疫印迹法和 RT-qPCR 检测 EC 患者癌组织及癌旁组织 PKD1 蛋白和 RNA 的表达水平,结果显示,癌组织中 PKD1 蛋白及 RNA 水平均显著高于癌旁组织 [蛋白: (3.17 ± 1.09) vs. (0.98 ± 0.36),  $t = 10.090$ ,  $P < 0.001$ ; RNA: (2.15 ± 0.84) vs. (0.99 ± 0.31),  $t = 11.257$ ,  $P < 0.001$ ],见图 6。

### 3 讨 论

本研究利用 GEO 和 TCGA 公共数据库,通过 WGCNA 和 Logistic 回归分析筛选出在绝经后 EC 患者中起关键作用的基因模块和关键基因,构建绝经后 EC 患者的预后模型,并利用蛋白电泳和 RT-qPCR 进行验证。

WGCNA 作为一种强有力的工具被应用于多种研究中,识别复杂疾病的相关基因、生物途径和肿瘤治疗靶点,如家族遗传病、阿尔茨海默病和多种癌症<sup>[4, 8]</sup>。

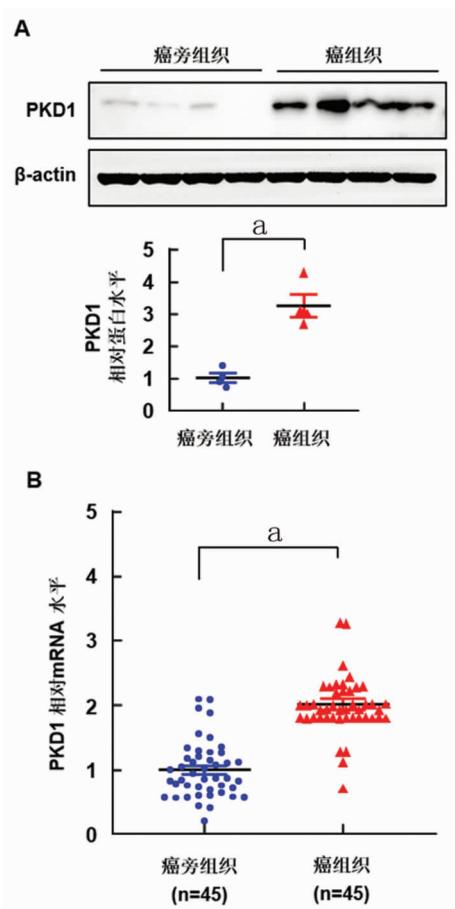


注:A. Logistic 回归分析列线图;B. PKD1、SRC 和 CDH1 预测 EC 患者生存预后的 ROC 曲线。

图 5 Logistic 回归的构建和验证

Fig. 5 Construction and validation of Logistic regression

本研究通过对 GSE17025 数据集和 TCGA\_UCEC 转录组样本中测序获得的基因进行 WGCNA 分析,发现“红色”模块和“蓝色”模块是绝经后 EC 患者的关键基因模块,并发现了 195 个重叠基因,这些基因在 EC 中多数表达升高。进一步的 GO/KEGG 分析表明这 195 个基因的生物学机制与“细胞周期”“P53 信号通路”和“细胞黏附分子”密切相关。细胞周期与肿瘤细胞的生长和增殖密切相关,基因可以通过调控细胞周期来改变肿瘤的进程,从而达到靶向治疗的目的。Shyam 等<sup>[9]</sup>发现,中心色素诱导人 EC 细胞的细胞周期停滞;Qiu 等<sup>[10]</sup>发现 JQ1 通过介导 EC 中的 PTEN/PI3K/AKT 轴抑制肿瘤生长;另有研究发现,卡非佐米可诱导 EC 的 G2/M 细胞周期阻滞<sup>[11-14]</sup>。而 p53 作为一种重要的肿瘤抑制因子,影响多个关键的生物学过程,包括凋亡、细胞周期阻滞和 DNA 修复。超过 60% 的 EC 患者发生 TP53 突变;突变的 p53 蛋白不仅会丧失肿瘤抑制功能,还可致癌<sup>[15-18]</sup>。黏附蛋白在癌症中的作用



注:A. 免疫印迹法检测 PKD1 蛋白水平;B. RT-qPCR 检测 PKD1 的表达水平。与癌旁组织比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ 。

图 6 PKD1 在 EC 组织及癌旁组织中的表达比较

Fig. 6 Comparison of PKD1 expression in EC tissue and adjacent tissues

是指血管生成、组织连续性的丧失以及细胞间与细胞外基质接触的剥夺,通过形成转移灶促进癌症的扩散。上皮的完整性受到干扰——细胞连接的整个机制受到干扰,癌细胞浸润周围组织,并移动到淋巴管和血管<sup>[19]</sup>。细胞黏附可能参与 EC 细胞的侵袭行为,其机制与 TGF $\beta_1$ -MEK-ERK1/2-整合素 $\alpha v \beta 3$ 信号通路有关<sup>[20-23]</sup>。

本研究通过 STRING 数据库对 KEGG 富集的前 10 条信号通路中 126 个基因进行 PPI 分析,并通过 Cytoscape 进行可视化后,基于 Degree 算法得到了排名前 5 的潜在核心基因 PKD1、ACTB、SRC、CDH1 和 COL1A1。采用 Logistic 回归分析和 ROC 曲线构建绝经后 EC 患者的预后生存模型,筛选出 PKD1、SRC 和 CDH1,其中又以 PKD1 的 AUC 值较高,具有较好的预测性。PKD1 是一种丝氨酸—苏氨酸激酶,是多种激酶信号转导途径的重要调节剂,如细胞增殖、存活、运动、高尔基体组织和膜运输。以往研究多集中于 PKD1 在肾脏

中的作用,如 PKD1 突变引起多囊肾病<sup>[24-26]</sup>。越来越多的研究表明,PKD1 蛋白在许多组织中都有表达和活性,包括结肠上皮、前列腺、子宫内膜等<sup>[27-30]</sup>。PKD1 通过调节 Snail/ERK 轴促进前列腺癌细胞增殖,PKD1 缺失限制了对结肠炎和结直肠癌的易感性<sup>[31]</sup>。同时,PKD1 也可通过调节直肠癌细胞中 WNT/CTNNB1 和其他促生长信号通路的活性,增加细胞生长速度和上皮—间充质转化,增强细胞迁移和侵袭<sup>[32]</sup>。近期有研究表明,PKD1 过表达可增强乳腺癌细胞 MCF-7 中表皮生长因子信号通路<sup>[33-34]</sup>。此外,PKD1 也参与了 NF-κB 及 Notch 信号通路的激活<sup>[35]</sup>,其表达有助于在 KRAS12D 诱导转基因模型中形成癌前病变,这表明 PKD1 在癌细胞的起始和进展中起着重要作用。通过蛋白质和 RNA 水平上的研究表明,PKD1 在 EC 组织中有较高表达,且通过 KEGG 分析与 EC 高度相关模块的基因,发现 PKD1 富集在细胞周期及 PI3K-Akt 信号通路。

综上所述,PKD1 可作为影响绝经后 EC 患者预后生存情况的关键基因,其机制可能是通过调控细胞周期或 PI3K-Akt 信号通路发挥作用的,为进一步探索 PKD1 在 EC 中的分子机制提供依据,具有重要的科研价值和意义。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

安沛兴、马晓红:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;张玲:设计研究思路,分析实验数据,论文审核;崔俊芬:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;单莉:进行统计学分析;颜红丽:课题设计,论文撰写

## 参考文献

- Ogunbiyi MO, Oxley S, Graham R, et al. The oncological and reproductive outcomes of fertility-preserving treatments for stage 1 grade 1 endometrial carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. J Obstet Gynaecol, 2024, 44 (1): 2294329. DOI: 10.1080/01443615.2023.2294329.
- Shen L, Zhang C, Cui K, et al. Leptin secreted by adipocytes promotes EMT transition and endometrial cancer progression via the JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. Adipocyte, 2024, 13 (1): 2293273. DOI: 10.1080/21623945.2023.2293273.
- Howell KJ, Jain A. Endometrial cancer treatment: Long-term engagement strategies [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2024, 118 (2): 321. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.11.001.
- Cao Y, Liu YL, Lu XY, et al. Integrative analysis from multi-center studies identifies a weighted gene co-expression network analysis-based Tregs signature in ovarian cancer [J]. Environ Toxicol, 2024, 39 (2): 736-750. DOI: 10.1002/tox.23948.
- Bao Q, Yu X, Qi X. Integrated analysis of single-cell sequencing and weighted co-expression network identifies a novel signature based on cellular senescence-related genes to predict prognosis in glioblastoma

- [5] [J]. Environ Toxicol, 2024, 39 ( 2 ) : 643-656. DOI: 10. 1002/tox. 23921.
- [6] Fang Z, Fu J, Chen X. A combined immune and exosome-related risk signature as prognostic biomarkers in acute myeloid leukemia [J]. Hematology, 2024, 29 ( 1 ) : 2300855. DOI: 10. 1080/16078454.2023. 2300855.
- [7] Feng Z, Ye W, Feng L. Bioactives and metabolites of *Tetrastigma hemsleyanum* root extract alleviate DSS-induced ulcerative colitis by targeting the SYK protein in the B cell receptor signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 322: 117563. DOI: 10. 1016/j.jep. 2023. 117563.
- [8] Liu X, Qiu Z, Zhang X, et al. Generalized machine learning based on multi-omics data to profile the effect of ferroptosis pathway on prognosis and immunotherapy response in patients with bladder cancer [J]. Environ Toxicol, 2024, 39 ( 2 ) : 680-694. DOI: 10. 1002/tox. 23949.
- [9] Shyam H, Singh N, Kaushik S, et al. Centchroman induces redox-dependent apoptosis and cell-cycle arrest in human endometrial cancer cells [J]. Apoptosis, 2017, 22 ( 4 ) : 570-584. DOI: 10. 1007/s10495-017-1346-6.
- [10] Qiu H, Li J, Clark LH, et al. JQ1 suppresses tumor growth via PTEN/PI3K/AKT pathway in endometrial cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7 ( 41 ) : 66809-66821. DOI: 10. 18632/oncotarget. 11631.
- [11] Zhou Y, Wang K, Zhen S, et al. Carfilzomib induces G2/M cell cycle arrest in human endometrial cancer cells via upregulation of p21 (Waf1/Cip1) and p27 (Kip1) [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2016, 55 ( 6 ) : 847-851. DOI: 10. 1016/j.tjog. 2016. 09. 003.
- [12] 倩倩, 马艳萍. 卡非佐米治疗多发性骨髓瘤的耐药机制研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50 ( 14 ) : 746-749. DOI: 10. 12354/j. issn. 1000-8179. 2023. 20230448.
- [13] 金乐, 朱星, 李祥平, 等. Wip1 通过 P-gp 介导人多发性骨髓瘤细胞卡非佐米耐药作用研究 [J]. 实用药物与临床, 2022, 25 ( 11 ) : 972-976. DOI: 10. 14053/j. cnki. ppcr. 202211003.
- [14] 国雄, 李东亚, 陈敏, 等. 卡非佐米对套细胞淋巴瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27 ( 3 ) : 827-832. DOI: 10. 19746/j. cnki. issn1009-2137. 2019. 03. 030.
- [15] Liu J, Mei J, Li S, et al. Establishment of a novel cell cycle-related prognostic signature predicting prognosis in patients with endometrial cancer [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20, 329. DOI: 10. 1186/s12935-020-01428-z. eCollection 2020.
- [16] 克剑, 杨金礼, 闫阳, 等. P53、CDC7 蛋白在多原发肺腺癌中表达的研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38 ( 9 ) : 983-985. DOI: 10. 13463/j. cnki. cczyy. 2022. 09. 010.
- [17] 林, 程瑞雪, 冯德云, 等. MDM2 蛋白过度表达致 p53 功能失活在原发性肝细胞癌发生中的作用 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26 ( 1 ) : 13-16. DOI: 10. 3321/j. issn:1672-7347. 2001. 01. 005.
- [18] 王燕, 郭乔楠, 章波, 等. 组蛋白乙酰化修饰对 IEC-6 恶性转化细胞细胞周期和 p53、p21WAF1 基因表达的调控 [J]. 第三军医学学报, 2007, 29 ( 4 ) : 300-303. DOI: 10. 3321/j. issn:1000-5404. 2007. 04. 007.
- [19] Lewczuk L, Pryczynicz A, Guzinska-Ustymowicz K. Cell adhesion molecules in endometrial cancer - A systematic review [J]. Adv Med Sci, 2019, 64 ( 2 ) : 423-429. DOI: 10. 1016/j. advms. 2019. 08. 003.
- [20] Wang X, Gu Y, Zhang L, et al. Long noncoding RNAs regulate intrauterine adhesion and cervical cancer development and progression [J]. Semin Cell Dev Biol, 2024, 154 ( Pt C ) : 221-226. DOI: 10. 1016/j. semedb. 2023. 02. 007.
- [21] 张荣, 刘绍能, 马继征, 等. 茜草颗粒对肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞整合素 αVβ3-FAK-Ras/MAPK 信号通路的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29 ( 5 ) : 430-432, 472. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-0264. 2019. 05. 015.
- [22] 蒋敏, 吕强, 刘焕, 等. 模拟失重大鼠股动脉整合素 αvβ3 信号通路分子的表达变化及间断人工重力对抗的影响 [J]. 空军医学杂志, 2018, 34 ( 1 ) : 1-6, 60. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-3402. 2018. 01. 001.
- [23] 常艳艳, 李鹏, 孟金平, 等. CXCR4 通过 integrinαVβ3 调控头颈部鳞癌细胞迁移的机制研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31 ( 9 ) : 1584-1588. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4992. 2023. 09. 002.
- [24] Wit M, Belykh A, Sumara G. Protein kinase D (PKD) on the cross-road of lipid absorption, synthesis and utilization [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2024, 1871 ( 2 ) : 119653. DOI: 10. 1016/j.bbamcr. 2023. 119653.
- [25] 宋莹莹, 牛玲, 闫成花, 等. 常染色体显性多囊肾病的发病机制与相关治疗研究进展 [J]. 江西中医药, 2022, 53 ( 3 ) : 69-74.
- [26] 陈艳, 黄翀, 徐承云. 染色体显性遗传性多囊肾病 PKD2 基因突变的检测 [J]. 中国医学创新, 2019, 16 ( 26 ) : 145-150. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-4985. 2019. 26. 039.
- [27] Cilleros-Rodriguez D, Toledo-Lobo MV, Martinez-Martinez D, et al. Protein kinase D activity is a risk biomarker in prostate cancer that drives cell invasion by a Snail/ERK dependent mechanism [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870 ( 1 ) : 166851. DOI: 10. 1016/j. bbadis. 2023. 16685.
- [28] Nikanova AS, Deneka AY, Silva FN, et al. Loss of Pkd1 limits susceptibility to colitis and colorectal cancer [J]. Oncogenesis, 2023, 12 ( 1 ) : 40. DOI: 10. 1038/s41389-023-00486-y.
- [29] 熊婧, 刘思德. 蛋白激酶 D2 对人肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的影响 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24 ( 12 ) : 1383-1386. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-2159. 2019. 12. 005.
- [30] 赵彩琴, 钮丽红. 子宫内膜癌中 PKD1 的表达及其临床意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33 ( 1 ) : 8-11. DOI: 10. 13315/j. cnki. ejcep. 2017. 01. 003.
- [31] 丁克家, 刘征, 高德轩, 等. 常染色体显性多囊肾基因 PKD1 单拷贝区突变 [J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29 ( 5 ) : 583.
- [32] Arjune S, Spath MR, Oehm S, et al. DKK3 as a potential novel biomarker in patients with autosomal polycystic kidney disease [J]. Clin Kidney J, 2024, 17 ( 1 ) : sfad262. DOI: 10. 1093/ckj/sfad262.
- [33] Legay C, Doublier S, Babajko S, et al. Protein kinase D1 overexpression potentiates epidermal growth factor signaling pathway in MCF-7 cells [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50 ( 4 ) : 3641-3651. DOI: 10. 1007/s11033-023-08300-z.
- [34] 周瑾, 李盛建, 覃福礼, 等. 月腺大戟素 A 通过干扰 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路抑制乳腺癌细胞增殖的研究 [J]. 药学实践杂志, 2020, 38 ( 3 ) : 241-244, 276. DOI: 10. 12206/j. issn. 1006-0111. 201912008.
- [35] Reiterova J, Tesar V. Autosomal dominant polycystic kidney disease: From pathophysiology of cystogenesis to advances in the treatment [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 ( 6 ) . DOI: 10. 3390/ijms23063317.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 017

论著 · 基础

# 人参皂苷 Rb1 调控线粒体自噬对脓毒症血管内皮的保护作用及其机制研究

卢彩云, 刘畅, 黄敏, 张洪泉, 陶星宇, 贾宝辉



基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(212102310724); 江西省青年科学基金资助项目(2020BABL216002); 江西省中医药管理局科技计划课题(2022B325)

作者单位: 453000 河南新乡, 新乡医学院(卢彩云); 450000 郑州, 郑州大学附属郑州中心医院急诊科(卢彩云、刘畅、贾宝辉); 330000 南昌, 南昌市第一医院老年医学科(黄敏); 330000 南昌, 南昌大学(张洪泉、陶星宇)

通信作者: 贾宝辉, E-mail: bhjia@126.com

**【摘要】 目的** 研究人参皂苷 Rb1 通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/糖原合成酶 3 $\beta$ (PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ )信号通路调控线粒体自噬对脓毒症血管内皮的保护作用及机制。**方法** 健康 SPF 级雄性昆明小鼠 30 只随机分为 5 组: 假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLIP 组)、人参皂苷 Rb1 + 脓毒症组(人参皂苷 Rb1 组)、PI3K 抑制剂 LY294002 + 人参皂苷 Rb1 + 脓毒症组(LY294002 组)和线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 + 人参皂苷 Rb1 + 脓毒症组(Mdivi-1 组), 每组 6 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLIP)复制脓毒症小鼠模型, 每组给予相应药物处理。术后观察小鼠一般情况, 24 h 后取主动脉组织样本, 通过苏木素—伊红(HE)染色观察主动脉组织病理学改变, 免疫组织化学法检测 vWF、p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及线粒体自噬相关蛋白 Parkin 的水平。**结果** Sham 组及人参皂苷 Rb1 组小鼠一般情况及腹腔感染情况较轻, 主动脉组织内膜结构完整, 细胞排列较整齐, 形态分布规则; CLIP 组和抑制剂组均可见不同程度的内膜损伤突起, 中膜增生且排列紊乱, 管壁厚薄不一。免疫组化结果显示, 与 Sham 组比较, CLIP 组小鼠主动脉 vWF、Parkin 表达升高( $P < 0.05$ ), p-AKT、p-GSK3 $\beta$  表达降低( $P < 0.05$ )。与 CLIP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组 vWF 表达明显降低( $P < 0.05$ ), p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及 Parkin 表达升高( $P < 0.05$ )。与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组 p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及 Parkin 表达降低, vWF 升高( $P < 0.05$ ), Mdivi-1 组 p-AKT 及 p-GSK3 $\beta$  表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), Parkin 表达明显降低, vWF 升高( $P < 0.05$ )。与 LY294002 组比较, Mdivi-1 组 p-AKT、p-GSK3 $\beta$  表达明显升高( $P < 0.05$ ), Parkin 表达降低( $P < 0.05$ )。**结论** 人参皂苷 Rb1 通过激活 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬, 进而对脓毒症血管内皮起保护作用。

**【关键词】** 脓毒症; 人参皂苷 Rb1; 血管内皮; 线粒体自噬; PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  通路; 作用机制; 小鼠

**【中图分类号】** R459.7; R285.5

**【文献标识码】** A

## The protective effects and mechanisms of ginsenoside Rb1 on vascular endothelium of sepsis by regulating mitophagy

Lu Caiyun\*, Liu Chang, Huang Min, Zhang Hongquan, Tao Xingyu, Jia Baohui. \* Xinxiang Medical University, Henan Province, Xinxiang 453000, China

Funding program: Key Research and Development and Promotion Special (Science and Technology Tackling) Project of Henan Province (212102310724); Jiangxi Provincial Youth Science Foundation Grant (2020BABL216002); Jiangxi Provincial Health and Family Planning Commission Traditional Chinese Medicine Scientific Research Program (2022B325)

Corresponding author: Jia Baohui, E-mail: bhjia@126.com

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect and mechanism of ginsenoside Rb1 on vascular endothelium of sepsis by regulating mitophagy through phosphatidylinositol-3 kinase /protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ (PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ ) signaling pathway. **Methods** Healthy male Kunming mice were randomly divided into 5 groups: Sham operation group (Sham group), sepsis group (CLIP group), ginsenoside Rb1 + sepsis group (ginsenoside Rb1 group), PI3K inhibitor LY294002 + ginsenoside Rb1 + sepsis group (LY294002 group) and mitophagy inhibitor Mdivi-1 + ginsenoside Rb1 + sepsis group (Mdivi-1 group). The sepsis mouse model was replicated by cecal ligation and puncture (CLIP). Each group was treated with corresponding drugs. The general condition of mice was observed after operation. After 24 hours, aortic tissue samples were taken to observed the pathological changes by Hematoxylin-eosin (HE) staining and detected the expression levels of vWF, p-AKT, p-GSK3 $\beta$  and Parkin by immunohistochemistry. **Results** The general condition and ab-

dominal infection of mice in the Sham group and the ginsenoside Rb1 group were mild, the intima structure of the aortic tissue was complete, the cells were arranged neatly, and the shape distribution was regular. In the CLP group and the inhibitor group, there were different degrees of intimal damage hyperplasia and disordered arrangement of the media, and different thickness of the wall. Immunohistochemical results showed that compared with the Sham group, the expression of vWF and Parkin in the CLP group was increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of p-AKT and p-GSK3 $\beta$  was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CLP group, the expression of vWF in the ginsenoside Rb1 group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of p-AKT, p-GSK3 $\beta$  and Parkin was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with ginsenoside Rb1 group, the expression of p-AKT, p-GSK3 $\beta$  and Parkin were decreased in LY294002 group ( $P < 0.05$ ), and the expressions of p-AKT and p-GSK3 $\beta$  were not significantly different in Mdivi-1 group, but the expression of Parkin was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with LY294002 group, the expression of p-AKT and p-GSK3 $\beta$  was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of Parkin was decreased in Mdivi-1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 promotes mitophagy by activating PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway, which has a protective effect on vascular endothelium in patients with sepsis.

**[Key words]** Sepsis; Ginsenoside Rb1; Vascular endothelium; Mitochondrial autophagy; PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathway; Mechanism

脓毒症是由于宿主对感染的反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍,是威胁人类生命健康的主要原因之一。血管内皮功能障碍可导致炎性反应失衡、毛细血管渗漏和凝血异常,在脓毒症相关的器官功能障碍的发病机制中起着重要作用<sup>[1]</sup>。因此,血管内皮是治疗脓毒症的一个潜在靶点。通过深入研究血管内皮功能障碍的分子机制,或能找到更有效的治疗方法来降低脓毒症的病死率。

人参皂苷 Rb1 是中国传统中药人参发挥药效的主要成分之一。有研究者发现,人参皂苷 Rb1 可以激活 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  (phosphatidylinositol-3 kinase / protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) 信号通路来提高血管内皮生长因子及其受体的表达水平<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究发现,人参皂苷 Rb1 能够减轻脓毒症和感染性休克引起的器官损伤,其机制可能与拮抗炎性因子,抑制内质网应激的过表达有关<sup>[3-5]</sup>。内质网应激时,经由线粒体相关内质网膜(MAM)介导,  $Ca^{2+}$  大量进入线粒体,造成线粒体钙超载,引起线粒体功能障碍<sup>[6]</sup>。线粒体自噬是选择性清除受损线粒体的过程<sup>[7]</sup>。脓毒症时,通过激活线粒体自噬,清除受损线粒体,维持细胞稳态,对各组织器官起保护作用<sup>[8-9]</sup>。然而对于脓毒症血管内皮损伤时,人参皂苷 Rb1 干预对线粒体自噬的影响及 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路在其中发挥的作用尚不清楚。本研究拟通过盲肠结扎穿孔术复制脓毒症小鼠模型,观察人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠血管内皮损伤的保护作用,并探讨其与线粒体自噬以及 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号传导通路的关系,报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 6~8 周龄健康 SPF 级雄性昆明小鼠 30 只(体质量 35~40 g),购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号 SCXK(京)2019-0010],动物于室温

23~25℃,相对湿度 50%~70% 的环境下,适应性喂养 1 周。自由饮水摄食,明暗节律 12 h/12 h。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求,本研究已由郑州市中心医院伦理委员会审核批准(202372)。

**1.2 主要试剂与仪器** 人参皂苷 Rb1(上海源叶生物科技有限公司,批号:G01O11Y1264291);HE 染色试剂盒(广州硕谱生物科技有限公司,批号 22059595);线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1(美国 MCE 公司,批号 HY-15886);乌拉坦(合肥巴斯夫生物科技有限公司,批号:BSF201009);vWF 抗体、Parkin 抗体(武汉 Abclonal 公司,批号分别为 3500012029、3523041463);p-AKT 抗体、p-GSK3 $\beta$  抗体(美国 invitrogen 公司,批号分别为 1944235、WE3280654);山羊抗兔 IgG 抗体(上海中杉金桥试剂公司,批号为 210060324);光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

**1.3 实验方法** 实验于 2022 年 8 月—2023 年 6 月在河南省天然药物提取和医疗技术应用工程研究中心进行。将 30 只小鼠随机分为 5 组:假手术组(Sham 组)、脓毒症组(CLП 组)、脓毒症 + 人参皂苷 Rb1 组(人参皂苷 Rb1 组)、脓毒症 + 人参皂苷 Rb1 + PI3K 抑制剂组(LY294002 组)和脓毒症 + 人参皂苷 Rb1 + 线粒体自噬抑制剂组(Mdivi-1 组),每组 6 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLП)复制脓毒症小鼠模型。小鼠术前适应性喂养 7 d。术前禁食 12 h,20% 乌拉坦(2 000 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,麻醉成功后于左下腹做 1.0~1.5 cm 纵行切口,游离肠系膜及盲肠,在距盲肠盲端 2/3 长度处环行结扎,在距盲肠末端 1 cm 处贯通穿刺,挤出少许粪便,回纳肠系膜和盲肠入腹腔,逐层缝合关腹。其中 Sham 组仅进行开腹关腹,不进行结扎穿孔;人参皂苷 Rb1 组腹腔注射 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1;LY294002 组腹腔注射 0.3 mg/kg LY294002

(PI3K 特异性抑制剂), 30 min 后给予 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1 腹腔注射; Mdivi-1 组腹腔注射 25 mg/kg Mdivi-1(线粒体自噬抑制剂), 30 min 后给予 80 mg/kg 人参皂苷 Rb1 腹腔注射; Sham 组和 CLP 组术后腹腔注射同等体积的生理盐水。各组药物每 8 h 腹腔注射 1 次, 共 3 次。

#### 1.4 检测指标与方法

1.4.1 小鼠一般情况观察: 造模术后观察小鼠一般情况, 包括有无萎靡、脓性尿、黏液便、眼角分泌物增加及进食、活动情况。处死动物后观察小鼠结扎盲肠情况, 有无缺血、乌黑、坏疽、周围有无大量脓液; 观察腹水情况, 有无脓性、血性腹水, 有无恶臭等。

1.4.2 HE 染色观察主动脉组织病理学变化: 模型制备成功后, 在 CLP 后 24 h 进行取材。小鼠 20% 乌拉坦(2 000 mg/kg)麻醉后, 取主动脉, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度酒精脱水后进行石蜡包埋和切片。将切片依次浸入二甲苯及梯度酒精中进行脱蜡至水。蒸馏水冲洗后依次进行苏木素染色液染色、分化液分化、伊红染色。最后将切片依次浸入梯度酒精及二甲苯中进行脱水, 最后使用中性树胶封片, 光学显微镜下观察。

1.4.3 免疫组化检测主动脉组织蛋白水平: 取小鼠主动脉 4% 多聚甲醛固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片后, 使用二甲苯及梯度酒精脱蜡至水, 然后置于柠檬酸(pH6.0)抗原修复液中, 微波炉加热进行抗原修复, 之后放于 3% 过氧化氢溶液中阻断内源性过氧化物酶, 3% BSA 均匀覆盖组织, 37℃ 封闭 30 min。甩掉封闭液, 滴加相应按一定比例配置好的一抗(vWF、p-AKT、p-GSK3 $\beta$  或 Parkin 抗体), 玻片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。次日滴加与一抗相应种属的二抗(山羊抗兔或山羊抗小鼠), 37℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤后依次进行 DAB 显色、苏木素复染、1% 盐酸酒精分化、返蓝液返蓝, 将切片依次放入梯度酒精及二甲苯中脱水, 中性树胶封片。光学显微镜下拍照观察, 使用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析, 计算免疫组化图片平均光密度值(累计光密度值与面积的比值, OD/Area)。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 26.0 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, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 多重比较采用 LSD(L)法和 S-N-K(S)法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结 果

2.1 小鼠一般情况比较 与 Sham 组及人参皂苷 Rb1 组相比, 其余 3 组小鼠术后表现精神萎靡, 活动及进食减少, 出现竖毛、糊状便及脓性尿, 开腹后可闻及腹腔有恶臭, 结扎盲肠有缺血、乌黑、坏疽, 且被腹腔内肠道

等组织包裹, 与周围粘连。

2.2 人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠主动脉组织病理改变的影响 HE 染色显示, Sham 组小鼠内膜光滑连续, 细胞排列整齐, 各层结构完整, 血管形态分布规则。CLP 组小鼠内膜可见明显损伤突起, 各层结构紊乱, 管壁厚薄不一, 失去规则。人参皂苷 Rb1 组较 CLP 组主动脉组织病理改变明显改善, 内膜较光滑, 中膜少量增生变厚, 各层结构较为完整, 形态分布规则。LY294002 组和 Mdivi-1 组较人参皂苷 Rb1 组主动脉组织损伤加重, 各层结构紊乱, 中膜明显增生, 管壁厚薄不一, 见图 1。

2.3 各组小鼠主动脉组织 vWF 水平比较 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 CLP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平明显降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组和 Mdivi-1 组小鼠主动脉 vWF 蛋白水平呈现不同程度升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 1。

2.4 各组小鼠主动脉组织 p-AKT 水平比较 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠主动脉 p-AKT 蛋白水平降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 CLP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组 p-AKT 水平升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组 p-AKT 蛋白水平明显降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), Mdivi-1 组 p-AKT 蛋白水平差异不明显( $P > 0.05$ ); 与 LY294002 组比较, Mdivi-1 组 p-AKT 蛋白水平明显升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 3、表 1。

2.5 各组小鼠主动脉组织 p-GSK3 $\beta$  水平比较 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠主动脉 p-GSK3 $\beta$  蛋白水平降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 CLP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组 p-GSK3 $\beta$  水平升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组 p-GSK3 $\beta$  蛋白水平降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), Mdivi-1 组 p-GSK3 $\beta$  蛋白水平差异不明显( $P > 0.05$ ); 与 LY294002 组比较, Mdivi-1 组 p-GSK3 $\beta$  蛋白水平明显升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 4、表 1。

2.6 各组小鼠主动脉组织 Parkin 水平比较 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 CLP 组比较, 人参皂苷 Rb1 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平明显升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与人参皂苷 Rb1 组比较, LY294002 组和 Mdivi-1 组小鼠主动脉 Parkin 蛋白水平明显降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 5、表 1。

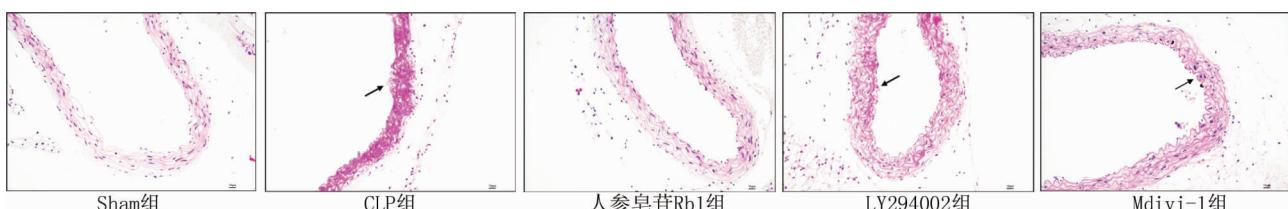
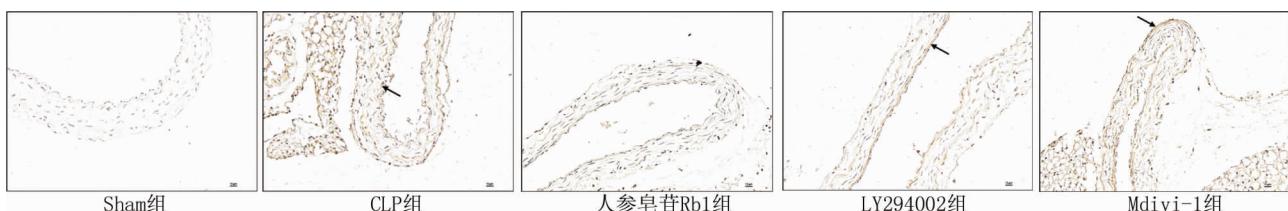
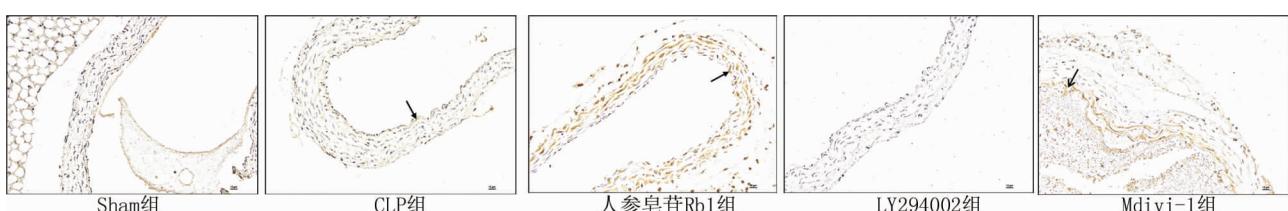
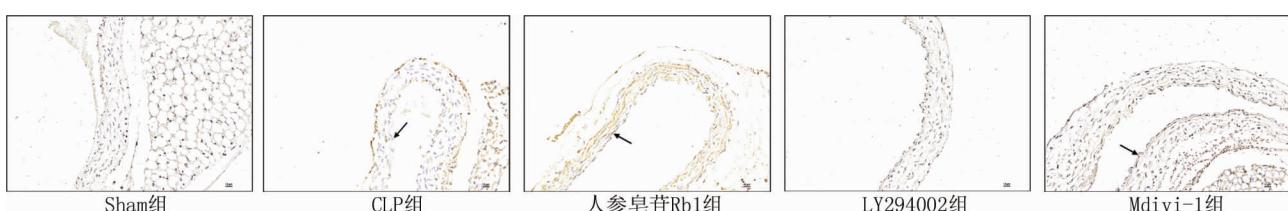
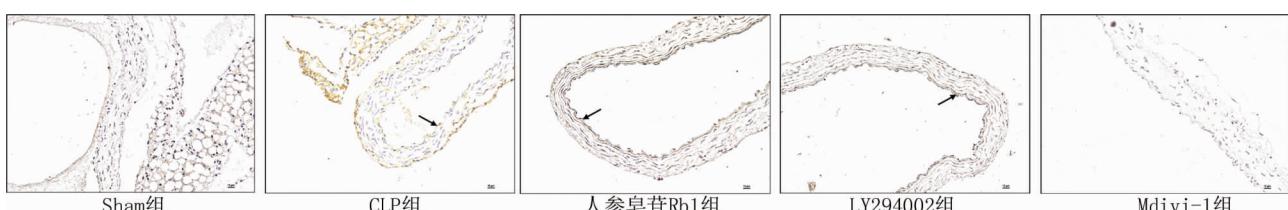
图 1 各组小鼠主动脉组织病理变化比较(HE 染色,  $\times 200$ )**Fig. 1** Pathological changes in aortic tissue of mice in each group (HE staining,  $\times 200$ )图 2 各组小鼠主动脉组织血管损伤标志物 vWF 水平比较(免疫组化染色,  $\times 200$ )**Fig. 2** Comparison of vWF levels, a vascular injury marker in the aortic tissue of mice in different groups (immunohistochemistry,  $\times 200$ )图 3 各组小鼠主动脉组织信号通路标志物 p-AKT 水平比较(免疫组化染色,  $\times 200$ )**Fig. 3** Comparison of p-AKT levels in aortic tissue signaling pathway markers among different groups of mice (immunohistochemistry,  $\times 200$ )图 4 各组小鼠主动脉组织信号通路标志物 p-GSK3β 水平比较(免疫组化染色,  $\times 200$ )**Fig. 4** Comparison of p-GSK3 β levels in aortic tissue signaling pathway markers among different groups of mice (immunohistochemistry,  $\times 200$ )图 5 各组小鼠主动脉组织血管损伤标志物 Parkin 水平比较(免疫组化染色,  $\times 200$ )**Fig. 5** Comparison of Parkin levels, a marker of aortic tissue vascular injury, among different groups of mice (immunohistochemistry,  $\times 200$ )

表 1 各组小鼠主动脉 vWF、p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及 Parkin 蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 1 Comparison of vWF, p-AKT, p-GSK3 $\beta$ , and Parkin protein levels in the aorta of mice in each group

组 别	<i>n</i>	vWF	p-AKT	p-GSK3 $\beta$	Parkin
Sham 组	6	0.095 ± 0.009	0.115 ± 0.006	0.101 ± 0.014	0.106 ± 0.010
CLP 组	6	0.126 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.100 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.086 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.119 ± 0.007 <sup>a</sup>
人参皂苷 Rb1 组	6	0.097 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.133 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.112 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.131 ± 0.008 <sup>b</sup>
LY294002 组	6	0.111 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.100 ± 0.005 <sup>c</sup>	0.086 ± 0.005 <sup>c</sup>	0.120 ± 0.009 <sup>c</sup>
Mdivi-1 组	6	0.109 ± 0.012 <sup>c</sup>	0.132 ± 0.024 <sup>d</sup>	0.109 ± 0.016 <sup>d</sup>	0.110 ± 0.003 <sup>cd</sup>

注:与 Sham 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 CLP 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05;与人参皂苷 Rb1 组比较,<sup>c</sup>*P* < 0.05;与 LY294002 组比较,<sup>d</sup>*P* < 0.05。

### 3 讨 论

血管内皮细胞作为血管壁的重要组成部分,是维持血管内皮功能的主要细胞<sup>[10]</sup>。脓毒症时血管内皮细胞向促凋亡、促炎、促黏附和促凝表型转化<sup>[11]</sup>。适当的内皮细胞改变可以起到限制细菌扩散、协调白细胞募集以及细菌清除的作用,但是严重的、持续的内皮表型改变可能会导致微循环血流受阻、组织灌注不足和威胁生命的器官衰竭<sup>[12]</sup>。血管内皮在脓毒症发病过程中经历了巨大的变化,是脓毒症治疗发展过程中引人注目的目标之一。

人参皂苷 Rb1 具有多种生物活性,可以通过抑制炎性反应、调节自噬和免疫等多种方式在疾病治疗中发挥作用<sup>[13]</sup>。既往研究表明<sup>[5-7]</sup>,人参皂苷 Rb1 能够减轻脓毒症小鼠心肌和肺组织内质网应激因子表达,减轻脓毒症小鼠的感染程度,对脓毒症小鼠心肌和肺组织具有保护作用。本研究发现,与 Sham 组比较,CLP 组小鼠主动脉组织血管内皮损伤标志物 vWF 蛋白水平明显升高,主动脉组织病理学改变明显,内膜见明显损伤突起,各层结构紊乱,管壁厚薄不一,失去规则,提示脓毒症诱导的炎性反应使小鼠主动脉组织损伤明显。而人参皂苷 Rb1 组相较于 CLP 组 vWF 蛋白水平明显降低,主动脉组织病理改变对比明显,内膜较光滑,中膜少量增生变厚,结构完整,形态分布规则,提示人参皂苷 Rb1 对脓毒症小鼠主动脉组织也具有保护作用。

脓毒症可通过增加氧化应激,降低抗氧化防御,导致线粒体 ROS 过量产生,致使线粒体功能缺陷,引起 ROS 产生增多和 ATP 生成障碍,进一步破坏线粒体功能和稳态,加剧血管内皮损伤<sup>[14]</sup>。线粒体自噬则是清除受损线粒体、维持线粒体功能的重要途径。越来越多的研究表明,通过调控线粒体自噬可以减少血管内皮的损伤<sup>[15-16]</sup>。PINK1/Parkin 诱导的自噬是线粒体自噬的主要方式<sup>[17]</sup>。有研究发现,人参皂苷 Rb1 可以增加 PINK1、Parkin 的表达,表明人参皂苷 Rb1 能够通过激活线粒体自噬相关的 PINK1/Parkin 通路,激活细

胞的线粒体自噬,以达到清除受损线粒体的作用<sup>[18]</sup>。本研究发现,CLP 组小鼠主动脉组织损伤明显,Parkin 水平较 Sham 组升高,提示在脓毒症早期,线粒体功能可能发生障碍,内皮细胞能够在一定程度上增强线粒体自噬,以达到维持细胞稳态的目的。人参皂苷 Rb1 干预后,vWF 蛋白水平降低,Parkin 水平进一步升高,线粒体自噬水平明显升高,降低了主动脉组织的损伤程度。而线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 则部分阻断了人参皂苷 Rb1 对主动脉组织的保护作用,使血管内皮病理损伤加重,vWF 水平升高,Parkin 水平明显降低。这提示人参皂苷 Rb1 可以作用于 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬水平,发挥其对脓毒症血管内皮的保护作用。

PI3K/AKT 信号通路是一种经典的细胞内信号转导通路,能够调节细胞增殖、代谢、凋亡、生长和血管生成等多种细胞生物过程。GSK3 参与了包括 PI3K/AKT 在内的许多与疾病病理相关的信号通路,是治疗脓毒症等炎性疾病的有效靶点之一<sup>[19]</sup>。AKT 介导的 GSK3 $\alpha$  和 GSK3 $\beta$  在 Ser21 和 Ser9 位点的磷酸化可以抑制 GSK3 的活性。有研究者在实验中观察到,与正常对照组比较,脓毒症小鼠心肌组织中 p-GSK3 $\beta$  蛋白水平降低<sup>[20]</sup>。GSK3 $\beta$  能够参与线粒体能量代谢、运动、凋亡等过程,抑制 GSK3 $\beta$  活性可以上调线粒体自噬相关蛋白 Parkin 水平<sup>[21]</sup>。此外,有研究者发现,人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI3K/AKT 使 GSK3 $\beta$  磷酸化而失去活性<sup>[22]</sup>。本研究发现,与 CLP 组比较,人参皂苷 Rb1 组 p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及 Parkin 蛋白水平明显升高,使用线粒体自噬抑制剂后,Mdivi-1 组较人参皂苷 Rb1 组 Parkin 水平明显降低,线粒体自噬过程被抑制,主动脉组织病理损伤加重。而使用 PI3K 抑制剂 LY294002 后,p-AKT、p-GSK3 $\beta$  及 Parkin 水平均降低,主动脉组织损伤加重,接近 CLP 组。上述结果表明,人参皂苷 Rb1 可以激活 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬,进而对脓毒症血管内皮起保护作用。

综上所述，人参皂苷 Rb1 可以通过激活 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路促进血管内皮细胞线粒体自噬，显著改善脓毒症时小鼠血管内皮损伤。且在研究中发现使用信号通路抑制剂后，线粒体自噬标志蛋白水平仍高于线粒体自噬抑制剂组，线粒体自噬过程不能被完全阻断。因此，人参皂苷 Rb1 可能也通过其他途径调节线粒体自噬过程，其确切调节机制有待进一步研究。

**利益冲突：**所有作者声明无利益冲突

#### 作者贡献声明

卢彩云、黄敏：设计研究方案，实施研究过程，论文撰写；刘畅、陶星宇、贾宝辉：提出研究思路，论文修改、审核；张洪泉：实施研究过程，论文修改

#### 参考文献

- [1] Vincent JL, Ince C, Pickkers P. Endothelial dysfunction: A therapeutic target in bacterial sepsis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2021, 25(9):733-748. DOI: 10.1080/14728222.2021.1988928.
- [2] Zhang H, Su Y, Wang J, et al. Ginsenoside Rb1 promotes the growth of mink hair follicle via PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway [J]. Life Sci, 2019, 229 (2019): 210-218. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.033.
- [3] 徐宏平, 贾宝辉, 艾启帆, 等. 人参皂甙 Rb1 对感染性休克大鼠重要器官的保护作用 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2014, 49(3): 319-322. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2014.03.007.
- [4] 黄敏, 陶星宇, 贾宝辉, 等. 人参皂苷 Rb1 调控内质网应激对脓毒症小鼠重要脏器的保护作用 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(30): 17-20, 5.
- [5] Wu LL, Jia BH, Sun J, et al. Protective effects of ginsenoside Rb1 on septic rats and its mechanism [J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(4):300-303. DOI: 10.3967/bes2014.053.
- [6] Liu H, Li X, Wang Z, et al. Elaidic acid leads to mitochondrial dysfunction via mitochondria-associated membranes triggers disruption of mitochondrial calcium fluxes [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1):287-298. DOI: org/10.26599/FSHW.2022.9250024.
- [7] Li A, Gao M, Liu B, et al. Mitochondrial autophagy: Molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(5):444. DOI: 10.1038/s41419-022-04906-6.
- [8] Zhang Z, Chen Z, Liu R, et al. Bcl-2 proteins regulate mitophagy in lipopolysaccharide-induced acute lung injury via pink1/parkin signaling pathway [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020:1-20. DOI: 10.1155/2020/6579696.
- [9] Wang Y, Zhu J, Liu Z, et al. The PINK1/PARK2/optineurin pathway of mitophagy is activated for protection in septic acute kidney injury [J]. Redox Biology, 2021, 38: 101767. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101767.
- [10] Dolmatova EV, Wang K, Mandavilli R, et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications [J]. Cardiovascular Research, 2021, 117(1):60-73. DOI: 10.1093/cvr/cvaa070.
- [11] Joffre J, Hellman J, Ince C, et al. Endothelial responses in sepsis [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2020, 202(3):361-370. DOI: 10.1164/rccm.201910-1911TR.
- [12] Fernández S, Palomo M, Molina P, et al. Progressive endothelial cell damage in correlation with sepsis severity. Defibrotide as a contender [J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2021, 19(8):1948-1958. DOI: 10.1111/jth.15343.
- [13] Chen S, Li X, Wang Y, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia/reperfusion-induced inflammation and oxidative stress via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5):3633-3641. DOI: 10.3892/mmr.2019.10018.
- [14] Yang H, Zhang Z. Sepsis-induced myocardial dysfunction: The role of mitochondrial dysfunction [J]. Inflammation Research, 2021, 70(4):379-387. DOI: 10.1007/s00011-021-01447-0.
- [15] Cao Y, Chen X, Pan F, et al. Xinmaikang-mediated mitophagy attenuates atherosclerotic lesions via the PINK1/Parkin signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 119: 154955. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154955.
- [16] Kong X, Lin D, Lu L, et al. Apelin-13-Mediated AMPK ameliorates endothelial barrier dysfunction in acute lung injury mice via improvement of mitochondrial function and autophagy [J]. International Immunopharmacology, 2021, 101(Pt B):108230. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108230.
- [17] Wu Y, Jiang T, Hua J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in cardiovascular disease: From pathogenesis to novel therapy [J]. International Journal of Cardiology, 2022, 361:61-69. DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.05.025.
- [18] Zhang Q, Hu J, Mao A, et al. Ginsenoside Rb1 alleviated concanavalin A-induced hepatocyte pyroptosis by activating mitophagy [J]. Food & Function, 2023, 14(8): 3793-3803. DOI: 10.1039/d2fo03130b.
- [19] Zhu Y, Wang H, Guo Y, et al. Advances in the therapeutic potential of inhibitors targeting glycogen synthase kinase 3 in inflammatory diseases [J]. Mini-Review in Medicinal Chemistry, 2023, 23(19): 1893-1904. DOI: 10.2174/1389557523666230412083123.
- [20] Jin Y, Wang H, Li J, et al. Exploring the beneficial role of telmisartan in sepsis-induced myocardial injury through inhibition of high-mobility group box 1 and glycogen synthase kinase-3 $\beta$ /nuclear factor-kappaB pathway [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2020, 24(4): 311-317. DOI: 10.4196/kjpp.2020.24.4.311.
- [21] Balasubramaniam M, Parcon PA, Bose C, et al. Interleukin-1 $\beta$  drives NEDD8 nuclear-to-cytoplasmic translocation, fostering parkin activation via NEDD8 binding to the P-ubiquitin activating site [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):275-291. DOI: 10.1186/s12974-019-1669-z.
- [22] Zhang H, Su Y, Wang J, et al. Ginsenoside Rb1 promotes the growth of mink hair follicle via PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway [J]. Life Sci, 2019, 229:210-218. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.033.

(收稿日期:2024-05-17)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 018

荟萃分析

# SGLT-2 抑制剂致成人 2 型糖尿病患者 糖尿病酮症酸中毒风险的 Meta 分析

杨柳, 张炎之, 马海林



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760767); 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713)

作者单位: 830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院药学部(杨柳), 内分泌科(马海林); 新疆医科大学药理学教研室(张炎之)

通信作者: 张炎之, E-mail: 1533465971@qq.com

**【摘要】 目的** 对钠—葡萄糖协同转运蛋白 2(SGLT-2)抑制剂致成人 2 型糖尿病(T2DM)患者糖尿病酮症酸中毒(DKA)风险进行系统 Meta 分析。**方法** 检索美国国立医学图书馆数据库、医学文摘数据库、Cochrane 循证医学数据库从建库至 2023 年 12 月 31 日收录 SGLT-2 抑制剂治疗 T2DM 患者的随机对照试验。提取纳入文献的样本量、患者性别、年龄、体质指数、发生 DKA 情况、治疗时间及药物种类。使用 RevMan5.4 版软件进行 Meta 分析, 二分类变量以相对危险度(RR)值及 95% CI 作为效应量。**结果** 最终共纳入 26 篇文献 65 176 例 T2DM 患者, 其中 SGLT-2 抑制剂治疗(观察组)37 021 例, 对照组 28 155 例; 共发生 DKA 事件 139 例, 观察组 DKA 事件发生率为 0.29% (106/37 021), 对照组 DKA 事件发生率为 0.12% (33/28 155), 观察组发生 DKA 风险显著高于对照组( $RR = 2.71, 95\% CI 1.84 \sim 3.97, P < 0.001$ )。进一步亚组分析提示 SGLT-2 抑制剂组中年龄 > 60 岁( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ )、体质指数  $\geq 31 \text{ kg/m}^2$  ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.82 \sim 4.07, P < 0.001$ )、治疗时间 > 52 周 ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ )、使用卡格列净 ( $RR = 4.82, 95\% CI 1.70 \sim 13.64, P = 0.003$ )、埃格列净 ( $RR = 4.10, 95\% CI 1.11 \sim 15.20, P = 0.040$ ) 发生 DKA 风险均较对照组明显升高。**结论** 成人 T2DM 患者应用 SGLT-2 抑制剂会增加 DKA 风险, 且年龄越大、体质指数越高、治疗时间越长发生 DKA 的风险就越高, 另外 DKA 发生风险也与药物种类有关。

**【关键词】** 糖尿病酮症酸中毒; 2 型糖尿病; 钠—葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂; Meta 分析

**【中图分类号】** R587.1; R587.2

**【文献标识码】** A

**Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor on ketoacidosis in adults with type 2 diabetes mellitus: A Meta-analysis** Yang Liu\*, Zhang Yanzhi, Ma Hailin. \*The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang Province, Urumqi 830054, China

**Funding program:** National Natural Science Foundation of China (81760767); Xinjiang Key Laboratory of Active Component and Drug Release Technology of Natural Medicines (XJDX1713)

**Corresponding author:** Zhang Yanzhi, E-mail: 1533465971@qq.com

**【Abstract】 Objective** To conduct a systematic meta-analysis of the risk of ketoacidosis (DKA) in adults with type 2 diabetes mellitus (T2DM) caused by SGLT-2 inhibitors. **Methods** Randomized controlled trials (RCT) of SGLT-2 inhibitors in adults with T2DM included in PubMed, Embase and Cochrane Library were searched from the establishment of the databases to December 31, 2023. Data such as sample size, age of subjects, body mass index, occurrence of DKA, type and time of hypoglycemic drugs used were extracted. Revman 5.4 software was used for meta-analysis. The risk ratio (RR) value and 95% CI were used as effect variables for dichotomous variables. **Results** A total of 26 RCT involving 65176 T2DM patients were included, including 37021 T2DM patients in the SGLT-2 group and 28155 T2DM patients in the control group, and 139 DKA events occurred. The incidence of DKA events in the SGLT-2 group was 0.29% (106/37021), while in the control group it was 0.12% (33/28155). Compared with the control group, SGLT-2 group had a higher risk of DKA ( $RR = 2.71, 95\% CI 1.84 \sim 3.97, P < 0.001$ ). Subgroup analysis showed that T2DM patients with age  $> 60$  years ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ ), body mass index  $\geq 31 \text{ kg/m}^2$  ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.82 \sim 4.07, P < 0.001$ ) and medication duration  $> 52$  weeks ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ ) who received SGLT-2 inhibitors had a higher risk of DKA compared with their respective control groups. In the subgroups of drug types, the risk of DKA was higher in canagliflozin ( $RR = 4.82, 95\% CI 1.70 \sim 13.64, P < 0.001$ ) and empagliflozin ( $RR = 4.10, 95\% CI 1.11 \sim 15.20, P = 0.040$ ) compared with their respective control groups.

$P=0.003$ ) and ertugliflozin ( $RR=4.10, 95\% CI 1.11 \sim 15.20, P=0.040$ ) than in the control group. **Conclusions** SGLT-2 inhibitors can increase the risk of DKA in adults with T2DM. Moreover, the older the age, the higher body mass index, and the longer the duration of receiving SGLT-2 inhibitors, the higher the risk of developing DKA, and the risk of DKA is also related to the type of medication.

**【Key words】** Diabetic ketoacidosis; Type 2 diabetes mellitus; Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors; Meta-analysis

近年来,随着人们饮食习惯及生活方式的改变,2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)发病率也随之增高,因此各种新型降糖药物不断研发上市,以期更好地控制血糖。钠—葡萄糖协同转运蛋白2(sodium-glucose cotransporter 2, SGLT-2)抑制剂的药理机制是抑制肾近曲小管重吸收葡萄糖的作用,让葡萄糖由尿液排出体外而发挥降血糖疗效<sup>[1]</sup>。经多项大型研究证实,SGLT-2抑制剂相比其他降糖药物优势明显,除降血糖效果显著外,还具有降压、降尿酸、降低体质量及心肾保护等作用,其中恩格列净心血管结局研究结果显示,该药不仅可降血糖、降低体质量,还能明显降低合并心血管疾病的T2DM患者的心力衰竭住院风险与心血管死亡风险<sup>[2]</sup>;卡格列净心血管评估研究<sup>[3]</sup>、达格列净心血管结局研究<sup>[4]</sup>分别证实卡格列净与达格列净可使T2DM患者心血管和肾脏获益。但上述临床研究也发现SGLT-2抑制剂的不良事件,如卡格列净导致截肢风险增加、达格列净增加了泌尿系感染的风险等。目前关于应用SGLT-2抑制剂治疗成人T2DM患者是否会升高糖尿病酮症酸中毒(diabetic ketoacidosis, DKA)风险的结论尚未统一,本研究对SGLT-2抑制剂治疗成人T2DM患者是否升高DKA的风险进行Meta分析,以期为临床提供参考,报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 检索策略** 通过计算机在美国国立医学图书馆数据库(PubMed)、医学文摘数据库(Embase)和Cochrane循证医学数据库(Cochrane Library)检索自建库至2023年12月31日收录的SGLT-2抑制剂治疗成人T2DM患者的随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)。检索词包括但不限于“sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor”“randomized controlled trial”“dapagliflozin”“canagliflozin”“empagliflozin”“ipragliflozin”“sotagliflozin”“tofogliflozin”“ertugliflozin”“luseogliflozin”等。

**1.2 文献选择标准** 入选标准:(1)患者均诊断为T2DM且年龄≥18岁。(2)观察组应用SGLT-2抑制剂治疗,对照组仅给予常规治疗,2组治疗时间相同且均≥12周。(3)结局指标或安全性分析包括DKA。(4)研究类型为RCT。(5)文献均已公开发表。排除

标准:(1)研究的干预措施不一致或内容不吻合。(2)内容为Meta分析、综述、病例报道及动物实验等。(3)研究的结局指标不一致。(4)无法获得研究结论数据及尚未公开发表的文献。

**1.3 资料提取与质量评价** 由本研究2位参与人员按相关标准独立筛选文献,再将筛选结果互相交换并加以核对,2位参与人员意见统一的文献纳入本研究,如存在意见分歧的文献则需2位共同讨论或由第3人进行判断是否将文献纳入。基本资料提取主要包括文献的第一作者、发表时间、样本量、研究对象性别及年龄、发生DKA情况、糖尿病病程、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin A1c, HbA<sub>1c</sub>)、空腹血糖、体质量指数(body mass index, BMI)、使用降糖药物种类及治疗时间等。文献质量采用Cochrane 6.1的7项评价指标加以评估,如全部符合标准提示低偏倚风险,质量判定“高”;如部分符合标准提示中度偏倚可能性,质量判定“中等”;如完全不符合标准提示存在高度偏倚风险,质量判定“低”。

**1.4 统计学方法** 采用RevMan5.4版软件进行统计学分析。结局资料为二分类资料,统计结果用合并后的相对危险度(relatedrisk, RR)及95%CI描述,计数资料以频数或率(%)表示。应用 $\chi^2$ 检验和 $I^2$ 检验评估纳入研究间的异质性,如 $I^2 < 50\%$ 且 $P > 0.1$ 则无异质性,分析使用固定效应模型;如 $I^2 \geq 50\%$ 或 $P < 0.1$ 则有异质性,分析使用随机效应模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 文献筛选结果及一般资料** 共检索文献9 663篇,其中PubMed 1 846篇、Embase 3 899篇、Cochrane Library 3 918篇,去除重复文献1 107篇、干预措施不一致2 075篇、内容不吻合3 064篇、Meta分析1 339篇、综述1 307篇、病例报道33篇、动物实验128篇、非RCT 18篇、试验方法不吻合15篇、结局指标不一致507篇、无法获得全文或数据44篇,最终纳入文献26篇,全部为英文文献。26篇文献共涉及65 176例患者,其中SGLT-2抑制剂组37 021例,发生DKA 106例;对照组28 155例,发生DKA 33例。纳入文献一般资料见表1。

表 1 纳入文献临床资料及文献质量

Tab. 1 Clinical data and literature quality included in the literature

作者	年份	样本量(例)		性别(男/女)		年龄(岁)		体质质量指数(kg/m <sup>2</sup> )		治疗时间 (周)	文献质量
		观察组	对照组	观察组	对照组	观察组	对照组	观察组	对照组		
Zinman 等 <sup>[2]</sup>	2015	4687	2333	2686/2001	1376/957	62.4 ± 7.8	61.1 ± 8.2	28.2 ± 3.1	28.0 ± 3.3	76	高
Neal 等 <sup>[3]</sup>	2017	5790	4344	3065/2725	2428/1916	56.8 ± 9.2	57.3 ± 8.9	27.3 ± 3.2	27.4 ± 3.0	70	高
Wiviott 等 <sup>[4]</sup>	2019	8575	8570	6396/2179	6223/2347	55.3 ± 8.0	56.2 ± 7.6	29.2 ± 2.4	29.0 ± 2.6	104	高
Allegretti 等 <sup>[5]</sup>	2019	157	155	85/72	82/73	69.9 ± 6.5	68.4 ± 6.2	27.3 ± 3.3	27.5 ± 3.6	52	高
Araki 等 <sup>[6]</sup>	2017	123	60	71/52	32/28	57.3 ± 9.7	58.3 ± 9.0	30.2 ± 2.1	30.3 ± 2.2	70	中
Aronson 等 <sup>[7]</sup>	2018	308	153	157/151	78/75	64.3 ± 7.2	63.0 ± 7.6	28.4 ± 2.0	28.5 ± 2.1	64	中
Bhatt 等 <sup>[8]</sup>	2021	5291	5286	3695/1596	3691/1595	62.8 ± 7.0	63.7 ± 7.5	30.1 ± 2.8	30.2 ± 2.6	102	中
Cannon 等 <sup>[9]</sup>	2020	5493	2745	3570/1923	1795/950	65.9 ± 8.8	67.1 ± 8.4	28.6 ± 2.5	28.1 ± 2.9	78	中
Cho 等 <sup>[10]</sup>	2019	36	35	23/13	21/14	64.2 ± 7.2	64.9 ± 7.6	27.9 ± 3.6	28.3 ± 3.9	24	低
Dagogo-Jack 等 <sup>[11]</sup>	2018	309	153	191/118	98/55	58.1 ± 5.2	58.0 ± 4.8	27.1 ± 3.6	27.5 ± 3.8	48	高
Ferdinand 等 <sup>[12]</sup>	2019	80	77	47/33	44/33	55.1 ± 9.3	55.6 ± 9.8	30.2 ± 2.5	30.6 ± 2.8	32	高
Fioretto 等 <sup>[13]</sup>	2018	160	161	98/62	100/61	60.3 ± 7.5	60.9 ± 7.9	29.1 ± 2.0	29.7 ± 2.2	64	中
Raven 等 <sup>[14]</sup>	2023	1048	332	696/352	223/109	59.0 ± 8.0	59.4 ± 7.8	28.3 ± 2.3	28.3 ± 2.5	48	高
Sugawara 等 <sup>[15]</sup>	2023	158	159	84/74	87/72	57.3 ± 7.9	56.5 ± 8.3	28.1 ± 2.6	28.5 ± 2.3	84	高
Han 等 <sup>[16]</sup>	2018	73	66	45/28	41/25	52.6 ± 10.4	53.3 ± 10.6	29.9 ± 3.1	29.3 ± 3.3	52	中
Hollander 等 <sup>[17]</sup>	2018	888	437	522/366	259/178	56.0 ± 8.9	55.2 ± 9.4	27.9 ± 3.2	27.4 ± 3.0	26	中
Kang 等 <sup>[18]</sup>	2023	328	66	228/100	43/23	62.3 ± 9.1	63.0 ± 10.1	30.0 ± 1.8	29.4 ± 2.0	26	低
Ishihara 等 <sup>[19]</sup>	2016	168	87	101/67	55/32	66.1 ± 5.5	66.6 ± 6.2	29.6 ± 2.0	29.4 ± 1.8	104	高
Ito 等 <sup>[20]</sup>	2017	32	34	20/12	22/12	63.0 ± 8.2	62.5 ± 7.9	28.1 ± 2.6	28.7 ± 2.6	84	高
Ji 等 <sup>[21]</sup>	2019	339	167	233/106	112/55	58.0 ± 7.1	57.2 ± 7.5	27.3 ± 2.9	27.8 ± 2.8	96	高
Kadowaki 等 <sup>[22]</sup>	2017	70	68	48/22	49/19	55.9 ± 10.3	56.2 ± 9.9	30.0 ± 2.4	29.3 ± 2.4	50	中
Katakami 等 <sup>[23]</sup>	2020	169	171	108/61	110/61	57.7 ± 8.6	57.7 ± 9.0	27.7 ± 3.4	28.6 ± 3.2	35	低
Kawamori 等 <sup>[24]</sup>	2018	182	93	121/61	63/30	57.9 ± 9.2	58.4 ± 9.1	29.2 ± 2.1	28.4 ± 2.2	76	高
Liu 等 <sup>[25]</sup>	2021	53	53	28/25	27/26	56.3 ± 8.9	57.1 ± 9.7	29.1 ± 3.4	28.2 ± 3.4	52	高
Lu 等 <sup>[26]</sup>	2021	304	153	219/85	112/41	62.7 ± 4.9	63.8 ± 5.6	28.1 ± 2.9	28.7 ± 3.0	48	高
Tanaka 等 <sup>[27]</sup>	2023	2200	2197	1183/1017	1187/1010	59.5 ± 7.7	60.7 ± 8.6	28.6 ± 2.7	29.6 ± 3.2	50	高

2.2 SGLT-2 抑制剂引发 DKA 的风险分析 对纳入的 26 篇文献进行异质性检验,  $I^2 = 0$  且  $P = 0.901$ , 采用固定效应模型对各数据进行 Meta 分析,结果显示, SGLT-2 抑制剂组 DKA 事件的发生率为 0.29% (106/37 021), 对照组 DKA 事件的发生率为 0.12% (33/28 155)。SGLT-2 抑制剂组发生 DKA 风险显著高于对照组 ( $RR = 2.71, 95\% CI 1.84 \sim 3.97, P < 0.001$ ), 见表 2。

2.3 不同亚组患者发生 DKA 风险的 Meta 分析结果 对患者年龄、BMI、用药时间及药物种类进行亚组分析,结果显示在年龄  $> 60$  岁的患者中, SGLT-2 抑制剂组比对照组发生 DKA 的风险更高 ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ );  $BMI \geq 31 \text{ kg/m}^2$  的患者中, SGLT-2 抑制剂组比对照组发生 DKA 的风险更高 ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.82 \sim 4.07, P < 0.001$ ); 在治疗时间  $> 52$  周的患者中, SGLT-2 抑制剂组比对照组发生 DKA 的风险更高 ( $RR = 2.73, 95\% CI 1.84 \sim 4.05, P < 0.001$ ); 在药物种类亚组中, 卡格列净 ( $RR = 4.82, 95\% CI 1.70 \sim 13.64, P = 0.003$ )、埃格列净 ( $RR =$

4.10, 95% CI 1.11 ~ 15.20,  $P = 0.040$ ) 比对照组发生 DKA 的风险更高,见表 3。

### 3 讨论

本研究纳入的 26 个 RCT 文献,涵盖了 VERTIS、EMPA-REG OUTCOME、DERIVE、CREDENCE、IOLITE、CANVAS、DECLARE-TIMI58 等关于 SGLT-2 抑制剂的大型临床研究,总权重约 56.6%,结果提示,使用 SGLT-2 抑制剂会增加 T2DM 患者发生 DKA 的风险,尽管 SGLT-2 抑制剂组的 DKA 事件发生率非常低 (0.29%),但 SGLT-2 抑制剂组发生 DKA 风险仍显著高于对照组 ( $RR = 2.71, 95\% CI 1.84 \sim 3.97, P < 0.001$ )。进一步行亚组(包括年龄、BMI、治疗时间及药物种类)分析,结果提示使用 SGLT-2 抑制剂增加了年龄  $> 60$  岁、 $BMI \geq 31 \text{ kg/m}^2$ 、治疗时间  $> 52$  周的成人 T2DM 患者发生 DKA 的风险,同时应用卡格列净、埃格列净治疗的患者发生 DKA 的风险更高。但因各治疗药物纳入的文献数量不同,将会使结论发生偏倚,导致可比性降低,仍需扩大 SGLT-2 抑制剂不同药物相关研究数量对该结论加以验证。

表 2 SGLT-2 抑制剂组与对照组发生 DKA 风险

Tab. 2 Risk of DKA in SGLT-2 inhibitor group and control group

作者	观察组		对照组		权重 (%)	固定效应模型		模型森林图
	DKA 事件	总例数	DKA 事件	总例数		RR	95% CI	
Zinman 等 <sup>[2]</sup>	4	4687	1	2333	3.7	1.98	0.23 ~ 17.81	
Neal 等 <sup>[3]</sup>	12	5790	3	4344	9.5	3.01	0.86 ~ 10.64	
Wiviott 等 <sup>[4]</sup>	27	8575	12	8570	33.2	2.26	1.15 ~ 4.43	
Allegretti 等 <sup>[5]</sup>	0	157	0	155	-	-	-	
Araki 等 <sup>[6]</sup>	0	123	0	60	-	-	-	
Aronson 等 <sup>[7]</sup>	0	308	0	153	-	-	-	
Bhatt 等 <sup>[8]</sup>	30	5291	14	5286	38.8	2.15	1.15 ~ 4.02	
Cannon 等 <sup>[9]</sup>	19	5493	2	2745	7.4	4.76	1.12 ~ 20.36	
Cho 等 <sup>[10]</sup>	0	36	0	35	-	-	-	
Dagogo-Jack 等 <sup>[11]</sup>	0	309	0	153	-	-	-	
Ferdinand 等 <sup>[12]</sup>	0	80	0	77	-	-	-	
Fioretto 等 <sup>[13]</sup>	0	160	0	161	-	-	-	
Raven 等 <sup>[14]</sup>	0	1048	0	332	-	-	-	
Sugawara 等 <sup>[15]</sup>	1	158	0	159	1.4	3.03	0.13 ~ 73.56	
Han 等 <sup>[16]</sup>	0	73	0	66	-	-	-	
Hollander 等 <sup>[17]</sup>	1	888	0	437	1.9	1.49	0.07 ~ 36.22	
Kang 等 <sup>[18]</sup>	0	328	0	66	-	-	-	
Ishihara 等 <sup>[19]</sup>	0	168	0	87	-	-	-	
Ito 等 <sup>[20]</sup>	0	32	0	34	-	-	-	
Ji 等 <sup>[21]</sup>	0	339	0	167	-	-	-	
Kadowaki 等 <sup>[22]</sup>	0	70	0	68	-	-	-	
Katakami 等 <sup>[23]</sup>	0	169	0	171	-	-	-	
Kawamori 等 <sup>[24]</sup>	0	182	0	93	-	-	-	
Liu 等 <sup>[25]</sup>	1	53	0	53	1.4	3.01	0.13 ~ 72.03	
Lu 等 <sup>[26]</sup>	0	304	0	153	-	-	-	
Tanaka 等 <sup>[27]</sup>	11	2200	1	2197	2.8	10.97	1.43 ~ 85.02	
合计	106	37021	33	28155	100	2.71	1.84 ~ 3.97	0.01 0.1 1 10 100

异质性检验: $\chi^2 = 3.441, df = 8, I^2 = 0, P = 0.901$   
合并效应量检验: $Z = 5.022, P < 0.001$

SGLT-2 抑制剂组 对照组

表 3 不同亚组患者发生 DKA 风险分析

Tab. 3 Risk analysis of DKA in different subgroups of patients

项目	例数 (事件数/总数)	观察组 (事件数/总数)	对照组 (事件数/总数)	固定效应模型		异质性结果	
				RR(95% CI)	P 值	P 值	$I^2$ 值 (%)
年龄	≤60 岁 3/8640	3/5624	0/3016	2.38(0.38 ~ 14.75)	0.351	0.941	0
	>60 岁 136/56536	103/31397	33/25139	2.73(1.84 ~ 4.05)	<0.001	0.651	0
BMI	<31 kg/m <sup>2</sup> 7/13650	6/8968	1/4682	2.42(0.52 ~ 11.59)	0.272	0.972	0
	≥31 kg/m <sup>2</sup> 132/51526	100/28053	32/23473	2.73(1.82 ~ 4.07)	<0.001	0.643	0
治疗时间	≤52 周 3/9678	3/5715	0/3963	2.38(0.39 ~ 14.75)	0.356	0.944	0
	>52 周 136/55498	103/31306	33/24192	2.73(1.84 ~ 4.05)	<0.001	0.651	0
药物种类	卡格列净 27/13714	23/7497	4/6217	4.82(1.70 ~ 13.64)	0.003	0.282	14
	达格列净 39/17176	27/8541	12/8635	2.26(1.15 ~ 4.43)	0.021	-	-
	恩格列净 6/10498	5/6863	1/3635	2.28(0.39 ~ 13.66)	0.372	0.845	0
	埃格列净 22/11242	20/7378	2/3864	4.10(1.11 ~ 15.20)	0.040	0.512	0
	索格列净 44/9777	30/4991	14/4786	2.15(1.13 ~ 4.02)	0.020	-	-
	其他 1/2769	1/1751	0/1018	3.03(0.14 ~ 73.56)	0.502	-	-

DKA 作为糖尿病并发症中最严重的一类, 明显高血糖、血酮升高、代谢性酸中毒是其三大临床表现。Kang 等<sup>[18]</sup>研究结论提示, SGLT-2 抑制剂导致的 DKA

与普通 DKA 相比, 肾脏对葡萄糖的清除率增高约 2 倍, 由尿液排出葡萄糖引发的血糖下降大于因胰岛素抵抗以及内源性生成葡萄糖而引发血糖增高的程度,

故 SGLT-2 抑制剂导致的 DKA 通常不伴有血糖升高, 称为正常血糖性 DKA。目前 SGLT-2 抑制剂导致 DKA 相关机制包括以下几点:(1)SGLT-2 抑制剂导致胰高血糖素/胰岛素比值增加, 导致酮体在体内蓄积。Fioretto 等<sup>[13]</sup>发现大脑中也存在 SGLT-2, 达格列净可通过中枢分泌的儿茶酚胺间接刺激胰岛  $\alpha$  细胞分泌胰高血糖素。Kawamori 等<sup>[24]</sup>对日本 T2DM 患者研究结果提示, 恩格列净使胰高血糖素/胰岛素比值增加了 25%, 因 SGLT-2 是在胰岛  $\alpha$  细胞表达, 抑制 SGLT-2 可直接刺激分泌胰高血糖素。故 SGLT-2 抑制剂间接或直接促进了胰高血糖素表达水平升高, 使得胰高血糖素/胰岛素比值增加进而使体内蓄积酮体水平明显增加。(2)SGLT-2 抑制剂使酮体被肾脏清除的作用被抑制。Allegretti 等<sup>[5]</sup>研究结果提示, SGLT-2 抑制剂可轻度降低 3 期以下慢性肾脏病与肾功能正常患者的肾小球滤过率, 导致酮体被肾小球滤过减少引发体内蓄积酮体增多。(3)SGLT-2 抑制剂通过促进脂肪酸氧化而增加酮体生成。Ishihara 等<sup>[19]</sup>研究发现, 伊格列净以保证机体能量消耗整体不变为前提, 可通过促进脂肪酸氧化分解释放能量, 来替代葡萄糖为机体提供能量, 还可使体质量下降, 但脂肪酸氧化过程中会导致体内蓄积更多酮体。(4)SGLT-2 抑制剂具有利尿作用而降低血容量引发脱水, 从而加快 DKA 进展。Aronson 等<sup>[7]</sup>研究发现患者脱水后血浆中儿茶酚胺及糖皮质激素水平增加了 100% ~ 600%, 脱水导致脂解激素增高而引发酮体生成增加。

本研究亚组分析结果提示, 年龄较大、肥胖、治疗时间长的成年 T2DM 患者发生 DKA 的风险更高, 分析其原因包括以下 3 个方面:(1)老年患者胰岛功能降低, 胰岛素分泌减少, 因 SGLT-2 抑制剂增加了尿液中葡萄糖的排出, 血糖水平变得相对较低, 相应刺激胰腺分泌胰岛素的作用随之减少, 使老年患者体内胰岛素缺乏程度加重, 进一步升高胰高血糖素/胰岛素的比值。(2)胰岛素水平降低导致胰岛素抑制脂肪分解活性降低, 导致产生过多游离脂肪酸, 这些游离脂肪酸在肝脏中经过  $\beta$ -氧化转化为酮体。(3)Jespersen 等<sup>[28]</sup>研究发现, 老年患者对脱水具有较差耐受性, 出现低容量相关不良事件风险显著升高。肥胖患者更容易发生 DKA 可能是因为在降糖治疗的同时, 采取了低碳水化合物饮食、运动等减重措施。另外 SGLT-2 抑制剂可抑制肾脏对酮体的清除<sup>[29]</sup>。以上原因共同导致酮体在体内的蓄积, 所以治疗时间越长导致 DKA 的风险就越高。

已发表的 4 项 Meta 分析提示, SGLT-2 抑制剂与

T2DM 患者 DKA 风险的增加并无相关性。Saad 等<sup>[30]</sup>共纳入 81 项研究涉及 37 195 例患者, SGLT-2 抑制剂组患者 DKA 发生率与对照组发生率相似 ( $OR = 1.36$ , 95% CI 0.39 ~ 4.74,  $P = 0.63$ ), 该 Meta 分析纳入的部分研究患者中途退出与失访的比例较大。Donnan 等<sup>[31]</sup>共纳入 8 项研究, 结果提示 SGLT-2 抑制剂与安慰剂组比较在 DKA 发生率的差异并无统计学意义 ( $RR = 0.66$ , 95% CI 0.30 ~ 1.45)。Liu 等<sup>[32]</sup>共纳入 10 项 RCT 涉及 13 134 例患者, 发生 14 个 DKA 事件, SGLT-2 抑制剂组 DKA 发生率与对照组相比并无显著增加 ( $OR = 1.71$ , 95% CI 0.56 ~ 5.20)。Colacci 等<sup>[33]</sup>共纳入 72 项 RCT, 结果提示 SGLT-2 抑制剂导致 T2DM 患者 DKA 的风险可以被忽略 ( $OR = 1.25$ , 95% CI 0.56 ~ 2.79,  $P = 0.753$ )。与以上各 Meta 分析比较, 本研究具有更大的样本量、增加了最新的试验结论, 结果发现 SGLT-2 抑制剂可增加成人 T2DM 患者 DKA 的风险, 且进一步行亚组分析提示长期使用 SGLT-2 抑制剂的年龄较大、肥胖的 T2DM 患者具有更高的 DKA 发生风险, 均与上述 Meta 分析结论不符。

综上所述, 众多临床研究已证实 SGLT-2 抑制剂除了具有降血糖效果, 还可发挥降血压、降尿酸、调节血脂、降低体质量及保护心血管等作用, 具备十分广泛的临床前景。但 SGLT-2 抑制剂除了具有良好治疗效果, 临床应用中对于其潜在的不良反应也要引起足够的重视与关注。成人 T2DM 患者应用 SGLT-2 抑制剂会增加 DKA 风险, 且年龄越大 (> 60 岁)、BMI 越高 ( $\geq 31 \text{ kg/m}^2$ )、治疗时间越长 (> 52 周), 发生 DKA 的风险就越高。因此对于临幊上应用 SGLT-2 抑制剂治疗成人 T2DM 患者, 一方面要及时掌握患者是否具有高危因素(如年龄、体质量及治疗时间等), 另一方面需正确掌握及鉴别正常血糖性 DKA 的相关知识与技能。

#### 参考文献

- [1] 吕若琳, 刘松, 徐丽丽, 等. 钠-葡萄糖共转运体 2 抑制剂: 超越降糖作用的心肾保护作用及对 2 型糖尿病患者骨代谢和骨折风险的影响 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2022, 38 (9): 823-829. DOI: 10.3760/cma.j.cn311282-20220618-00388.
- [2] Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2015, 373 (22): 2117-2128. DOI: 10.1056/NEJMoa1504720.
- [3] Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2017, 377 (7): 644-657. DOI: 10.1056/NEJMoa1611925.
- [4] Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2019, 380 (4): 347-357. DOI: 10.1056/NEJMoa1812389.

- [5] Allegretti AS, Zhang W, Zhou W, et al. Safety and effectiveness of hexaglifoxin in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 3a/3b CKD [J]. Am J Kidney Dis, 2019, 74 (3) : 328-337. DOI: 10.1053/j.ajkd.2019.03.417.
- [6] Araki E, Onishi Y, Asano M, et al. Efficacy and safety of dapaglifoxin over 1 year as add-on to insulin therapy in Japanese patients with type 2 diabetes: The DAISY (dapaglifoxin added to patients under insulin therapy) trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2017, 19 (4) : 562-570. DOI: 10.1111/dom.12853.
- [7] Aronson R, Frias J, Goldman A, et al. Long-term efficacy and safety of ertugliflozin monotherapy in patients with inadequately controlled T2DM despite diet and exercise: VERTIS MONO extension study [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (6) : 1453-1460. DOI: 10.1111/dom.13251.
- [8] Bhatt DL, Szarek M, Pitt B, et al. Sotagliflozin in patients with diabetes and chronic kidney disease [J]. N Engl J Med, 2021, 384 (2) : 129-139. DOI: 10.1056/NEJMoa2030186.
- [9] Cannon C, Pratley R, Dagogo-Jack S, et al. Cardiovascular outcomes with ertugliflozin in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2020, 383 (15) : 1425-1435. DOI: 10.1056/NEJMoa2004967.
- [10] Cho KY, Nakamura A, Omori K, et al. Effect of switching from pioglitazone to the sodium glucose co-transporter-2 inhibitor dapaglifoxin on body weight and metabolism related factors in patients with type 2 diabetes mellitus: An open-label, prospective, randomized, parallel-group comparison trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21 (3) : 710-714. DOI: 10.1111/dom.13557.
- [11] Dagogo-Jack S, Liu J, Eldor R, et al. Efficacy and safety of the addition of ertugliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with metformin and sitagliptin: The VERTIS SITA2 placebo-controlled randomized study [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (3) : 530-540. DOI: 10.1111/dom.13116.
- [12] Ferdinand KC, Izzo JL, Lee J, et al. Antihyperglycemic and blood pressure effects of empaglifoxin in black patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension [J]. Circulation, 2019, 139 (18) : 2098-2109. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036568.
- [13] Fioretto P, Del Prato S, Buse JB, et al. Efficacy and safety of dapaglifoxin in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (chronic kidney disease stage 3A): The DERIVE study [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (11) : 2532-2540. DOI: 10.1111/dom.13413.
- [14] Raven LM, Muir CA, Kessler Iglesias C, et al. Sodium glucose co-transporter 2 inhibition with empaglifoxin on metabolic, cardiac and renal outcomes in recent cardiac transplant recipients (EMPA-HTx): protocol for a randomised controlled trial [J]. BMJ Open, 2023, 13 (3) : e069641. DOI: 10.1136/bmjopen-2022-069641.
- [15] Sugawara M, Fukuda M, Sakuma I, et al. Overall efficacy and safety of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin versus dipeptidyl-peptidase 4 inhibitors: Multicenter, open-label, randomized-controlled trial (J-SELECT study) [J]. Diabetes Ther, 2023, 14 (9) : 1517-1535. DOI: 10.1007/s13300-023-01438-w.
- [16] Han KA, Chon S, Chung CH, et al. Efficacy and safety of ipragliflozin as an add-on therapy to sitagliptin and metformin in Korean patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (10) : 2408-2415. DOI: 10.1111/dom.13394.
- [17] Hollander P, Liu J, Hill J, et al. Ertugliflozin compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin: The VERTIS SU randomized study [J]. Diabetes Ther, 2018, 9 (1) : 193-207. DOI: 10.1007/s13300-017-0354-4.
- [18] Kang A, Smyth B, Neuen BL, et al. The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor canagliflozin does not increase risk of non-genital skin and soft tissue infections in people with type 2 diabetes mellitus: A pooled post hoc analysis from the CANVAS Program and CREDENCE randomized double-blind trials [J]. Diabetes Obes Metab, 2023, 25 (8) : 2151-2162. DOI: 10.1111/dom.15091.
- [19] Ishihara H, Yamaguchi S, Nakao I, et al. Efficacy and safety of ipragliflozin as add-on therapy to insulin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus (IOLITE): A multi-centre, randomized, placebo-controlled, double-blind study [J]. Diabetes Obes Metab, 2016, 18 (12) : 1207-1216. DOI: 10.1111/dom.12745.
- [20] Ito D, Shimizu S, Inoue K, et al. Comparison of ipragliflozin and pioglitazone effects on nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: A randomized, 24-week, open-label, active-controlled trial [J]. Diabetes Care, 2017, 40 (10) : 1364-1372. DOI: 10.2337/dc17-0518.
- [21] Ji L, Liu Y, Miao H, et al. Safety and efficacy of ertugliflozin in Asian patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with metformin monotherapy: VERTIS Asia [J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21 (6) : 1474-1482. DOI: 10.1111/dom.13681.
- [22] Kadokawa T, Inagaki N, Kondo K, et al. Efficacy and safety of canagliflozin as add-on therapy to teneligliptin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: results of a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2017, 19 (6) : 874-882. DOI: 10.1111/dom.12898.
- [23] Katakami N, Mita T, Yoshi H, et al. Tofogliflozin does not delay progression of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: A prospective, randomized, open-label, parallel-group comparative study [J]. Cardiovasc Diabetol, 2020, 19 (1) : 110. DOI: 10.1186/s12933-020-01079-4.
- [24] Kawamori R, Haneda M, Suzuki K, et al. Empaglifoxin as add-on to linagliptin in a fixed-dose combination in Japanese patients with type 2 diabetes: glycaemic efficacy and safety profile in a 52-week, randomized, placebo-controlled trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (9) : 2200-2209. DOI: 10.1111/dom.13352.
- [25] Liu SC, Lee CC, Chuang SM, et al. Comparison of efficacy and safety of empaglifoxin vs linagliptin added to premixed insulin in patients with uncontrolled type 2 diabetes: A randomized, open-label study [J]. Diabetes Metab, 2021, 47 (3) : 101184. DOI: 10.1016/j.diabet.2020.08.001.
- [26] Lu J, Fu L, Li Y, et al. Henaglifoxin monotherapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on diet and exercise: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Diabetes Obes Metab, 2021, 23 (5) : 1111-1120. DOI: 10.1111/dom.14314.

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 019

罕见病例

# 复发型马德龙综合征合并扩张型心肌病 1 例

徐云虎, 张万群, 曾秋蓉, 胡建川

作者单位: 408000 重庆, 重庆大学附属涪陵医院

通信作者: 张万群, E-mail: 1058611656@qq.com



【摘要】 报道 1 例复发型马德龙综合征合并扩张型心肌病患者的临床资料,并进行文献复习。

【关键词】 马德龙综合征; 酒精性肝病; 扩张型心肌病; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R542.2; R589.2

【文献标识码】 B

**A case of relapsing Madron syndrome complicated with dilated cardiomyopathy** Xu Yunhu\*, Zhang Wanqun, Zeng

Qiurong, Hu Jianchuan. \*Fuling Hospital Affiliated to Chongqing University, Chongqing 408000, China

Corresponding author: Zhang Wanqun, E-mail: 1058611656@qq.com

【Abstract】 The clinical data of a patient with relapsing Madron syndrome complicated with dilated cardiomyopathy were reported and the literature was reviewed.

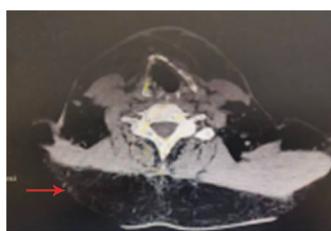
【Key words】 Madron syndrome; Alcoholic liver disease; Dilated cardiomyopathy; Diagnosis; Treatment

患者,男,54岁,因“全身水肿5d”于2024年4月2日入院。2019年6月患者发现颈部、枕部、颌下有多个结节性肿块,较大者约7cm,于外院行手术切除。2019年11月颈部、枕部、颌下再次出现结节状肿块,高低不平,较大者直径约12cm,再次行手术切除治疗。术后患者自觉再次出现颈、项部无痛性肿块,逐渐增大,未重视。2024年3月29日患者无明显诱因出现全身性水肿,伴有“喘累”,为进一步诊治就诊我院。患者否认糖尿病、肝炎等其他病史,且家族无类似疾病史,大量饮酒史30余年。入院查体:颌下、颈枕部可见不规则隆起肿块,边界不清,活动性稍差,尤以颈部肿块较大、对称,无压痛、红肿渗出、破溃流脓;胸廓对称无畸形,双侧呼吸动度对称,语颤减弱,双肺叩诊呈浊音,呼吸音粗糙,未闻及干、湿啰音;心前区无隆起,心尖搏动左下移位,搏动位于第五肋间左锁骨中线外侧0.5cm,搏动范围直径约2.0cm,心脏浊音界向两侧扩大,心率77次/min,心律齐,二尖瓣、三尖瓣区可闻及收缩期吹风样杂音;腹部膨大而软,肋骨以下未触及肝脏和脾脏;腰骶部、双下肢重度水肿;双脚足背触觉轻度减退,踇趾存在,但局部伴有溃疡,其余足趾缺如。实验室检查:肝功能检查示ALT 217.40 U/L, AST 208.00 U/L, GGT 126.9 U/L, ALP 128.0 U/L, 总胆红素(TBIL)42.11 μmol/L, 非结合胆红素(UCB)17.86 μmol/L, 结合胆红素(CBL)24.25 μmol/L;空腹静脉血糖6.17 mmol/L;脑钠肽前体(pro-BNP)3920.00 ng/L;降钙素原定量(PCT)0.074 μg/L;D-二聚体(D-Dimer)6.71 mg/L;其余未见明显异常。影像学检查:颈部CT示颈部及肩背部见大量无包膜脂肪团块堆积,双侧颈部未见明显肿大淋巴结,邻近气管、食管未见明显压迫(图1);肺部CT示左侧胸腔少量积液,右侧胸腔中量积液,右侧叶间裂少量积液(图2),左房稍增大,心包少量积液,右冠状动脉

钙化;心脏彩超+左心功能+室壁运动+TDI示全心增大,二尖瓣、三尖瓣重度反流,主动脉瓣、肺动脉瓣轻度反流,左室收缩及舒张功能降低,左室壁运动不协调,心包微量积液(图3);腹部彩超检查示肝回声密集,肝静脉增宽(酒精肝可能),腹腔可见积液(图4)。结合患者病史、查体及相关辅助检查,确诊为“马德龙综合征(Madron syndrome, MS) I型、酒精性肝炎、心力衰竭、扩张型心肌心病”。治疗予戒酒宣教,多烯磷脂酰、谷胱甘肽保护肝功能、抗氧化应激治疗,硝酸甘油扩张血管、托拉塞米纠正心力衰竭,沙库巴曲、螺内酯、比索洛尔逆转心室重构治疗,于2024年4月12日患者症状好转出院。

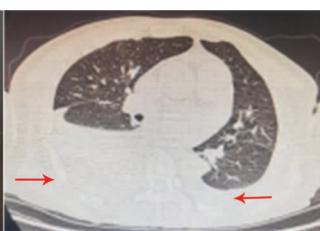
**讨 论** 马德龙综合征(MS)又称良性对称性脂肪瘤病,是一种主要由脂肪代谢障碍引起的脂肪组织弥漫性、对称性沉积于颈部和肩部等典型部位皮下脂肪沉积的疾病,一定程度影响颈部功能及外形,严重者会形成压迫症状,如呼吸和/或吞咽困难。根据以往文献报道,MS发病率约为1/25 000<sup>[1]</sup>,是较罕见的疾病,国内目前报道病例约500例<sup>[2]</sup>,通常影响30~50岁的中年男性<sup>[3]</sup>,并且大部分患者一般有长期大量饮酒史,少数患者会合并酒精性肝病、周围神经损伤等代谢性疾病。

临幊上一般将MS分为3种类型<sup>[4]</sup>: I型主要发生于男性,其特点是颈部(“牛颈”征)、上臂和大腿对称分布浅表脂肪团,具有“伪运动”外观,很可能引起压迫症状; II型病变肥胖与正常的肥胖相似,与性别差异无关,病变主要发生在上背部、上臂、背部、腿部; III型为先天性躯干周围脂肪堆积。MS的病理特征是无包膜脂肪瘤或脂肪组织增生,其影像学为皮下组织或肌肉空间中脂肪组织的广泛对称沉积,没有明确的边界。脂肪的密度和信号强度基本正常,脂肪组织可出现线性或网状纤维、钙化或骨化,周围肌肉和血管会因增生的脂肪组织受压而



注:颈部及肩背部见大量无包膜脂肪团块堆积

图 1 患者颈部 CT 表现



注:右侧胸腔中量积液,左侧胸腔少量积液

图 2 患者肺部 CT 表现



注:全心增大,二尖瓣、三尖瓣重度反流,主动脉瓣、肺动脉瓣轻度反流

图 3 患者心脏彩超



注:肝回声密集,肝静脉增宽

图 4 患者腹部彩超

发生位移和变形,并且受压肌肉可出现萎缩,功能下降。

目前 MS 的病因及其发病机制尚不清楚,Vassallo 等<sup>[5]</sup>认为线粒体功能障碍导致与脂肪分解代谢基因发生突变,使脂肪细胞呈瘤样增生。目前其他病因的相关假设还包括细胞色素 C 氧化酶活性降低或儿茶酚胺刺激的脂肪分解受阻<sup>[6]</sup>;已确定其促发因素包括酗酒、HIV 感染和其他代谢紊乱,如糖耐量异常、胰岛素分泌过多、高尿酸血症、肾小管性酸中毒、肝酶水平改变以及甲状腺、肾上腺、垂体和睾丸功能异常<sup>[7]</sup>。已经证实酒精可能诱导脂肪组织 β-肾上腺素能受体功能障碍<sup>[8]</sup>,影响线粒体活性和脂肪分解。此患者既往长期大量饮酒,并且肝功能异常,腹部彩超提示肝回声密集,肝静脉增宽,考虑酒精肝,因此符合 MS 临床特点<sup>[3]</sup>。

MS 治疗方式包括生活方式的改变(戒酒)、体质量调节、药物治疗和手术治疗<sup>[9]</sup>。广泛的脂肪切除术是 MS 的标准治疗方法。但本病的脂肪瘤无包膜,手术切除难度大,且术后复发率高,除此之外,MS 也可发生恶变,因此术后定期随访至关重要。既往研究中,降脂药可中断脂肪瘤的生长<sup>[10]</sup>;Rodriguez 等<sup>[11]</sup>研究证明脱氧胆酸盐治疗脂肪瘤有一定效果,可破坏脂肪细胞膜,导致脂肪细胞溶解、局灶性坏死和急性炎性反应。还有报道<sup>[12]</sup>认为可以通过降低颈胸部棕色脂肪组织中 18F-氟代脱氧葡萄糖的摄取,达到治疗目的。但这些药物在临床上的效果还有待进一步证明,目前鲜见相关报道。同时采用单细胞 RNA 测序技术,会为研究 MD 的生物学特性提供新的视角<sup>[13]</sup>,有望为靶向治疗提供重要的临床依据。另外,此患者在 MS 基础上合并扩张型心肌病,心脏彩超提示双侧心室扩大,主要以左心室扩大为主,并伴有收缩功能障碍。研究表明,扩张型心肌病的核心病理改变是心肌细胞的凋亡和心肌纤维化,最终导致心肌重塑和心电传导障碍。扩张型心肌病与 MS 在发病机制上是否有相关性及重叠性有待进一步研究。

综上所述,MS 是一种以皮下脂肪沉积为主要特征的疾病,其病因及发病机制尚未明确,可能与长期大量饮酒有关。MS 的治疗主要以广泛的脂肪切除术为主,其余未见针对性治疗手段,需要不断探索新的机制及治疗方案。

## 参考文献

- [1] 彭欣,卿笃信. 马德龙综合征 6 例报告 [J]. 内科, 2019, 14(3): 377-378, 327. DOI: 10.16121/j.cnki.cn45-1347/r.2019.03.39.
- [2] 黄景昊,周广磊,孙甲甲,等. 马德龙病 1 例报告及文献复习 [J]. 中国现代普通外科进展, 2021, 24(12): 1003-1005. DOI: 10.3969/j.issn.1009-9905.2021.12.022.
- [3] 王菲,王炳元. 酒精性肝病的少见表现:马德龙综合征 [J]. 实用肝脏病杂志, 2014(3): 287-290. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5069.2014.03.017.
- [4] 向之明,梁翠媚,叶海鸣,等. 胸腺类癌的 CT 表现及相关文献复习 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(3): 557-559. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2010.03.049.
- [5] Vassallo GA, Mirijello A, Tarli C, et al. Madelung's disease and acute alcoholic hepatitis: case report and review of literature [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6272-6276. DOI: 10.26355/eurrev\_201907\_18448.
- [6] Ray S, Chakraborty PP, Pramanik S, et al. Bilateral breast enlargement in a chronic alcoholic: do not miss Madelung's disease [J]. BMJ Case Rep, 2016, 2016: ber2016215082. DOI: 10.1136/ber-2016-215082.
- [7] Lee BH, Lee YM, Park SO, et al. A case report of Madelung's disease [J]. Arch Plast Surg, 2023, 50(5): 463-467. DOI: 10.1055/a-2122-6121.
- [8] Caponnetto F, Manini I, Bulfoni M, et al. Human adipose-derived stem cells in Madelung's disease: Morphological and functional characterization [J]. Cells, 2020, 10(1): 44. DOI: 10.3390/cells10010044.
- [9] Szewc M, Sitarz R, Moroz N, et al. Madelung's disease - progressive, excessive, and symmetrical deposition of adipose tissue in the subcutaneous layer: case report and literature review [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2018, 11: 819-825. DOI: 10.2147/DMSO.S181154.
- [10] Zeitler H, Ulrich-Merzenich G, Richter DF, et al. Multiple benign symmetric lipomatosis—A differential diagnosis of obesity. Is there a rationale for fibrate treatment [J]. Obes Surg, 2008, 18(10): 1354-1356. DOI: 10.1007/s11695-007-924-3
- [11] Rodriguez M, Beal BT, Khetarpal S, et al. Madelung disease treated with deoxycholic acid [J]. Dermatol Surg, 2021, 47(6): 879-880. DOI: 10.1097/DSS.0000000000002722.
- [12] 沈瑶,高泽俊,蔡振寨,等. 酒精性肝病合并马德龙病 1 例 [J]. 温州医科大学学报, 2023, 53(03): 250-251, 255. DOI: 10.1097/DSS.0000000000002722.
- [13] Ma X, Ma S, Cai D, et al. Analysis of Madelung disease based on sc-RNA sequencing: A case report and literature review [J]. Mol Immunol, 2023, 157: 195-201. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.04.005.

(收稿日期:2024-04-08)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 020

综述

# 黑地黄丸对慢性肾功能衰竭的作用机制研究进展

吴俊燕, 马超综述 赵平审校



基金项目: 山东省中医药科技项目(重点项目)(2021Z019)

作者单位: 271000 山东泰安, 泰安市中医医院肾病科

通信作者: 赵平, E-mail: 13583805637@163.com

**【摘要】** 慢性肾功能衰竭是所有原发性或继发性肾损害出现的系列症状或代谢紊乱组合而成的综合征, 临床以尿液异常、水代谢紊乱及电解质紊乱为主要表现。中医理论认为, 脾的运化功能必得肾阳的温煦蒸化才能化生气血精微, 而肾精必须依赖脾的运化精微滋养, 才能不致生化无源。而慢性肾功能衰竭多由脾肾虚损导致, 与先天不足、饮食不节、七情内伤、久病失治、房劳过度等多种因素耗伤正气有关, 故治疗需将补脾益肾贯穿始终。黑地黄丸方以苍术为君, 地黄为臣, 大枣为佐, 干姜为使, 常被单一或联合西医治疗慢性肾功能衰竭, 疗效颇佳。文章从调整胃肠激素紊乱、加强肠黏膜屏障、调节肠道菌群紊乱、调节脑—肠轴互动、保护肾功能、纠正肾性贫血方面等对黑地黄丸改善慢性肾功能衰竭的作用机制进行综述, 以为该药物相关机制研究及临床应用提供参考。

**【关键词】** 慢性肾功能衰竭; 黑地黄丸; 作用机制; 研究进展**【中图分类号】** R692.5      **【文献标识码】** A

**Research progress of Black Rehmannia Pill on chronic renal failure** Wu Junyan, Ma Chao, Zhao Ping. Department of Nephrology, Tai'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Shandong Province, Tai'an 271000, China

**Funding program:** Shandong Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project (Key Project) (2021Z019)

**Corresponding author:** Zhao Ping, E-mail: 13583805637@163.com

**【Abstract】** Chronic renal failure is a syndrome composed of a series of symptoms or metabolic disorders that occur in all primary or secondary kidney damage. Clinically, it is mainly characterized by abnormal urine, water metabolism disorders, and electrolyte imbalances. According to traditional Chinese medicine theory, the spleen's transport and transformation function requires the warm and steaming of kidney yang to generate qi, blood, and essence. The kidney essence must rely on the nourishment of the spleen's transport and transformation essence to prevent biochemical stagnation. Chronic renal failure is often caused by spleen and kidney deficiency, which is related to various factors such as congenital deficiencies, irregular diet, internal injuries to the seven emotions, prolonged illness without treatment, and excessive sexual activity that deplete the vital energy. Therefore, treatment should focus on nourishing the spleen and kidneys throughout the process. Black Rehmannia Pill is a common self-prepared traditional Chinese medicine, which uses Atractylodes macrocephala as the ruler, Rehmannia glutinosa as the minister, jujube as the accompaniment, and dried ginger as the agent. It is often used in modern medicine alone or in combination with Western medicine to treat chronic renal failure, and its efficacy is quite good. This article reviews the mechanism of Black Rehmannia Pill in improving chronic renal failure from the aspects of adjusting gastrointestinal hormone disorders, strengthening intestinal mucosal barrier, regulating intestinal microbiota disorders, regulating brain gut axis interaction, protecting renal function, and correcting renal anemia, in order to provide reference for the research and clinical application of this drug.

**【Key words】** Chronic renal failure; Black Rehmannia Pill; Mechanism; Research progress

据有关统计, 我国现有上亿人患慢性肾脏病, 成人慢性肾脏病患病率约为 10.8%, 且多数肾损伤易进展为慢性肾功能衰竭, 肾脏病的防治已经成为我国所面临的重要公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。根据其临床表现, 中医将其归属“关格”“虚劳”等范畴。虽然慢性肾功能衰竭的临床表现不同, 但其发病机制与脾肾两虚密切相关<sup>[2]</sup>。中医认为“肾如薪火, 脾如鼎金”, 脾之运化全赖肾中阳气之温煦蒸腾, 一旦脾失健运, 水湿内停, 肾虚气化不利, 淤不得泄, 升清降浊之功能紊乱, 湿浊内蕴, 日久必化为浊毒。可见, 脾肾两虚是慢性肾功能衰竭的本虚, 临时治疗注重补脾肾。黑地黄丸出自金代刘完素《素问病机气宜保命集》, 由苍术、熟地黄、大枣、干姜组成, 具有健脾补肾的功效, 主治脾肾不足、房劳虚损、形体瘦弱、全身乏力、面色青黄等症状, 具有巨大的临床应用潜力<sup>[3]</sup>。本文就黑地黄丸改善慢性肾功能衰竭的作用机制进行整理、归纳, 为进一步研究其临床应用提供参考。

## 1 调整胃肠激素紊乱

胃肠道是人体消化系统重要的器官,胃肠道内分泌细胞会释放胰岛素、胃动素、胰岛素等激素,从而参与胃肠道的运动功能<sup>[4-5]</sup>。在慢性肾功能衰竭时,患者体内许多蛋白质最终代谢产物不能由肾脏排出而蓄积于体内,容易引起食欲下降、纳差、恶心、呕吐、腹胀等现象,随着胃肠道持续刺激胃酸分泌明显增加,体内生理平衡被破坏导致胃肠激素紊乱<sup>[6]</sup>。杨可新等<sup>[7]</sup>对 118 例慢性肾功能衰竭患者分别给予口服黑地黄丸、尿毒清治疗,经治疗后采用口服黑地黄丸的患者血清胃泌素、胃动素、生长抑素均优于治疗前及采用尿毒清治疗的患者,证实黑地黄丸对调节慢性肾功能衰竭患者胃肠激素紊乱方面效果显著。另一项基础研究证实,黑地黄丸能够增加慢性肾功能衰竭大鼠十二指肠以及胃组织中的 SS、Ghrelin 表达<sup>[8]</sup>。苍术是黑地黄丸的重要成分,刘芬等<sup>[9]</sup>发现苍术提取物能够提高脾虚证动物模型的血浆 MTL、SP 和 SS 含量,证实苍术提取物对于胃肠功能障碍方面有着积极影响。高杰等<sup>[10]</sup>观察苍术对正常动物模型胃肠激素水平的影响,发现在给药 14 d 时,苍术高剂量组大鼠胃组织 MTL 受体数以及胃组织 GAS 受体数显著提高,苍术低剂量组大鼠胃组织 MTL 受体数显著提高。庞雪等<sup>[11]</sup>发现苍术活性部位通过降低动物一氧化氮和血管活性肠肽,提高血清中胃泌素、D-木糖、淀粉酶水平而改善动物的胃肠功能。周丽婷等<sup>[12]</sup>发现麸炒苍术能增加小鼠模型血清中淀粉酶、胃泌素、血管活性肠肽、胃动素等水平。

## 2 加强肠黏膜屏障

肠黏膜主要来源于内胚层,肠黏膜屏障是由肠道上皮细胞、下层结缔组织和多种共生菌群共同构成的免疫系统,其将外部环境与体内环境分开,是人体对外界环境的最大和最重要的屏障。随着慢性肾脏病的进展,肾脏滤过功能下降,使得硫酸吲哚酚、硫酸对甲酚等毒素在机体内蓄积,加剧了肠源性毒素的蓄积,进一步损伤肠黏膜屏障功能<sup>[13]</sup>。刘芬等<sup>[14]</sup>发现苍术提取物能够增加脾虚证动物模型肠道灌流液 IgA、结肠 TLR4、胃黏膜血流量、胃黏膜组织中三叶因子 1 等表达,证实苍术提取物具有保护和修复损伤黏膜组织等作用。牛佳卉等<sup>[15]</sup>发现大枣有效成分通过调节 MyD88/NF-κB 途径相关蛋白表达而实现实验动物肠道免疫屏障的保护。蒋苏贞等<sup>[16]</sup>发现干姜提取物可增强胃黏膜防御能力,可能与其通过调节动物自主神经功能以及增强机体抗氧化能力等机制有关。

## 3 调节肠道菌群紊乱

在人体微生物组中,肠道菌群是最大的组成部分,也是构成肠黏膜生物屏障的关键一环,肠道菌群及其产物构成肠黏膜的生物和化学屏障,可通过改变菌群多样性影响屏障功能<sup>[17]</sup>。在慢性肾功能衰竭时,肾小管重吸收 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 障碍使碳酸氢盐从尿中流失过多造成血液中碳酸氢盐浓度降低,引发代谢性酸中毒,导致肠黏膜屏障通透性增高,肠道菌群发生紊乱<sup>[18]</sup>。王美红等<sup>[19]</sup>发现与健康人群相比,慢性肾功能衰竭患者粪便中的梭菌属丰度、拟普雷沃菌属丰度显著升高,乳酸菌属丰度、副翅菌属丰度、艾克曼菌丰度更高。许静<sup>[20]</sup>发现苍术有效成分通过减少肠道拟杆菌门致病菌,增加厚壁菌门、乳酸杆菌、脱铁杆菌有

益菌而实现对肠道的保护。孟繁超等<sup>[21]</sup>发现干姜大枣提取物能够升高实验动物乳杆菌属丰度值,降低毛螺菌属、另枝菌属、嗜胆菌属、副普雷沃氏菌属丰度值。证实干姜大枣提取物能够调节实验动物肠道菌群失调的情况。白冰瑶等<sup>[22]</sup>发现大枣有效成分通过促进实验动物双歧杆菌和乳杆菌增殖,降低肠道内肠杆菌、肠球菌和产气荚膜梭菌含量等方面调节肠道菌群的平衡。邢晓圆<sup>[23]</sup>在人体试食试验中发现大枣有效成分对于改善运动员肠道益生菌含量方面有显著效果。

## 4 调节脑—肠轴互动

脑—肠轴是肠道和大脑之间的相互作用,涉及肠道、神经系统和免疫系统之间的复杂交互作用<sup>[24]</sup>。如肠交感神经刺激与肠道内菌群的紊乱会增加肠壁通透性,导致肠道出现损伤,进一步增加血中代谢毒物,损害肾器官。大脑自主区域肝脏信号通过激活肾交感神经而影响肾脏功能,当肾小球滤过率下降时又会增加血中的毒素<sup>[25]</sup>。因此,脑—肠轴可能通过代谢、交感神经等作用参与慢性肾病的进展。杨可新等<sup>[26]</sup>对慢性肾功能衰竭脾虚证大鼠灌胃黑地黄丸治疗,12 周后发现小鼠下丘脑脑肠肽胃促生长素和生长抑素的蛋白定量显著提高,该研究揭示了黑地黄丸可能通过增加下丘脑脑肠肽胃促生长素和生长抑素蛋白在中枢神经系统的表达而实现慢性肾功能衰竭脾虚证候的治疗。另一项同类研究发现<sup>[27]</sup>,黑地黄丸通过上调下丘脑 Ghrelin mRNA 表达及丘脑 SS mRNA 表达量而达到治疗慢性肾功能衰竭脾虚证候的目的,证实黑地黄丸调节慢性肾功能衰竭脾虚证候的脑—肠轴效果确切。

## 5 保护肾功能

肾脏是人体重要的排泄器官,其通过调节滤过率和液体形成,确保体内水、电解质和酸碱平衡的稳定,维持机体正常的生理功能。尽管慢性肾功能衰竭发生的病因不同,但当慢性肾功能衰竭发展到一定阶段时,均可导致残余肾单位无法充分的代谢废物和保持体内环境的稳定。孟志云<sup>[28]</sup>对 60 例慢性肾功能衰竭患者分别给予肾康宁、黑地黄丸治疗,并结合动物实验作为对照研究,发现黑地黄丸在慢性肾功能衰竭患者有效率方面效果优于肾康宁治疗;经实验研究显示黑地黄丸保护肾功能可能与其通过调整血肌酐(Cr)、血红蛋白、转化生长因子  $\beta_1$  水平抑制慢性肾功能衰竭渐进性发展,继而减轻肾小管间质纤维化、肾小球硬化的机制有关。周长磊等<sup>[29]</sup>研究证实黑地黄丸通过升高慢性肾功能衰竭患者内生肌酐清除率、降低血肌酐而起到保护肾功能的作用。叶莉莹等<sup>[30]</sup>发现黑地黄丸通过上调胰岛素样生长因子 1,促进胰岛素样生长因子 1 与胰岛素样生长因子-1 受体结合而改善慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的情况。在胡汝明等<sup>[31]</sup>研究中显示,熟地黄提取物能够抑制动物肾小球脏层上皮细胞表型转化与其通过影响蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶-3β 信号通路有关。吴迪英等<sup>[32]</sup>发现干姜有效成分能够改善动物肾小管上皮细胞损伤情况,降低肾脏组织内高迁移率族蛋白 BI mRNA 和蛋白、Toll 样受体 4 mRNA 和蛋白而减轻动物肾脏缺血再灌注引起的肾损伤。

## 6 纠正肾性贫血

肾性贫血是慢性肾功能衰竭患者常见的表现,其机制可能

与以下有关:由于肾功能下降导致促红细胞生成素(EPO)的合成和释放减少,导致红细胞生成不足,进而导致贫血。由于肾脏功能受损,其排泄、代谢能力下降,部分毒素堆积在体内导致红细胞被破坏,从而诱发贫血。由于肾功能下降导致促红细胞生成素分泌减少,以及铁造血原料吸收不足或利用障碍可引起贫血<sup>[33]</sup>。杨庆等<sup>[34]</sup>发现大枣提取物通过升高动物血液中红细胞、红细胞压积、血红蛋白、红细胞平均血红蛋白浓度、血清铁及铁饱和度而达到改善贫血的目的。尚昱志等<sup>[35]</sup>通过建立网络药理学分析大枣补血机制,发现大枣补血机制与其通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶-丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶信号通路、HIF-1 信号通路、造血细胞系通路等有关。赵平等<sup>[36]</sup>在重组人红细胞生成素+铁剂治疗基础上对 40 例功能性铁缺乏肾性贫血患者给予黑地黄丸口服,结果显示治疗后患者血清转铁蛋白饱和度、铁蛋白、总铁结合力、血细胞比容、血红蛋白、红细胞计数较治疗前显著提高,证实黑地黄丸能够调节功能性铁缺乏肾性贫血患者贫血及代谢指标水平的异常。

## 7 小结与展望

慢性肾功能衰竭对人类健康产生明显的危害,包括尿毒性支气管炎、肾性高血压、代谢性酸中毒、尿毒症脑病等,给临床治疗增加了难度。黑地黄丸改善慢性肾功能衰竭的作用机制包括上调下丘脑 Ghrelin mRNA 表达及丘脑 SS mRNA 表达量而达到治疗慢性肾功能衰竭脾虚证候的目的;通过上调胰岛素样生长因子 1,促进胰岛素样生长因子 1 与胰岛素样生长因子-1 受体结合而改善慢性肾功能衰竭肾纤维化的情况;通过升高动物血液中红细胞、红细胞压积、血红蛋白、红细胞平均血红蛋白浓度、血清铁及铁饱和度而达到改善贫血的目的。但本研究也存在一定局限性,如缺乏黑地黄丸某些成分位点上的药理作用和网络调控关系的深入研究,且缺乏统一的剂量治疗标准。今后需在中医理论和现代医学技术支持下建立慢性肾功能衰竭和中医证候特点的病症模型,进一步探索黑地黄丸多靶点效应,为黑地黄丸的临床应用提供高质量的参考依据。

## 参考文献

- [1] 中华预防医学会肾脏病预防与控制专业委员会. 中国慢性肾脏病早期评价与管理指南 [J]. 中华内科杂志, 2023, 62(8): 902-930. DOI: 10.3760/cma.j.cn112138-20221013-00755.
- [2] 陈永浩, 张喜奎. 张喜奎治疗慢性肾衰竭临床常见症状的用药经验 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(8): 560-561. DOI: 10.3969/j.issn.0411-8421.2020.08.007.
- [3] 张益庆. 基于网络药理学的黑地黄丸治疗肾性贫血机制探究 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(1): 1-5. DOI: 10.13638/j.issn.1671-4040.2021.01.001.
- [4] 郭弋凡, 赵文景, 王梦迪, 等. 慢性肾衰竭胃肠道功能紊乱的发病机制及中医药治疗进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(11): 1025-1028. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2020.11.029.
- [5] 郝娜, 徐致远, 唐好知, 等. 辨证论治慢性肾衰竭患者胃肠道症状的理论探讨 [J]. 天津中医药, 2023, 40(1): 51-56. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2023.01.11.
- [6] 夏小辉, 蔡柳洲. 慢性肾病伴发病症的辨析与治疗 [J]. 中医临床研究, 2023, 15(14): 96-98. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2023.14.020.
- [7] 杨可新, 张法荣, 董彬. 黑地黄丸对慢性肾衰竭脾胃证候, 营养状态和胃肠激素的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 5. DOI: CNKI:SUN:ZSFX.0.2016-01-043.
- [8] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function [J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(5): 662-671. DOI: 10.1016/j.chom.2015.03.005.
- [9] 刘芬, 刘艳菊, 田春漫. 苍术提取物调节脾虚证大鼠胃肠动力障碍的作用机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(12): 825-829, 850. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2014.12.008.
- [10] 高杰, 曹春雨, 贺蓉, 等. 大黄、苍术对正常大鼠胃肠激素水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 220-224. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9903.2012.09.063.
- [11] 庞雪, 刘玉强, 刘小丹, 等. 苍术麸炒前后活性部位药效比较研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1308-1311. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.04.
- [12] 周丽婷, 曾婉婷, 赵雪岑, 等. 基于粪菌移植麸炒苍术对脾虚小鼠肠道菌群调节作用验证 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19(8): 20-23. DOI: 10.11954/ytctyy.202308005.
- [13] Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2005, 16(11): 3381-3388. DOI: 10.1681/ASN.2005050535.
- [14] 刘芬, 刘艳菊, 田春漫. 苍术提取物对脾虚证大鼠胃粘膜及胃肠免疫功能的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(3): 343-347, 354. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.03.06.
- [15] 牛佳卉, 袁静, 魏然, 等. 红枣多糖对小鼠肠道免疫屏障的保护作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 295-300, 306. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060068.
- [16] 蒋苏贞, 廖康. 干姜醇提取物对实验性胃溃疡的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(8): 79-80. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8517.2010.08.064.
- [17] 赵春梅. 慢性肾衰竭 LPS、sCD14、vWF、hsCRP 的变化和意义 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2006.
- [18] Bello AK, Levin A, Tonelli M, et al. Assessment of global kidney health care status [J]. JAMA, 2017, 317(18): 1864-1881. DOI: 10.1001/jama.2017.4046.
- [19] 王美红, 张雅琼, 李荣山, 等. 慢性肾衰竭患者肠道菌群变化及其与肾功能的相关性 [J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(5): 8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2019.05.006.
- [20] 许静. 基于肠道菌群与 TLR4/NF-κB 通路研究苍术苷 A 对脾虚泻泻小鼠的药效机制 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [21] 孟繁超, 牛婷立, 王轩, 等. 干姜大枣提取物对饮冷寒凉的 SD 大鼠肠道微生态的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3212-3215.
- [22] 白冰瑶, 刘新惠, 周茜, 等. 红枣膳食纤维改善小鼠功能性便秘及调节肠道菌群功能 [J]. 食品科学, 2016, 37(23): 254-259. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201623042.
- [23] 邢晓圆. 红枣膳食纤维提取及肠道健康运动食品研制 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(24): 4. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2017.24.019.

- [24] Khosroshahi HT, Vaziri ND, Abedi B, et al. Effect of high amylose resistant starch (HAM-RS2) supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients: A randomized clinical trial [J]. *Hemodialysis International*, 2018, 22(4): 492-500. DOI: 10.1111/hdi.12653.
- [25] 张秀秀, 李晴, 曹腾莉, 等. 肠道菌群与脑-肠-肾轴在慢性肾病中的研究进展 [J]. *药学研究*, 2019, 38(6): 355-358. DOI: 10.13506/j.cnki.jpr.2019.06.011.
- [26] 杨可新, 张法荣. 黑地黄丸对慢性肾衰竭大鼠模型胃、十二指肠组织促生长素、生长抑素蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(4): 4. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2019.04.005.
- [27] 杨可新. 黑地黄丸对慢性肾衰竭脾虚证的干预作用及对脑肠肽和脑-肠轴影响的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [28] 孟志云. 黑地黄丸治疗慢性肾功能衰竭的临床与实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2006.
- [29] 周长磊, 王芳, 董彬, 等. 黑地黄丸对慢性肾衰竭患者肾功能指标影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(11): 135-136.
- [30] 叶莉莹, 潘广辉, 赵平, 等. 黑地黄丸通过调控 IGF-1 表达对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的抑制作用 [J]. *中成药*, 2024, 46(3): 788-794. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.012.
- [31] 胡汝明, 谢岳婷, 陈剑川. 基于 AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路探讨熟地黄提取物对糖尿病肾病大鼠肾小球脏层上皮细胞表型转化的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(10): 2497-2500. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.10.053.
- [32] 吴迪英, 郭闻渊, 张豪杰, 等. 姜黄素对小鼠肾脏再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(7): 671-675.
- [33] 刘鑫阔, 刘洋, 文南萍, 等. 维持性血液透析患者高通量透析治疗肾性贫血疗效和安全性的 Meta 分析 [J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(8): 841-846. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.08.020.
- [34] 杨庆, 李玉洁, 陈颖, 等. 大枣提取物对缺铁性贫血大鼠的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(3): 102-109. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030102.
- [35] 尚显志, 李陈玲, 韦露秋, 等. 基于网络药理学的大枣补血机制初探 [J]. *中国食物与营养*, 2021, 27(5): 58-62. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9577.2021.05.013..0.2012-07-002.
- [36] 赵平, 王悦. 黑地黄丸治疗功能性铁缺乏肾性贫血疗效观察 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(3): 357-360. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2024.03.011.

(收稿日期: 2024-06-18)

(上接 1257 页)

- [27] Tanaka A, Imai T, Toyoda S, et al. Long-term observation of estimated fluid volume reduction after the initiation of ipragliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus: A sub-analysis from a randomized controlled trial (PROTECT) [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2023, 15(1): 152. DOI: 10.1186/s13098-023-01129-3.
- [28] Jespersen JB, Beck AM, Munk T, et al. Low-intake dehydration and nutrition impact symptoms in older medical patients-A retrospective study [J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2023, 57: 190-196. DOI: 10.1016/j.clnesp.2023.06.030.
- [29] 荆峰, 张家立, 罗超, 等. SGLT-2 抑制剂干预 T2DM 主要心血管危险因素研究 [J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(1): 14-20. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.01.003.
- [30] Saad M, Mahmoud AN, Elgendi IY, et al. Cardiovascular outcomes with sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors in patients with type II diabetes mellitus: A meta-analysis of placebo-controlled randomized

trials [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 228: 352-358. DOI: 10.1016/j.ijcardiol.2016.11.181.

- [31] Donnan JR, Grandy CA, Chibrikov E, et al. Comparative safety of the sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: A systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(1): e022577. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-022577.
- [32] Liu J, Li L, Li S, et al. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and the risk of diabetic ketoacidosis in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(9): 1619-1627. DOI: 10.1111/dom.14075.
- [33] Colacci M, Fralick J, Odutayo A, et al. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors and risk of diabetic ketoacidosis among adults with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis [J]. *Can J Diabetes*, 2022, 46(1): 10-15.e2. DOI: 10.1016/j.jcjd.2021.04.006.

(收稿日期: 2024-06-11)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 021

综述

# 深在性囊性胃炎诊断和治疗进展

郭慧宇综述 马瑞军审校



基金项目：山西省自然科学研究面上项目(202203021221259)

作者单位：030000 太原,山西医科大学第五临床医学院/山西省人民医院消化内科

通信作者：马瑞军,E-mail:6591746@qq.com

**【摘要】** 深在性囊性胃炎(GCP)是临床罕见的胃黏膜下病变,术前确诊困难,其发病机制尚不明确,可能与手术、慢性炎性反应、EB病毒感染、胃动力异常等因素相关。GCP临床症状无特异性,超声内镜(EUS)、EUS引导下穿刺活检(EUS-FNA/B)和CT检查对诊断GCP意义较大,病理检查仍是金标准。GCP主要通过手术切除,术式的选择遵循黏膜下肿瘤的治疗原则。文章从GCP的发病机制、诊断及治疗等方面进行综述,为GCP的诊疗提供理论依据。

**【关键词】** 深在性囊性胃炎;发病机制;诊断;治疗

**【中图分类号】** R573.3      **【文献标识码】** A

**Progress of diagnosis and treatment for gastritis cystica profunda** *Guo Huiyu, Ma Ruijun. Fifth Clinical School of Medicine, Shanxi Medical University, Department of Gastroenterology, Shanxi Provincial People's Hospital, Shanxi Province, Taiyuan 030000, China*

**Funding program:** Natural Science and Technology Research Top Project of Shanxi Province(202103021224379)

**Corresponding author:** Ma Ruijun, E-mail: 6591476@qq.com

**【Abstract】** Gastritis cystica profunda (GCP) is a rare submucosal lesion of the stomach, and it is difficult to diagnose before surgery. The pathogenesis of GCP is still unclear, and may be related to surgery, chronic inflammation, EBV infection, and abnormal gastric motility, etc. The clinical symptoms of GCP are not specific, and the significance of ultrasound endoscopy (EUS), EUS guided perforation biopsy (EUS-FNA/B) and CT examination is greater in the diagnosis of GCP, but the pathology is still the gold standard. GCP is primarily treated through surgical resection, with the choice of procedure following the principles for treating submucosal tumors. In this paper, we will describe the pathogenesis, diagnosis, and treatment of GCP to provide a theoretical basis for the diagnosis and treatment of GCP.

**【Key words】** Gastritis cystica profunda; Pathogenesis; Diagnosis; Treatment

深在性囊性胃炎(gastritis cystica profunda,GCP)是胃黏膜内的腺体向黏膜肌层以下扩张性增生形成的囊性病变<sup>[1]</sup>。1972年,Littler 和 Gleibermann<sup>[2]</sup>创造了术语“gastritis cystica profunda”,认为黏膜下层胃腺囊状扩张是术后的反应性状态。由于其与结肠的类似病症深在性囊性结肠炎相似<sup>[3]</sup>,“深在性囊性胃炎”已成为该病的首选术语。近年来,内镜技术的发展使得GCP检出率增加,但由于该病临床症状及内镜下表现无特异性,其发病率被低估。越来越多的研究发现GCP是胃癌的癌前病变<sup>[4-6]</sup>,引起了临床医师的重视,文章从其发病机制、诊断及治疗等方面对GCP的研究进展进行综述。

## 1 病因及发病机制

关于GCP的病因有不同的假说,但目前尚未完全阐明。GCP通常存在于既往手术部位(胃手术或内镜手术),因此认为手术或缝合技术引起的黏膜损伤会促进黏膜脱垂和腺体疝入黏膜下层,也可能与术后慢性炎性反应和局部缺血有关<sup>[7-8]</sup>。GCP的发生可能与胃空肠吻合术后胆汁和小肠内容物反流有

关,可引起萎缩性胃炎和肠上皮化生<sup>[9]</sup>。然而,近年来有报道多个无手术病史的GCP案例<sup>[10]</sup>,提示GCP的发生与其他病因相关。慢性炎性反应也可能参与GCP的发展,慢性炎性反应可引起黏膜肌层完整性丧失,胃腺上皮向下生长穿过黏膜肌层进入黏膜下层,形成囊性扩张性增生<sup>[11]</sup>。Li等<sup>[9]</sup>认为GCP的发生可能部分与胃动力障碍和食物在胃内积聚有关,导致局部黏膜肌层出现间隙,黏膜上皮细胞中的胃腺或干细胞迁移到黏膜下层,黏膜上皮细胞和黏膜肌层开始增殖,随着黏膜肌层的增生,黏膜下层腺体的分泌物不能排出胃腔,腺体被动扩张,形成囊性病变。同时,GCP与钾电压门控通道亚家族E成员2(KCNE2)的缺失有关<sup>[12]</sup>。2010年,Roepke等<sup>[13]</sup>证明,小鼠胃壁细胞中KCNE2的靶向缺失导致肿瘤前表型,包括GCP,表明KCNE2在增殖性胃疾病中可能起作用。GCP还可能与EB病毒、幽门螺杆菌感染有关<sup>[14]</sup>。

## 2 诊断

### 2.1 临床表现

GCP症状多种多样,包括腹痛、消化道出血、

厌食等,但也有部分患者无明显临床症状,仅在体检行内镜检查时发现异常<sup>[15-16]</sup>。GCP 好发于中老年男性,最常见的解剖部位是胃体,其次是贲门、胃底和胃窦,一些病变位于吻合口、幽门前病变和胃体与胃窦或胃底的交界处<sup>[17]</sup>。

## 2.2 辅助检查

**2.2.1 实验室检查:** GCP 患者的实验室检查一般无特异性。单独的 GCP 通常不伴有 CEA 等肿瘤标志物水平升高,但 GCP 与肿瘤病变共存时,可以检测到 CEA、CA125 等肿瘤标志物的升高<sup>[18]</sup>。

**2.2.2 内镜检查:** 首先行上消化道内镜检查,以确定患者胃肠道不适的原因<sup>[1]</sup>。国内文献将内镜下 GCP 分型为黏膜病变型、息肉样隆起型、黏膜下降起型及黏膜肥厚、皱襞粗大型,黏膜病变型又分为:黏膜扁平隆起(Ⅱa),黏膜扁平隆起伴轻度凹陷(Ⅱa+Ⅱc),黏膜轻度凹陷(Ⅱc),GCP 内镜下主要表现为黏膜下降起型<sup>[19]</sup>。国外文献分型包括巨大的胃褶皱、黏膜下肿瘤和孤立的息肉<sup>[20]</sup>。此外,因 GCP 在胃镜下表现多样,无特异性,故需与胃部疾病如胃腺癌、胃间质瘤、梅氏病、神经内分泌肿瘤等鉴别<sup>[21]</sup>。内镜下活检大多局限于黏膜层,而 GCP 存在于黏膜下层,内镜下活检通常不能确诊。因此,进一步的检查是非常必要的。

**2.2.3 超声内镜:** 超声内镜(endoscopic ultrasound, EUS)在 GCP 诊断中发挥重要作用。疑似 GCP 的病例需进一步行 EUS 检查。EUS 可显示消化道黏膜下病变,并提供消化道壁的分层结构、病变起源,以及病变与周围组织、淋巴结和邻近器官之间的关系<sup>[22]</sup>。Xu 等<sup>[15]</sup>对 34 例 GCP 病例进行回顾性研究,将 GCP 回声质地分为均匀和不均匀,回声模式分为低回声、高回声或混合型,并且将 GCP 在 EUS 下的表现总结为 3 种形式:无回声(35.3%);无回声和低回声混合型,并伴有增厚的黏膜(50%);伴有小囊的低回声(14.7%)。在 EUS 下,GCP 典型影像学特征是病变起源于胃黏膜,胃壁特异性增厚,逐渐深入黏膜下层甚至固有肌层的不规则低回声区,但黏膜表面正常<sup>[8]</sup>。一旦发现位于黏膜下层的低回声或无回声囊性病变,应高度怀疑 GCP<sup>[18]</sup>。

**2.2.4 EUS-FNA/B:** EUS 引导下的细针穿刺活检(endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration/biopsy, EUS-FNA/B)可帮助 GCP 鉴别诊断。GCP 囊液中可表达癌胚抗原(CEA)和糖链抗原 19-9(CA19-9)等肿瘤标志物,EUS-FNA/B 所得囊液可用于鉴别 GCP 与胃恶性肿瘤<sup>[17]</sup>。谢艳英等<sup>[23]</sup>在 1 例 GCP 患者中使用 EUS-FNA 虽未能诊断 GCP,但结合 EUS 及囊液检查、细胞病理学结果可以与间质瘤、淋巴管瘤与 Brunner 腺增生相鉴别。然而,Machicado 等<sup>[24]</sup>报道的 GCP 病例使用 EUS-FNA/B 并未能与胃恶性肿瘤鉴别。故 EUS-FNA/B 诊断结果应客观、谨慎对待。

**2.2.5 CT:** CT 可以描述病变的大小、病灶的定位、胃壁受累深度和淋巴结状态<sup>[25]</sup>。CT 可无创观察到 GCP 的明确形态,病变多为球形或半球形,表现为胃壁增厚、隆起或向胃腔内突起的囊实性团块影,与肌层分界欠清,多以囊性成分为主,这可能是胃黏膜下腺体囊性扩张所致<sup>[26]</sup>。囊性变是 GCP 的一个重要且

特征性的表现<sup>[26]</sup>。Wang 等<sup>[27]</sup>对 19 例 GCP 患者进行检查,大多数病变(78.95%)存在囊性成分,4 个病灶未发现囊性改变,这可能与病灶相对较小(0.7~1.1 cm)CT 图像难以发现细微囊肿有关,认为 >2.5 cm 的 GCP 病变可能提示由隔膜分隔的多个囊肿,弥漫性病变伴胃黏膜皱襞增厚者可见多发囊肿。GCP 的案例报道已提及多发性囊肿和囊性病变分离<sup>[28]</sup>。大部分病例检查显示病灶位于胃腔内,但也有少部分病例 CT 检查显示病灶位于十二指肠肠腔内,后经上消化道钡餐及胃镜证实病灶位于胃窦<sup>[29]</sup>,可能原因为病变通过幽门向十二指肠腔内蠕动。

GCP 的增强 CT 呈现出“三明治”样强化或“蜂窝征”样改变,“三明治”样强化即病灶表面囊壁明显强化,中央囊性区无强化,底部肌层强化<sup>[30]</sup>。Wang 等<sup>[27]</sup>通过对 19 例 GCP 患者进行检查,15 例在静脉期有峰值增强,2 例在动脉期有峰值增强,13 例病灶呈边缘样强化,中心低密度,其结构可能由明显增强的胃黏膜和内部的低密度部分及囊腔组成;对于伴有腺癌的 GCP,增强峰出现在动脉期,增强区逐渐扩大出现在静脉期,强化区逐渐扩大反映了囊内血供的平衡。然而,由于证据量少,并且放射学特征的多样性,CT 不足以达到对 GCP 的正确诊断,但能够对 GCP 的诊断提供有用的临床信息。

**2.2.6 病理:** GCP 的术前诊断具有挑战性,病理检查仍然是现在的金标准。内窥镜或手术切除可获得包括胃黏膜下组织的大组织样本。在组织学上,GCP 的特征是胃小凹延长,伴有胃腺增生和囊性扩张,延伸到黏膜下层,常伴有慢性炎性反应和黏膜嗜酸性粒细胞浸润,免疫组化 Ki-67 指数 <1%,P53 野生型<sup>[31]</sup>。GCP 的腺体通常呈现正常形态,这在与癌性病变的鉴别诊断中具有重要意义<sup>[18]</sup>。

## 3 GCP 与胃癌关系

**3.1 GCP 与胃癌鉴别诊断** 虽然胃癌的病变通常从黏膜开始,但在 20%~30% 的病例中,胃癌也可有正常黏膜<sup>[32]</sup>。高分化胃腺癌的腺体结构和肿瘤细胞之间的差异不显著,当肿瘤突破黏膜肌层到达黏膜下层时,很难区分高分化胃腺癌和 GCP<sup>[11]</sup>。Li 等<sup>[9]</sup>通过对 7 例 GCP 患者的病理进行分析,总结出胃腺癌和 GCP 的不同:首先,GCP 中的腺体与周围间质表现出一致的特征,没有结缔组织增生反应,而胃腺癌内的腺体有浸润性特征,癌中有结缔组织增生反应;其次,GCP 周围或残余腺体的细胞和结构显示正常特征,而胃腺癌周围或残余腺体有癌前病变;然后,GCP 和胃腺癌之间的腺体形状存在差异,GCP 中囊性扩张的腺体没有细胞和细胞核发育不良,没有有丝分裂,而胃腺癌则表现明显;最后,胃腺癌在腺体腔内有肿瘤性坏死,而 GCP 腺体腔内只是分泌物。

**3.2 GCP 与胃癌共存诊断** 当早期胃癌合并 GCP,因腺体扩张导致病灶隆起,常规术前内镜诊断体系并不完全适用,易导致性质判断不足及深度判断过深情况。Yang 等<sup>[22]</sup>设计了一个诊断早期胃癌和良性黏膜下病变共存的流程图,将良性黏膜下病变分为实性和囊性两类,总结了早期胃癌和囊性黏膜下病变共存的 5 个典型特征:(1)病变表面有腺管开口,可见囊液流出;(2)病变位于贲门;(3)患者为老年男性;(4)EUS 边界不清,可见回声区;(5)表面黏膜多与早期癌或癌前病变相鉴别。

如果怀疑早期胃癌与黏膜下囊性病变共存,可考虑行诊断性内镜切除,必要时根据术后病理结果追加额外的外科手术<sup>[8]</sup>。

#### 4 治 疗

越来越多的报道倾向于支持 GCP 的潜在恶性<sup>[33]</sup>, GCP 药物治疗基本无效,目前主要行内窥镜手术和外科手术治疗 GCP<sup>[15]</sup>。基于术前诊断的不确定性,内镜治疗遵循黏膜下肿瘤、息肉或早期胃癌的治疗原则<sup>[34]</sup>。在没有其他恶性病变的情况下,推荐内镜下黏膜切除术或内镜下黏膜下剥离术作为首选,有助于获得病理诊断并避免不必要的手术,Jiang 等<sup>[35]</sup>认为内镜下黏膜剥离术是一种治疗 GCP 相关 EGC 患者安全且有效的术式。当病变无法在内镜下切除或高度怀疑存在恶性病变时,应积极采取外科手术治疗,包括局部肿瘤切除、胃大部切除和全胃切除<sup>[34]</sup>。

然而,胃手术史是 GCP 的一个重要发病因素,同时术后反流、异物(缝线)和胃黏膜损伤可能造成 GCP 进展,故有必要对 GCP 患者进行长期监测<sup>[7]</sup>。一般情况下,GCP 若不与胃癌、胃淋巴瘤、梅氏病或其他恶性病变并存时,预后较好<sup>[18,36]</sup>,但也有 GCP 术后复发的病例报道<sup>[17]</sup>,这可能与伴发疾病、病变大小、术式选择、术者水平、患者身体条件等因素有关,因此建议对 GCP 患者定期进行内镜随访。

#### 5 小结与展望

EUS、EUS-FNA/B 和 CT 检查有助于 GCP 的诊断,但病理仍然是诊断的金标准。此病需与胃间质瘤、脂肪瘤、梅氏病等黏膜下病变进行鉴别诊断。GCP 常与胃癌共存,因此术前评估、术式选择及术后随访尤为重要。目前,关于 GCP 的发病机制、恶性程度研究尚不充分,疾病的分子机制尚不明确,仍需进行大样本、多中心的临床数据和基础研究来探索 GCP 的生物学机制。

#### 参 考 文 献

- [1] Zimmer V, Heinrich C. Pedunculated gastritis cystica profunda polyp presenting with upper GI bleeding and volcano-like surface alteration [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2022, 54(9): 1267-1268. DOI: 10.1016/j.dld.2021.06.001.
- [2] Littler ER, Gleibermann E. Gastritis cystica polyposa. (Gastric mucosal prolapse at gastroenterostomy site, with cystic and infiltrative epithelial hyperplasia) [J]. *Cancer*, 1972, 29(1): 205-209. DOI: 10.1002/1097-0142(197201)29:1 < 205 :: Aid-cncr2820290130 > 3. 0.co;2-j.
- [3] Wahi JE, Pagacz M, Ben-David K. Gastric adenocarcinoma arising in a background of gastritis cystica profunda [J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2020, 24(10): 2387-2388. DOI: 10.1007/s11605-020-04585-8.
- [4] Matsumoto H, Yamashina T, Shimatani M. Early gastric cancer accompanying Gastritis cystica profunda with a Giant cyst [J]. *Internal Medicine*, 2024. DOI: 10.2169/internalmedicine.3460-24.
- [5] Mitomi H, Iwabuchi K, Amemiya A, et al. Immunohistochemical analysis of a case of gastritis cystica profunda associated with carcinoma development [J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1998, 33(11): 1226-1229. DOI: 10.1080/00365529850172610.
- [6] Li Y, Liu R, Wang Z, et al. Gastritis cystica profunda presenting as an ulcerated lesion [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2024, 56(7): 1249-1250. DOI: 10.1016/j.dld.2024.04.003.
- [7] Guan J, Li Z, Shen G, et al. Sporadic foveolar-type adenoma in gastric body/antrum junction with gastritis cystica profunda [J]. *BMC gastroenterology*, 2022, 22(1): 221. DOI: 10.1186/s12876-022-02285-y.
- [8] Jiang W, Bai L, Zhang S, et al. Endoscopic submucosal dissection (ESD) for gastritis cystica profunda (GCP) with early gastric cancer: A propensity score matching analysis [J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): e29349. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024. e29349.
- [9] Li C, Song S, Wu G, et al. Gastritis cystica profunda: Clinical and pathologic study of seven cases and review of literature [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2021, 14(2): 261-266.
- [10] Zeng L, Zheng L, Hu B, et al. Gastritis cystica profunda mimicking submucosal tumor [J]. *Endoscopy*, 2023, 55(S 01): E1180-E1181. DOI: 10.1055/a-2197-9115.
- [11] Wu JJ, Cheng YQ, Yang HJ, et al. Correlation between gastritis cystica profunda and the risk of lymph node metastasis in early gastric cancer [J]. *Neoplasma*, 2022, 69(6): 1459-1465. DOI: 10.4149/neon\_2022\_220314N281.
- [12] De Stefano F, Graziano GMP, Viganò J, et al. Gastritis cystica profunda: A rare disease, a challenging diagnosis, and an uncertain malignant potential: A case report and review of the literature [J]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2023, 59(10): 1770. DOI: 10.3390/medicina59101770.
- [13] Roepke TK, Purtell K, King EC, et al. Targeted deletion of Kcnex2 causes gastritis cystica profunda and gastric neoplasia [J]. *PloS One*, 2010, 5(7): e11451. DOI: 10.1371/journal.pone.0011451.
- [14] Noh SJ, Kim KM, Jang KY. Gastritis cystica profunda with predominant histiocytic reaction mimicking solid submucosal tumor [J]. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2020, 31(10): 726-728. DOI: 10.5152/tjg.2020.19444.
- [15] Xu G, Peng C, Li X, et al. Endoscopic resection of gastritis cystica profunda: Preliminary experience with 34 patients from a single center in China [J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2015, 81(6): 1493-1498. DOI: 10.1016/j.gie.2014.11.017.
- [16] Afecto E, Joao D, Fernandes S. Gastritis cystica profunda presenting as an ulcerated subepithelial lesion [J]. *GE - Portuguese Journal of Gastroenterology*, 2024, 31(1): 73-76. DOI: 10.1159/000530669.
- [17] Du Y, Zhang W, Ma Y, et al. Gastritis cystica profunda: A case report and literature review [J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2020, 9(5): 3668-3677. DOI: 10.21037/apm-20-1253.
- [18] Yu YN, Wang XW, Chen YQ, et al. A retrospective analysis of 13 cases of gastritis cystica profunda treated by endoscopic resection and surgery [J]. *Journal of Digestive Diseases*, 2022, 23(3): 186-190. DOI: 10.1111/1751-2980.13086.
- [19] 朱博群, 诸炎, 秦文政, 等. 深在性囊性胃炎内镜下的特征性表现及治疗策略: 基于单中心的回顾性研究 [J]. 中国临床医学, 2018(02 vo 25): 167-172. DOI: 10.12025/j. issn. 1008-6358. 2018.20170993.
- [20] Shimizu S, Hara H, Muto Y, et al. Gastritis cystica profunda in an unoperated stomach mimicking a pyloric submucosal tumor and causing

- anorexia; A case report and literature review [J]. Medicine, 2024, 103 (13): e37652. DOI: 10.1097/MD.0000000000037652.
- [21] Ng HI, Li ZQ, Zhang YM, et al. Gastric inverted hyperplastic polyp, an exceptional case diagnosed after endoscopic submucosal dissection [J]. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2022, 46(4): 101890. DOI: 10.1016/j.clinre.2022.101890.
- [22] Yang H, Li Z, Wei Z, et al. Coexistence of early gastric cancer and benign submucosal lesions mimic invasive cancer: A retrospective multicenter experience [J]. BMC Gastroenterology, 2023, 23 (1): 409. DOI: 10.1186/s12876-023-03044-3.
- [23] 谢艳英,董钰婷,王云,等.内镜超声引导下细针抽吸术在深在性囊性胃炎术前诊断中的应用一例[J].中华消化内镜杂志,2020,37(5):366-368. DOI: 10.3760/cma.j.cn321463-20190918-01339.
- [24] Machicado J, Shroff J, Quesada A, et al. Gastritis cystica profunda: Endoscopic ultrasound findings and review of the literature [J]. Endoscopic Ultrasound, 2014, 3 (2): 131-134. DOI: 10.4103/2303-9027.131041.
- [25] He M, Chen ZF, Liu S, et al. Deep learning model based on multi-lesion and time series CT images for predicting the benefits from anti-HER2 targeted therapy in stage IV gastric cancer [J]. Insights into Imaging, 2024, 15 (1): 59. DOI: 10.1186/s13244-024-01639-2.
- [26] 黄文鹏,王睿,李莉明,等.深在性囊性胃炎的CT表现[J].中华放射学杂志,2020,54(11):1085-1088. DOI: 10.3760/cma.j.cn112149-20191106-00893.
- [27] Wang R, Lu H, Yu J, et al. Computed tomography features and clinical characteristics of gastritis cystica profunda [J]. Insights into Imaging, 2022, 13 (1): 14. DOI: 10.1186/s13244-021-01149-5.
- [28] Lin SH, Liu W, Yan XL. Gastritis cystica profunda [J]. Journal of Gastrointestinal Surgery, 2024, 28 (4): 592-593. DOI: 10.1016/j.gassur.2024.01.024.
- [29] 袁媛,陈晓荣.深在性囊性胃炎 1 例并文献复习 [J].中国临床医学影像杂志,2023,34(3):220-222. DOI: 10.12117/jccmi.2023.03.017.
- [30] 吴琛,冯蕾,雷晨慧. CT 诊断深在性囊性胃炎(附 5 例报道) [J]. 中国医学影像技术,2020(08 vo 36):1259-1261. DOI: 10.13929/j.issn.1003-3289.2020.08.034.
- [31] Itami H, Morita K, Nakai T, et al. Gastritis cystica profunda is associated with aberrant p53 and Epstein-Barr virus in gastric cancer: A clinicopathological, immunohistochemical and in situ hybridization study [J]. Pathology International, 2021, 71 (1): 42-50. DOI: 10.1111/pin.13039.
- [32] Eriksson Y, Nakamoto M, Orita H, et al. Early gastric cancer concurrent with gastritis cystica profunda resembling advanced cancer [J]. Chonnam Medical Journal, 2024, 60 (1): 87. DOI: 10.4068/cmj.2024.60.1.87.
- [33] Cui Q, Wu H, Chen Y, et al. A EWSR1-CREB-rearranged gastric mesenchymal tumor accompanied by gastritis cystica profunda and with probable benign behavior: A case report [J]. Translational Cancer Research, 2022, 11 (4): 959-966. DOI: 10.21037/tcr-21-2331.
- [34] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2018 (5th edition) [J]. Gastric Cancer, 2021, 24 (1): 1-21. DOI: 10.1007/s10120-020-01042-y.
- [35] Jiang W, Bai L, Zhang S, et al. Endoscopic submucosal dissection (ESD) for gastritis cystica profunda (GCP) with early gastric cancer: A propensity score matching analysis [J]. Heliyon, 2024, 10 (7): e29349. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e29349.
- [36] Cao Y, Ma P, Qiao Z. An unusual cause of a protuberant lesion of the gastric antrum [J]. Revista Espanola De Enfermedades Digestivas, 2023, 115 (2): 87-88. DOI: 10.17235/reed.2022.8771/2022.

(收稿日期:2024-05-18)

作者 · 编者 · 读者

## 《疑难病杂志》对形态学图片的质量和制作要求

作者提供的形态学图片既应用于论文的出版,也应用于论文的评审和编辑,除图片要足够的大小外,图像要能真实反映形态的原貌和特征。图片要清晰,对比度好,色彩正常。基本要求如下:

1. 图片必须是原始图像或由原始图像加工成的照片,图像要能显示出形态特征,必要时需加提示或特指符号(如箭头等)。
2. 数码照片的图像分辨率调整为 300 dpi 或以上,总像素至少要在 150 万~200 万像素或以上,图像文件用 tif 格式。
3. 图像要有简明扼要、规范的形态描述,但不能简单到只写“电子显微镜形态改变”之类。
4. 大体标本图片上应有标尺,显微镜图片应注明染色方法和图像的真正放大倍数,数码照片的放大率最好用比例尺来标注。
5. 插入到文本文件中的图片,在调整其大小时要保持原图像的宽/高比例(即先按下计算机的 Shift 键,再进行缩放操作)。

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 022

## 综述

## 氯硝柳胺纳米晶潜在的治疗胃肠间质瘤的研究进展

任迎政, 韩翔宇, 许兆万综述 董永红审校

基金项目: 吴阶平医学基金会(320.6750.2022-3-41)

作者单位: 030000 太原, 山西医科大学第五临床医学院胃肠胰及瘤与腹壁外科

通信作者: 董永红, E-mail: youthdong007@163.com



**【摘要】** 胃肠间质瘤是最常见的间叶源性肿瘤, 手术切除是治疗局限性胃肠间质瘤的主要方法。目前针对胃肠间质瘤的病理性突变, 临幊上研发了数代酪氨酸激酶抑制剂, 均取得一定的成效。然而, 酪氨酸激酶抑制剂用药2~3年后, 常常会产生耐药性, 导致治疗失败。近年来, 氯硝柳胺作为一种抗肿瘤活性的药物出现在公众视野, 由于其溶解度差等原因, 晶体制剂则应运而生, 更好地发挥了抗肿瘤特性。文章结合目前的实验基础及相关机制, 探讨在酪氨酸激酶抑制剂耐药的胃肠间质瘤中联合给药的可能性, 以期开发胃肠间质瘤的新治疗方案。

**【关键词】** 胃肠间质瘤; 酪氨酸激酶抑制剂; 氯硝柳胺; 耐药机制; 联合用药

**【中图分类号】** R735.2; R735.3      **【文献标识码】** A

### Research progress on the potential of Niclosamide Nanocrystals in the treatment of gastrointestinal stromal tumor

Ren Yingzheng, Han Xiangyu, Xu Zhaowan, Dong Yonghong. The Fifth Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Shanxi Province, Taiyuan 030000, China

Funding program: Wu Jieping Medical Foundation (320.6750.2022-3-41)

Corresponding author: Dong Yonghong Email: youthdong007@163.com

**【Abstract】** Gastrointestinal stromal tumor is the most common mesenchymal tumor, and surgical resection is the main method to treat localized gastrointestinal stromal tumor. Currently, several generations of tyrosine kinase inhibitors have been clinically developed to target the pathological mutations of gastrointestinal stromal tumors, all of which have achieved certain results. However, resistance to tyrosine kinase inhibitors often develops after 2-3 years of treatment, leading to treatment failure. In recent years, niclosamide has appeared in the public eye as a drug with anti-tumor activity. Due to its poor solubility and other reasons, crystal preparations have emerged to better exert its anti-tumor properties. This article combines the current experimental basis and related mechanisms to explore the possibility of combined administration in gastrointestinal stromal tumors resistant to tyrosine kinase inhibitors, with a view to developing new treatment options for gastrointestinal stromal tumors.

**【Key words】** Gastrointestinal stromal tumor; Tyrosine kinase inhibitor; Niclosamide; Mechanisms of resistance; Combination therapy

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是一种潜在的恶性肉瘤, 起源于间质 Cajal 细胞, 是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤<sup>[1]</sup>, 全球患病率(6~22)/100 万<sup>[2-5]</sup>, 其主要发病的年龄集中在 55~65 岁, 20%~30% 的病例在初始发现阶段即出现了转移, 而在尸检中发现高达 20% 的患者有微小 GIST<sup>[6]</sup>。GIST 的临床表现多样, 主要包括腹痛、消化不良、贫血、出血等症状<sup>[7]</sup>。手术根治性切除是治疗 GIST 的主要手段, 但术后复发及转移严重影响了患者的预后<sup>[8]</sup>。大部分 GIST 是由于酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)或血小板衍生生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFRα)的基因突变所导致, 因此临幊上研发了数代 TKI, 其疗效取得了广泛认可, 但 GIST 患者常因耐药性而让 TKI 治疗

的效果大打折扣<sup>[9]</sup>。近些年, 有研究发现表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变促进了 GIST 的发生发展。因此, 氯硝柳胺作为一种新的抗肿瘤药物进入了人们的视线, 随着对其药物特性的进一步了解, 溶解度更高的纳米晶制剂应运而生<sup>[10]</sup>。文章就 GIST 的发病机制、TKI 耐药的背景、TKI 耐药机制及展望、GIST 与 EGFR 的激活、氯硝柳胺在 GIST 中的应用, 以及氯硝柳胺纳米晶的出现作一综述。

#### 1 GIST 的发病机制

目前研究表明, KIT 突变或 PDGFRα 突变可见于 75%~80% 的 GIST 患者癌细胞中, KIT 突变通过使正常细胞表面的生长因子受体 KIT/CD117 蛋白缩短改变酪氨酸蛋白激酶活性, 影响细胞的存活与增殖<sup>[9]</sup>。其余没有 KIT 或 PDGFRα 突变的

GIST 被称为野生型 GIST<sup>[11-12]</sup>。KIT 和 PDGFR $\alpha$  基因均编码Ⅲ型受体酪氨酸激酶,当其发生突变时,便会使激酶摆脱抑制,自动激活。异常激活的酪氨酸激酶进一步激活下游的信号通路,如 PI3K-AKT-mTOR 和 RAS-MEK-ERK 通路,进而抑制肿瘤细胞的凋亡,使肿瘤细胞的增殖不受控制<sup>[13]</sup>。

## 2 TKI 耐药的背景

TKI 是一种小分子化合物,能够抑制酪氨酸激酶的活性,从而阻断肿瘤细胞的信号传导通路,抑制肿瘤细胞的生长和扩散。TKI 主要通过抑制 KIT 和 PDGFR $\alpha$  等酪氨酸激酶受体,从而达到抗肿瘤的治疗效果<sup>[14-16]</sup>。1998 年 Hirota 等<sup>[17]</sup> 发现在 GIST 中 KIT 基因的功能获得性突变,直接推动了 TKI 一线药物甲磺酸伊马替尼在 GIST 治疗中的实践。

目前,TKI 在 GIST 的治疗中应用广泛,主要用于晚期 GIST 及危险度评估具有中高危复发风险的患者,也可用于术前辅助治疗,以期减小 GIST 体积,缩小手术范围,避免不必要的联合脏器切除<sup>[18]</sup>。伊马替尼、舒尼替尼、瑞戈非尼、瑞派替尼分别是目前一、二、三、四线推荐方案,四者对 KIT 不同突变点有着各自的优势。研究显示,伊马替尼在 81% 的 GIST 患者中有明显的临床疗效,可显著延长 GIST 患者中位总生存(overall survival, OS)时间和无进展生存(progress free survival, PFS)时间,但一线治疗耐药后,后线治疗的疗效有限<sup>[19-20]</sup>。而在之后的研究中发现,虽然 TKI 可能引发诸如严重的恶心、呕吐、腹泻、视觉与味觉障碍、麻木、刺痛等一系列不良反应<sup>[21]</sup>,并且 c-kit 中的激活环突变常常导致耐药性的出现<sup>[22]</sup>,但不可否认的是,TKI 仍是治疗 GIST 的唯一有效药物,TKI 的成功应用已成为精准医学时代分子靶向药物治疗的里程碑。

**2.1 TKI 耐药机制及挑战** TKI 的耐药性是治疗 GIST 的一个主要挑战,这可能是原发性耐药,也可能是 KIT/PDGFR $\alpha$  突变所致的继发性耐药,严重影响治疗的疗效及预后<sup>[23]</sup>。临床实践中,靶向药物以固定剂量给药,由于患者间存在显著的个体差异,常常导致部分患者治疗效果不佳,出现疾病进展或耐药,甚至部分患者发生严重不良反应<sup>[24]</sup>。大量多中心临床研究表明,TKI 一线药物伊马替尼在治疗晚期 GIST 的过程中更多发生细胞抑制而非细胞毒作用,仅有约 5% 的 GIST 患者可达到完全临床缓解,且 50% 的 GIST 患者接受伊马替尼治疗 2 年后出现继发性耐药,多数患者即使在伊马替尼治疗获益后也将发生继发性耐药<sup>[25-27]</sup>。

GIST 对伊马替尼的获得性耐药主要是由 KIT 激酶结构域中的继发基因突变引起的<sup>[28]</sup>,继发耐药的二次突变通常出现在编码 ATP 结合口袋的 KIT13 和 KIT14 号外显子中,其突变直接干扰药物与 ATP 结合区结合,而外显子 KIT17 和 KIT18 突变作用于活化环,导致 KIT 持续活化,从而阻碍药物的相互作用<sup>[29]</sup>。这些突变优先位于第一或第二酪氨酸激酶结构域,且结构域中单个氨基酸的交换可能导致氢键的破坏或三维受体构象的变化,进而干扰 TKI 的结合,使 KIT 或 PDGFR $\alpha$  下游信号通路重新激活,阻碍伊马替尼的最佳结合<sup>[30]</sup>。

单种 TKI 在晚期 GIST 中的治疗似乎已经遇到了瓶颈,转而寻求多线 TKI 药物的治疗,然而多线治疗耐药后的难治性

GIST 仍缺乏有效的治疗手段。有学者探索了伊马替尼和瑞戈非尼交替使用的给药模式,发现疗效与伊马替尼连续治疗相近,但不良反应显著增加,耐药时间的测定因不良反应更明显而终止<sup>[31]</sup>。Serrano 等<sup>[32]</sup> 将舒尼替尼与瑞戈非尼交替用于病理确诊为 GIST 的患者,发现其疗效与单药使用的获益相差不大。因此,人们在探索新一代 TKI 药物研发的同时,将注意力放到了旧药新用的领域——氯硝柳胺与当前疗法的结合以克服癌症的耐药性<sup>[33]</sup>。目前研究表明,氯硝柳胺不仅可以用于单向治疗,还可以用于联合治疗,因此,采用联合用药的方式可达到协同作用,或者提高其抗肿瘤作用<sup>[34]</sup>。

**2.2 GIST 与 EGFR 的激活** EGFR 是 ErbB 家族的酪氨酸激酶受体,与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)结合,通过酪氨酸激酶结构域进行的自磷酸化和转磷酸化导致下游效应子的增殖及细胞生存信号的激活来促进肿瘤的发生发展<sup>[35]</sup>,在肿瘤生物学中起着重要的作用。EGFR 突变不仅是肿瘤发生发展的一个可疑因素,还可能是靶向治疗选择的一个因素。研究表明,EGFR 突变存在于大多数 GIST 中,EGFR 的激活可促进 STAT-3 的进一步激活,进而促进肿瘤细胞的增殖及抑制细胞的凋亡<sup>[36-37]</sup>。在 Lopes 等<sup>[38]</sup> 的研究中发现,约 96% 的 GIST 存在 EGFR 过度表达。在 Cai 等<sup>[39]</sup> 的一项研究中,首次描述了 GIST 中存在 EGFR 自分泌环,破坏该自分泌环或者抑制 EGFR 的表达会导致肿瘤细胞的生长停滞。同时 Nakagawa 等<sup>[40]</sup> 在此基础上进一步研究表明 ADAM17(A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein)介导的 EGFR 配体的脱落是激活 EGFR 及发生磷酸化的关键机制,这可能为对伊马替尼耐药的 GIST 提供新的治疗思路。Colomiere 等<sup>[41]</sup> 发现 EGFR 在卵巢癌中同样过表达,这种过表达直接或间接促进恶性卵巢癌中 STAT-3 的激活,证明了 STAT-3 可能是导致卵巢癌发生的机制之一。Rajakumar 等<sup>[42]</sup> 对 EGFR 高表达的乳腺癌患者行药物抑制研究,发现通过对 STAT-3 通路的抑制可以阻止血管生成和侵袭作用,对乳腺癌产生有益的作用。以上均表明 STAT-3 在促进肿瘤增殖方面的关键作用,而 EGFR 在 GIST 的发生发展中起着始动作用,即 EGFR 促进 STAT-3 的磷酸化。

## 3 氯硝柳胺在 GIST 中的应用

氯硝柳胺是一种无味、不易溶于水的黄白色结晶粉末,20 世纪 50 年代初,氯硝柳胺主要用于防治钉螺,1982 年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)将氯硝柳胺纳入世界卫生组织的基本药物清单<sup>[43]</sup>。

**3.1 氯硝柳胺的临床研究状况** 在近 10 年的药物研究中,氯硝柳胺被认为是一种潜在的抗肿瘤、抗炎和抗病毒药物<sup>[44]</sup>。研究显示该药物对多种癌症具有治疗潜力,包括乳腺癌、骨肉瘤、肺癌、黑色素瘤、前列腺癌、白血病、消化系统肿瘤(如胃肠间质瘤、结肠癌、肝癌、食管癌)、生殖系统肿瘤(如卵巢癌)、内分泌系统肿瘤(如肾上腺皮质癌)、神经系统肿瘤(如恶性胶质瘤、头颈癌)等<sup>[45-50]</sup>。氯硝柳胺是一种线粒体解偶联剂,它可以改变 Wnt/ $\beta$ -catenin、mTOR、Notch、NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 的信号通路<sup>[51]</sup>,从而具有多种药理活性。氯硝柳胺在抗肿瘤方面的作用与其抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及诱导细胞凋亡、损伤肿瘤细胞

线粒体、抑制肿瘤干细胞等相关<sup>[52]</sup>。因此,氯硝柳胺与靶向药物联合用药,可恢复药物敏感性,大大增强抗肿瘤的作用,也用于降低耐药性<sup>[53-57]</sup>。

**3.2 氯硝柳胺治疗 GIST 的作用机制** 氯硝柳胺用于治疗 GIST 与其能破坏肿瘤细胞线粒体有关,其可以阻断控制癌症发生发展的多种信号通路,诱导癌细胞周期停滞、生长抑制和凋亡<sup>[10]</sup>。其作用机制主要是通过抑制 EGFR 介导的 STAT-3 磷酸化,并上调 DR-4 的表达。

**3.2.1 氯硝柳胺抑制 EGFR 介导的 STAT-3 磷酸化:** STAT-3 是一个转录因子,参与细胞信号转导与基因表达调控<sup>[58]</sup>,EGF 刺激 STAT-3 激活,将转录信号从细胞质转移至细胞核中,参与肿瘤细胞的增殖、转移及血管生成<sup>[59]</sup>。在 GIST 中,由于 EGF 的过度表达,与 EGFR 结合能够磷酸化多个细胞内信号分子,如 Ras、Raf、MEK 等,进一步影响 STAT-3 的激活,预示不良的预后<sup>[60]</sup>。此外,STAT-3 在肿瘤微环境中的免疫细胞内也过度激活,而肿瘤微环境在促进肿瘤进展和调节治疗耐药方面起着重要的作用<sup>[61-62]</sup>。氯硝柳胺可以干扰 STAT-3 的磷酸化来阻止功能性 STAT-3 二聚体的形成,使 EGFR/STAT-3 信号通路失活<sup>[63]</sup>,进而发挥抗肿瘤的特性。Lee 等<sup>[64]</sup>评估了氯硝柳胺对食管癌化疗药物的反应性,通过蛋白印迹法发现氯硝柳胺抑制了 STAT-3 的磷酸化,此外,还深入探究了氯硝柳胺与化疗药物联合使用的效果,发现这种联合治疗方案在保持疗效的同时显著降低了化疗药物的剂量要求,证明了其在联合治疗中的作用。Shi 等<sup>[65]</sup>研究发现,氯硝柳胺在结肠癌细胞中是一种有效的 STAT-3 抑制剂,氯硝柳胺可增加结肠癌细胞对厄洛替尼的敏感性,揭示了联合用药在抑制 STAT-3 磷酸化中的显著作用。

**3.2.2 氯硝柳胺上调 DR-4 介导的细胞凋亡:** DR-4 基因,也称 TRAIL-R1 或 Apo-2,是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 的受体之一,TRAIL 是一种能够诱导肿瘤细胞凋亡的蛋白质<sup>[66]</sup>,当 TRAIL 与 DR-4 结合后,会导致死亡受体的寡聚化,募集 FADD (fas-associated death domain) 分子,通过 DD (death domain) 的相互作用结合受体<sup>[67]</sup>,通过 DED (death effector domain) 之间的相互作用又募集到 Pro-Caspase-8,最终 Pro-caspase-8 转化为 Caspase-8 导致细胞凋亡<sup>[68-69]</sup>。在 GIST 的发生发展中,EGFR 刺激 STAT-3 的激活,进而负调控 DR-4,帮助肿瘤细胞逃避细胞凋亡<sup>[70]</sup>。氯硝柳胺用于 GIST 可使 Caspase-8、Caspase-3 发生裂解,上调 DR-4 受体的表达,并且诱导 GIST 中线粒体的损伤<sup>[71-72]</sup>,释放细胞色素-C 并启动内在细胞凋亡,上调 Bax 和下调 Bcl-2,从而促进肿瘤细胞发生凋亡<sup>[10,73-75]</sup>。氯硝柳胺也可通过上调 GIST-T1 细胞中 DR-4 的表达,触发肿瘤细胞的凋亡。Syamprasad 等<sup>[37]</sup>发现,在使用氯硝柳胺治疗的 GIST 中,使用 AO/EB 染色可观察到细胞凋亡的形态,如核碎裂、凋亡小体等的形成。

**3.3 氯硝柳胺的局限性** 尽管氯硝柳胺在治疗各种癌症中有巨大的潜力,但由于氯硝柳胺的理化性质及高首过消除率,氯硝柳胺的口服利用度较低,吸收率亦相对较低,其生物利用度低是其溶解度低的结果<sup>[76-77]</sup>。此外,氯硝柳胺在肝脏和小肠中的首过代谢以及清除率的增加也是其利用的一个难题。在综

合其他给药途径后,结合氯硝柳胺的安全性,口服具有较低的毒性,而当行腹腔注射和静脉注射时,氯硝柳胺则表现出非特异性毒性,如行为改变、低通气、惊厥和镇静,如果长期接触,可导致体重减轻<sup>[78]</sup>。这些局限性可能会阻碍其作为抗肿瘤药物的广泛使用,同时间接促进了氯硝柳胺新型制备药的出现。

**3.4 氯硝柳胺纳米晶的出现** 氯硝柳胺纳米晶是一种由表面活性剂或聚合物稳定的亚微米胶体分散体系<sup>[79]</sup>。Syamprasad 等<sup>[37]</sup>使用沉淀法配制晶体,通过高压均质制备的纳米晶体产生直径 800~1 000 nm 的颗粒,再通过溶剂蒸发和探针超声处理制备的纳米晶体得到 200~400 nm 的粒径,是一项旨在提高药物治疗指数、应对药物不溶性的成熟药物制备方法,在某种程度上改变了其药代动力学参数。Ye 等<sup>[80]</sup>使用湿法介质研磨制备了由吐温 80 稳定的氯硝柳胺纳米晶,与氯硝柳胺对比有相似的性能,给药 4 h 后心脏、脾脏和肺中的药物水平升高,生物分布发生了变化。

氯硝柳胺纳米晶的溶解度及抗肿瘤活性大大增强。实验表明,氯硝柳胺纳米晶在小鼠的 GIST 异种接种模型中产生显著的抗肿瘤特性。氯硝柳胺纳米晶相较于氯硝柳胺在水和磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中溶解度提高了 25 倍,由于其生物利用度的提高,氯硝柳胺纳米晶的摄取率增加了 2 倍,其抗肿瘤活性也有显著提高<sup>[37]</sup>。

氯硝柳胺纳米晶对于 GIST-T1 细胞的生长抑制作用是氯硝柳胺的 2 倍,同时其诱导活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 水平增高,增强对肿瘤细胞的杀伤和凋亡诱导<sup>[37,72]</sup>。这使得氯硝柳胺纳米晶成为临床医生感兴趣的研究课题,为将来应用于临床诊治提供新的治疗方案。

#### 4 小结与展望

综上所述,目前降低 TKI 的耐药性是治疗 GIST 的关键,而临幊上解决 TKI 产生的耐药性则存在着显著的局限性。氯硝柳胺纳米晶作为旧药新用的一个代表,在抗肿瘤增殖以及调节死亡受体等方面具有巨大的潜力,极大地控制了肿瘤细胞的生长和扩散。笔者认为,氯硝柳胺纳米晶与 TKI 联合应用有降低 GIST 耐药的可能,仍需大规模的研究进一步发掘其合理的联合用药方案并验证该理论的可行性。未来的研究方向可继续深入探究氯硝柳胺降低 TKI 耐药性的机制,开展大规模的随机对照试验,进一步观察其疗效,同时关注纳米晶药物长期使用的安全性问题。

#### 参考文献

- [1] Li J, Xu D, Huang WF, et al. Efficacy and safety of endoscopic resection for gastric gastrointestinal stromal tumors originating from the muscularis propria [J/OL]. Digestive Diseases and Sciences, 2024 [2024-04-30]. DOI:10.1007/s10620-024-08359-z.
- [2] Soreide K, Sandvik OM, Soreide JA, et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (gist): a systematic review of population-based cohort studies [J]. Cancer Epidemiology, 2016, 40: 39-46. DOI:10.1016/j.canep.2015.10.031.
- [3] Yang Z, Zheng R, Zhang S, et al. Incidence, distribution of histological subtypes and primary sites of soft tissue sarcoma in China [J]. Cancer Biology & Medicine, 2019, 16 (3): 565-574. DOI:10.

- 20892/j. issn. 2095-3941. 2019. 0041.
- [4] Verschoor AJ, Bovée JVMG, Overbeek LIH, et al. The incidence, mutational status, risk classification and referral pattern of gastro-intestinal stromal tumours in the netherlands: a nationwide pathology registry ( palga ) study [ J ]. An International Journal of Pathology , 2018 , 472 ( 2 ) : 221-229. DOI:10.1007/s00428-017-2285-x.
- [5] De Pinieux G, Karanian M, Le Loarer F, et al. Nationwide incidence of sarcomas and connective tissue tumors of intermediate malignancy over four years using an expert pathology review network [ J ]. PloS One , 2021 , 16 ( 2 ) : e0246958. DOI: 10. 1371/journal.pone.0246958.
- [6] Blay JY, Kang YK, Nishida T, et al. Gastrointestinal stromal tumours [ J ]. Nature Reviews Disease Primers , 2021 , 7 ( 1 ) : 22. DOI:10. 1038/s41572-021-00254-5.
- [7] Yang W, Jones A, Mahil A, et al. Management of gastrointestinal stromal tumor and acute appendicitis during pregnancy: a case report [ J ]. Case Reports in Women's Health , 2024 , 43 : e00635. DOI: 10. 1016/j.crwh.2024. e00635.
- [8] Von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS, et al. Soft tissue sarcoma, version 2. 2018, nccn clinical practice guidelines in oncology [ J ]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network , 2018 , 16 ( 5 ) : 536-563. DOI:10. 6004/jnccn.2018. 0025.
- [9] Wang WJ, Li HT, Yu JP, et al. Identification of key genes and associated pathways in KIT/PDGFRa wild-type gastrointestinal stromal tumors through bioinformatics analysis [ J ]. Molecular Medicine Reports , 2018 , 18 ( 5 ) : 4499-4515. DOI:10. 3892/mmr.2018. 9457.
- [10] Wang Z, Ren J, Du J, et al. Niclosamide as a promising therapeutic player in human cancer and other diseases [ J ]. International Journal of Molecular Sciences , 2022 , 23 ( 24 ) : 16116. DOI: 10. 3390/ijms232416116.
- [11] Pantaleo MA, Nannini M, Corless CL, et al. Quadruple wild-type ( wt ) gist: defining the subset of gist that lacks abnormalities of KIT, PDGFRa, sdh, or ras signaling pathways [ J ]. Cancer Medicine , 2015 , 4 ( 1 ) : 101-103. DOI:10. 1002/cam4. 325.
- [12] Wong NACS, Wingate J, Gradhand E. An immunohistochemical study of potential diagnostic and therapeutic biomarkers of wild-type gastrointestinal stromal tumours [ J ]. Histopathology , 2015 , 67 ( 3 ) : 378-385. DOI:10. 1111/his. 12667.
- [13] Pantaleo MA, Heinrich MC, Italiano A, et al. A multicenter, dose-finding, phase 1b study of imatinib in combination with alpelisib as third-line treatment in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor [ J ]. BMC Cancer , 2022 , 22 ( 1 ) : 511. DOI:10. 1186/s12885-022-09610-4.
- [14] Wu CE, Tzen CY, Wang SY, et al. Clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumor ( gist ): from the molecular genetic point of view [ J ]. Cancers , 2019 , 11 ( 5 ) : 679. DOI: 10. 3390/cancers11050679.
- [15] Mazzocca A, Napolitano A, Silletta M, et al. New frontiers in the medical management of gastrointestinal stromal tumours [ J ]. Therapeutic Advances in Medical Oncology , 2019 , 11 : 1758835919841946. DOI:10. 1177/1758835919841946.
- [16] Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/akt signaling pathway and cancer: an updated review [ J ]. Annals of Medicine , 2014 , 46 ( 6 ) : 372-383. DOI:10. 3109/07853890.2014. 912836.
- [17] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors [ J ]. Science , 1998 , 279 ( 5350 ) : 577-580. DOI:10. 1126/science.279.5350.577.
- [18] Lin JX, Chen QF, Zheng CH, et al. Is 3-years duration of adjuvant imatinib mesylate treatment sufficient for patients with high-risk gastrointestinal stromal tumor? a study based on long-term follow-up [ J ]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology , 2017 , 143 ( 4 ) : 727-734. DOI:10. 1007/s00432-016-2334-x.
- [19] Kelly CM, Gutierrez Sainz L, Chi P. The management of metastatic gist: current standard and investigational therapeutics [ J ]. Journal of Hematology & Oncology , 2021 , 14 ( 1 ) : 2. DOI:10. 1186/s13045-020-01026-6.
- [20] Arshad J, Costa PA, Barreto-Coelho P, et al. Immunotherapy strategies for gastrointestinal stromal tumor [ J ]. Cancers , 2021 , 13 ( 14 ) : 3525. DOI:10. 3390/cancers13143525.
- [21] Zhou Y, Chen J, Weng X, et al. Establishment of a gist-t1 gastrointestinal stromal tumour cell line resistant to imatinib mesylate [ J ]. Oncology Letters , 2018 , 15 ( 5 ) : 7589-7594. DOI: 10. 3892/ol. 2018. 8283.
- [22] 黄绍清, 郭晓丹, 张信华. 晚期胃肠道间质瘤联合靶向药物治疗进展 [ J/OL ]. 消化肿瘤杂志:电子版, 2023, 15 ( 3 ) : 207-214.
- [23] Blay JY, Péröl D, Le Cesne A. Imatinib rechallenge in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors [ J ]. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology , 2012 , 23 ( 7 ) : 1659-1665. DOI:10. 1093/annonc/mdr622.
- [24] Verheijen RB, Yu H, Schellens JHM, et al. Practical recommendations for therapeutic drug monitoring of kinase inhibitors in oncology [ J ]. Clinical Pharmacology and Therapeutics , 2017 , 102 ( 5 ) : 765-776. DOI:10. 1002/cpt. 787.
- [25] Grunewald S, Klug LR, Mühlberg T, et al. Resistance to avapritinib in pdgfra-driven gist is caused by secondary mutations in the pdgfra kinase domain [ J ]. Cancer Discovery , 2021 , 11 ( 1 ) : 108-125. DOI:10. 1158/2159-8290. CD-20-0487.
- [26] Clarke WA, Chatelut E, Fotoohi AK, et al. Therapeutic drug monitoring in oncology: international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology consensus guidelines for imatinib therapy [ J ]. European Journal of Cancer ( Oxford, England: 1990 ) , 2021 , 157 : 428-440. DOI:10. 1016/j.ejca.2021. 08. 033.
- [27] Ishida T, Takahashi T, Nishida T, et al. New response evaluation criteria using early morphological change in imatinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumor [ J ]. Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association , 2022 , 25 ( 1 ) : 218-225. DOI: 10. 1007/s10120-021-01234-0.
- [28] 刘芳岑, 邱毓灵, 王琴, 等. 胃肠道间质瘤伊马替尼耐药机制研究进展:从经典视角到免疫微环境视角 [ J ]. 肿瘤综合治疗电子杂志 , 2022 , 8 ( 3 ) : 26-30.
- [29] Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology [ J ]. Nature Reviews Cancer , 2011 , 11 ( 12 ) : 865-878. DOI:10. 1038/nrc3143.

- [30] Antonescu CR, DeMatteo RP. CCR 20th anniversary commentary: a genetic mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumor—where are we a decade later? [J]. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2015, 21 ( 15 ) : 3363-3365. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3120.
- [31] Yip D, Zaleberg JR, Blay JY, et al. ALT-gist: randomized phase II trial of imatinib alternating with regorafenib versus imatinib alone for the first-line treatment of metastatic gastrointestinal stromal tumor (gist). [J]. Journal of Clinical Oncology, 2019, 37 ( 15\_suppl ) : 11023-11023. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.11023.
- [32] Serrano C, Leal A, Kuang Y, et al. Phase I study of rapid alternation of sunitinib and regorafenib for the treatment of tyrosine kinase inhibitor refractory gastrointestinal stromal tumors [J]. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2019, 25 ( 24 ) : 7287-7293. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2150.
- [33] Ren J, Wang B, Wu Q, et al. Combination of niclosamide and current therapies to overcome resistance for cancer: new frontiers for an old drug [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 155 : 113789. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113789.
- [34] Pan JX, Ding K, Wang CY. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells [J]. Chinese Journal of Cancer, 2012, 31 ( 4 ) : 178-184. DOI: 10.5732/cjc.011.10290.
- [35] Wang YT, Yang PC, Zhang JY, et al. Synthetic routes and clinical application of representative small-molecule EGFR inhibitors for cancer therapy [J]. Molecules ( Basel, Switzerland ), 2024, 29 ( 7 ) : 1448. DOI: 10.3390/molecules29071448.
- [36] Rajakumar T, Pugalendhi P. Allyl isothiocyanate inhibits invasion and angiogenesis in breast cancer via EGFR mediated jak-1/stat-3 signaling pathway [J]. Amino Acids, 2023, 55 ( 8 ) : 981-992. DOI: 10.1007/s00726-023-03285-2.
- [37] Syamprasad N, Madje N, Bachannagari J, et al. Niclosamide nanocrystal for enhanced in-vivo efficacy against gastrointestinal stromal tumor via regulating EGFR/stat-3/dr-4 axis [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 81 : 104221. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104221.
- [38] Lopes LF, Bacchi CE. EGFR and gastrointestinal stromal tumor: an immunohistochemical and fish study of 82 cases [J]. Modern Pathology, 2007, 20 ( 9 ) : 990-994. DOI: 10.1038/modpathol.3800932.
- [39] Cai YC, Jiang Z, Vittimberga F, et al. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours [J]. Virchows Archiv, 1999, 435 ( 2 ) : 112-115. DOI: 10.1007/s004280050407.
- [40] Nakagawa M, Nabeshima K, Asano S, et al. Up-regulated expression of adam17 in gastrointestinal stromal tumors: coexpression with EGFR and EGFR ligands [J]. Cancer Science, 2009, 100 ( 4 ) : 654-662. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01089.x.
- [41] Colomiere M, Ward AC, Riley C, et al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through jak2/stat3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas: 1 [J]. British Journal of Cancer, 2009, 100 ( 1 ) : 134-144. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604794.
- [42] Rajakumar T, Pugalendhi P. Allyl isothiocyanate inhibits invasion and angiogenesis in breast cancer via egfr-mediated jak-1/stat-3 signaling pathway [J]. Amino Acids, 2023, 55 ( 8 ) : 981-992. DOI: 10.1007/s00726-023-03285-2.
- [43] Jiang W, Yang X, Han X, et al. Treatment of hnsc and pulmonary metastasis using the anti-helminthic drug niclosamide to modulate stat3 signaling activity [J]. Journal of Cancer, 2024, 15 ( 13 ) : 4406-4416. DOI: 10.7150/jca.95682.
- [44] Kadri H, Lambourne OA, Mehellou Y. Niclosamide, a drug with many (re) purposes [J]. ChemMedChem, 2018, 13 ( 11 ) : 1088-1091. DOI: 10.1002/cmde.201800100.
- [45] Londono-Joshi AI, Arend RC, Aristizabal L, et al. Effect of niclosamide on basal-like breast cancers [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2014, 13 ( 4 ) : 800-811. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0555.
- [46] Liao Z, Nan G, Yan Z, et al. The anthelmintic drug niclosamide inhibits the proliferative activity of human osteosarcoma cells by targeting multiple signal pathways [J]. Current Cancer Drug Targets, 2015, 15 ( 8 ) : 726-738. DOI: 10.2174/1568009615666150629132157.
- [47] Liu C, Lou W, Armstrong C, et al. Niclosamide suppresses cell migration and invasion in enzalutamide resistant prostate cancer cells via stat3-ar axis inhibition [J]. The Prostate, 2015, 75 ( 13 ) : 1341-1353. DOI: 10.1002/pros.23015.
- [48] Suliman MA, Zhang Z, Na H, et al. Niclosamide inhibits colon cancer progression through downregulation of the notch pathway and upregulation of the tumor suppressor mir-200 family [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 38 ( 3 ) : 776-784. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2689.
- [49] King ML, Lindberg ME, Stodden GR, et al. WNT7A/β-catenin signaling induces fgf1 and influences sensitivity to niclosamide in ovarian cancer [J]. Oncogene, 2015, 34 ( 26 ) : 3452-3462. DOI: 10.1038/onc.2014.277.
- [50] Wieland A, Trageser D, Gogolok S, et al. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma [J]. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2013, 19 ( 15 ) : 4124-4136. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2895.
- [51] Shrestha R, Johnson E, Byrne FL. Exploring the therapeutic potential of mitochondrial uncouplers in cancer [J]. Molecular Metabolism, 2021, 51 : 101222. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101222.
- [52] Chen W, Mook RA, Premont RT, et al. Niclosamide: beyond an antihelminthic drug [J]. Cellular Signalling, 2018, 41 : 89-96. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.04.001.
- [53] Alasadi A, Chen M, Swapna GVT, et al. Effect of mitochondrial uncouplers niclosamide ethanolamine (nen) and oxyclozanide on hepatic metastasis of colon cancer [J]. Cell Death & Disease, 2018, 9 ( 2 ) : 215. DOI: 10.1038/s41419-017-0092-6.
- [54] Figarola JL, Singhal J, Singhal S, et al. Bioenergetic modulation with the mitochondria uncouplers sr4 and niclosamide prevents proliferation and growth of treatment-naïve and vemurafenib-resistant melanomas [J]. Oncotarget, 2018, 9 ( 97 ) : 36945-36965. DOI: 10.

- 18632/oncotarget. 26421.
- [55] Thi Tran U, Kitami T. Niclosamide activates the nlrp3 inflammasome by intracellular acidification and mitochondrial inhibition [J]. Communications Biology, 2019, 2(2). DOI:10.1038/s42003-018-0244-y.
- [56] Zhao J, He Q, Gong Z, et al. Niclosamide suppresses renal cell carcinoma by inhibiting wnt/β-catenin and inducing mitochondrial dysfunctions[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1436. DOI:10.1186/s40064-016-3153-x.
- [57] Zhu Y, Zuo W, Chen L, et al. Repurposing of the anti-helminthic drug niclosamide to treat melanoma and pulmonary metastasis via the stat3 signaling pathway[J]. Biochemical Pharmacology, 2019, 169: 113610. DOI:10.1016/j.bcp.2019.08.012.
- [58] Hanlon MM, Rakovich T, Cunningham CC, et al. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin m and tnfo on ra synovial fibroblast and endothelial cell function [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2056. DOI:10.3389/fimmu.2019.02056.
- [59] Garg B, Giri B, Modi S, et al. NF-κB in pancreatic stellate cells reduces infiltration of tumors by cytotoxic t cells and killing of cancer cells, via up-regulation of cxcl12[J]. Gastroenterology, 2018, 155(3): 880-891.e8. DOI:10.1053/j.gastro.2018.05.051.
- [60] Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the il-6/jak/stat3 signalling axis in cancer[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018, 15(4): 234-248. DOI:10.1038/nrclinonc.2018.8.
- [61] Martin JD, Cabral H, Stylianopoulos T, et al. Improving cancer immunotherapy using nanomedicines: progress, opportunities and challenges[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020, 17(4): 251-266. DOI:10.1038/s41571-019-0308-z.
- [62] Phuengkham H, Ren L, Shin IW, et al. Nanoengineered immune niches for reprogramming the immunosuppressive tumor microenvironment and enhancing cancer immunotherapy[J]. Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2019, 31(34): e1803322. DOI:10.1002/adma.201803322.
- [63] Min TR, Park HJ, Ha KT, et al. Suppression of egfr/stat3 activity by lupeol contributes to the induction of the apoptosis of human non-small cell lung cancer cells[J]. International Journal of Oncology, 2019, 55(1): 320-330. DOI:10.3892/ijo.2019.4799.
- [64] Lee MC, Chen YK, Hsu YJ, et al. Niclosamide inhibits the cell proliferation and enhances the responsiveness of esophageal cancer cells to chemotherapeutic agents [J]. Oncology Reports, 2020, 43(2): 549-561. DOI:10.3892/or.2019.7449.
- [65] Shi L, Zheng H, Hu W, et al. Niclosamide inhibition of STAT3 synergizes with erlotinib in human colon cancer[J]. OncoTargets and Therapy, 2017, 10: 1767-1776. DOI:10.2147/OTT.S129449.
- [66] Holland PM. Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right trail? [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2014, 25(2): 185-193. DOI:10.1016/j.cytofr.2013.12.009.
- [67] Wiezorek J, Holland P, Graves J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2010, 16(6): 1701-1708. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1692.
- [68] Green DR. The death receptor pathway of apoptosis[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2022, 14(2): a041053. DOI:10.1101/cshperspect.a041053.
- [69] Schaefer IM, Marino-Enríquez A, Fletcher JA. What is new in gastrointestinal stromal tumor? [J]. Advances in Anatomic Pathology, 2017, 24(5): 259-267. DOI:10.1097/PAP.0000000000000158.
- [70] Zou S, Tong Q, Liu B, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy[J]. Molecular Cancer, 2020, 19(1): 145. DOI:10.1186/s12943-020-01258-7.
- [71] Chen W, Mook RA, Premont RT, et al. Niclosamide: beyond an antihelminthic drug [J]. Cellular Signalling, 2018, 41: 89-96. DOI:10.1016/j.cellsig.2017.04.001.
- [72] Barbosa EJ, Löbenberg R, De Araujo GLB, et al. Niclosamide repositioning for treating cancer: challenges and nano-based drug delivery opportunities[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2019, 141: 58-69. DOI:10.1016/j.ejpb.2019.05.004.
- [73] Li Y, Li PK, Roberts MJ, et al. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: a new application for an old drug[J]. Cancer Letters, 2014, 349(1): 8-14. DOI:10.1016/j.canlet.2014.04.003.
- [74] Jang SG, Lee J, Hong SM, et al. Niclosamide suppresses the expansion of follicular helper t cells and alleviates disease severity in two murine models of lupus via stat3 [J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19(1): 86. DOI:10.1186/s12967-021-02760-2.
- [75] Wu MM, Zhang Z, Tong CWS, et al. Repurposing of niclosamide as a STAT3 inhibitor to enhance the anticancer effect of chemotherapeutic drugs in treating colorectal cancer [J]. Life Sciences, 2020, 262: 118522. DOI:10.1016/j.lfs.2020.118522.
- [76] Piao H, Rejinold NS, Choi G, et al. Niclosamide encapsulated in mesoporous silica and geopolymer: a potential oral formulation for covid-19 [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2021, 326: 111394. DOI:10.1016/j.micromeso.2021.111394.
- [77] Yu S, Piao H, Rejinold NS, et al. Niclosamide-clay intercalate coated with nonionic polymer for enhanced bioavailability toward covid-19 treatment[J]. Polymers, 2021, 13(7): 1044. DOI:10.3390/polym13071044.
- [78] Jara MO, Williams RO . The challenge of repurposing niclosamide: considering pharmacokinetic parameters, routes of administration, and drug metabolism [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 81: 104187. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104187.
- [79] Yang M, Wang AQ, Padilha EC, et al. Use of physiological based pharmacokinetic modeling for cross-species prediction of pharmacokinetic and tissue distribution profiles of a novel niclosamide prodrug [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1099425. DOI:10.3389/fphar.2023.1099425.
- [80] Ye Y, Zhang X, Zhang T, et al. Design and evaluation of injectable niclosamide nanocrystals prepared by wet media milling technique [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2015, 41(9): 1416-1424. DOI:10.3109/03639045.2014.954585.

(收稿日期:2024-05-10)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 023

## 综述

## 幽门螺杆菌感染根除方案研究进展

杜凤综述 杨杰, 武胜审校



基金项目: 贵阳市科技计划项目([2018]1-85号)

作者单位: 550000 贵阳, 贵州医科大学消化内科(杜凤、武胜); 553000 贵州六盘水, 六盘水市人民医院消化内科(杨杰)

通信作者: 武胜, E-mail: www5454sss@163.com

**【摘要】** 幽门螺杆菌(Hp)是一种革兰阴性菌,患者感染后可出现餐后嗳气、恶心、腹胀、腹部不适的胃肠疾病症状,具有引发胃癌的风险,因此,根除 Hp 是预防胃癌的一项措施。近年来,有关根除 Hp 的治疗方案研究报道诸多,包括双联疗法、序贯疗法、伴同疗法、镶嵌疗法以及中药联合疗法等,文章就国内外的研究进展作一综述,以期为根除 Hp 感染患者个体化精准治疗方案的选择提供理论依据和指导。

**【关键词】** 幽门螺杆菌感染; 根除方案; 研究现状

**【中图分类号】** R573.3      **【文献标识码】** A

**Research progress on eradication strategies for Helicobacter pylori infection Du Feng\*, Yang Jie, Wu Sheng.**

\* Department of Gastroenterology, Guizhou Medical University, Guiyang Province, Guiyang 550000, China

Funding program: Guiyang Science and Technology Plan Project ([2018]1-85)

Corresponding author: Wu Sheng, E-mail: www5454sss@163.com

**【Abstract】** Helicobacter pylori (Hp) is a gram-negative bacterium inherited from the stomach. In 2017, the World Health Organization defined it as one of the carcinogenic causes. After infection, patients may experience gastrointestinal symptoms such as postprandial belching, nausea, bloating, and abdominal discomfort. If not controlled, it may increase the risk of gastric cancer. Therefore, eradicating Hp is the mainstream view for preventing gastric cancer today. In recent years, there have been numerous research reports on treatment plans for eradicating Hp, including dual therapy, sequential therapy, concomitant therapy, inlay therapy, and the Traditional Chinese Medicine combination therapy. This article summarizes the research progress in China, in order to provide theoretical basis and guidance for the selection of personalized and precise treatment plans for eradicating Hp patients.

**【Key words】** Helicobacter pylori infection; Eradication strategy; Research progress

幽门螺杆菌(helicobacter pylori, Hp)是世界上较为普遍的慢性致病菌之一,世界卫生组织将其列为 I 类致癌原,因为它不仅可以导致胃肠道慢性炎性反应和消化性溃疡,甚至还有致癌风险<sup>[1-2]</sup>。一项全球 Hp 感染流行调查的 Meta 分析通过对来自 62 个国家/地区的数据进行评估,不同地区和国家之间的 Hp 患病率差异很大,即使在同一国家/地区, Hp 感染阳性率也存在显著差异,随着生活水平的提高,幽门螺杆菌感染率一直在下降,而大多数发展中国家的流行率仍然很高<sup>[3-5]</sup>。2021 年 6 月,中国疾控中心传染病预防控制所等单位发布《中国幽门螺杆菌感染防控》白皮书,指出我国居民幽门螺杆菌人群感染率近 50%,不同人群感染率在 35.4% ~ 66.4% 之间<sup>[6]</sup>。目前认为,根除 Hp 已成为胃癌的一级预防措施,其能够有效减轻胃的炎性反应,使胃黏膜的萎缩有机会发生逆转,在一定程度上能够预防胃癌的发生<sup>[7]</sup>。作为根除 Hp 感染方案中的抑酸药物,质子泵抑制剂(PPI)存在诸多局限性,难以达到抗菌的需求。随着科技的不断进步和社会的发展,药学领域也在不断演变和发展,为根治 Hp 提供了更多的选择。文章就近年来根除 Hp 感

染治疗方案的应用及研究进展作一综述。

## 1 幽门螺杆菌概述

幽门螺杆菌的传播方式以口腔—口腔传播为主,这解释了同一家庭成员(如父母和孩子)同时感染的常见情况。由于有些地方卫生条件差,患者可以通过摄入受污染的水源而感染,即粪口传播<sup>[8]</sup>。目前已发现,幽门螺杆菌感染引起的胃溃疡约占 70%,十二指肠溃疡高达 80%,是导致非医源性消化性溃疡疾病的重要因素。此外, Hp 会通过多种机制诱导胃部黏膜损伤和炎性反应,从而增加胃癌的风险<sup>[9-10]</sup>。

## 2 幽门螺杆菌感染的根除方案

2.1 双联疗法 随着抗生素应用的不断增加,以及滥用抗生素问题的出现,幽门螺杆菌对某些抗生素的抗药性也越来越强,临幊上对于如何有效根治 Hp,也做了很多的探索性研究<sup>[11-12]</sup>。双联疗法具体是使用质子泵抑制剂、铋剂联合 2 种抗生素治疗 Hp 感染患者,旨在通过质子泵抑制剂抑制胃酸分泌,提高胃液 pH,增加抗菌药物在胃液中的稳定性,降低抗菌药物的浓度,提高抗菌药物的疗效。目前临幊常用奥美拉唑与阿莫

西林联合治疗,奥美拉唑是一种质子泵抑制剂,在临幊上较常用于胃溃疡、十二指肠溃疡、急性胃炎等疾病,主要在肝脏经由细胞色素 P450 代谢为无活性的硫化物,能不可逆地抑制胃壁细胞质子泵的活性,阻断胃酸分泌的最后步骤,使胃液中的酸含量大为减少<sup>[13-14]</sup>。此外,奥美拉唑还可以抑制革兰阳性菌和革兰阴性菌的生长,发挥抗 Hp 的作用。阿莫西林作为半合成青霉素类广谱  $\beta$  内酰胺类抗生素之一,其通过抑制革兰阳性和阴性细菌细胞壁的合成为发挥其抗菌作用。有研究显示,将阿莫西林联合质子泵抑制剂对 Hp 感染患者进行治疗,可获得理想效果<sup>[15]</sup>。李强<sup>[16]</sup>研究显示,奥美拉唑和阿莫西林联合治疗对幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者治疗有效率为 84.17%, Hp 根除率为 72.53%。分析发现可能在于阿莫西林与细菌细胞壁的肽链交叉桥连接酶结合,阻断其作用,从而阻止细菌细胞壁的合成和修复,导致细菌凋亡。奥美拉唑则通过增加胃酸 pH,使幽门螺杆菌处于活跃期,容易被阿莫西林清除,继而提高根除 Hp 效果。

CYP2C19 是肝脏中一种编码重要药物代谢酶的基因,这种酶参与代谢许多药物,包括质子泵抑制剂,由于 CYP2C19 具有基因多态性,可导致药物代谢减少、缺失或增加,影响根除 Hp 的疗效<sup>[17-18]</sup>。余文珠<sup>[19]</sup>研究发现,第二代质子泵抑制剂受 CYP2C19 的影响更小,可能在于第二代质子泵抑制剂是非酶代谢途径,几乎不受 CYP2C19 作用影响,且与其他药物的相互作用较低,可为患者提供更确切、更平稳的疗效。为了充分研究大剂量双联疗法在根治 Hp 感染患者中的安全性,田玲琳等<sup>[20]</sup>对幽门螺杆菌根除展开含大剂量阿莫西林二联方案与含常规剂量阿莫西林四联方案进行研究,显示 2 种治疗方案初次治疗对于幽门螺杆菌根除效果相当,但含大剂量阿莫西林二联方案不良反应更轻。这一研究无疑为双联疗法在根治 Hp 的安全性提供了有力保障。

**2.2 序贯疗法** 序贯疗法是根除 Hp 感染的有效方法之一,临幊根据患者病情需要逐步采用不同治疗药物,以达到最佳治疗效果,该疗法注重治疗过程中阶段性调整,通过合理药物转换,实现根治 Hp 的效果。根治 Hp 的序贯疗法为前 5 d 应用质子泵抑制剂加阿莫西林口服,后 5 d 应用质子泵抑制剂,加克拉霉素,再加上甲硝唑口服治疗,从而达到根除 Hp 感染的治疗目的。国内一项荟萃分析中<sup>[21]</sup>,合计纳入了 9 项随机对照研究,患者共 835 例,显示序贯疗法总 Hp 根除率高于 7 d 及 10 d 三联疗法( $P = 0.002$ )。序贯疗法不良反应发生率与 7 d 或 10 d 三联疗法无明显差异,进一步说明使用序贯疗法对于根除 Hp 感染患者临幊效果显著。另一项国际的临床试验研究表明,这种方法用药 14 d 和四联疗法 14 d 同样有效,根除概率都在 90% 以上。在纪眉<sup>[22]</sup>研究中,其对 Hp 患者采用埃索美拉唑 + 阿莫西林连续治疗 5 d 后改用埃索美拉唑 + 甲硝唑 + 克拉霉素继续治疗 5 d,显示 Hp 清除率高达 94.49%,证实 10 d 序贯疗法对 Hp 具有可观的清除率。随着抗生素的广泛使用,Hp 的稳定性和多样性发生变化,并对多种抗菌药物产生耐药,导致 Hp 根除失败。因此,寻求更好的补救治疗方案可以更好地解决 Hp 根治失败的问题,提高患者的治疗效果和生活质量。张楠<sup>[23]</sup>对

Hp 根治失败者应用标准四联疗法或序贯疗法治疗,显示序贯组 PP、ITT 根除率、临床总有效率均高于四联组( $P < 0.05$ ),证实序贯疗法可作为首次 Hp 根治失败者的补救治疗方案,且效果优于标准四联疗法。分析原因,前 5 d 应用质子泵抑制剂加阿莫西林口服,阿莫西林可穿透 Hp 细胞内壁,利于后期的深入杀灭,质子泵抑制剂则能够高效快速抑制胃酸分泌和清除 Hp,且与阿莫西林联合使用时,能显著提高根除 Hp 的成功率;后 5 d 应用质子泵抑制剂 + 克拉霉素 + 甲硝唑口服治疗,克拉霉素是由红霉素衍生的半合成大环内酯类抗生素,在胃 pH 环境中较为稳定,能够保持 24 h 形成高细胞间浓度,对于 Hp 细胞复制有着良好的抑制作用。甲硝唑可以穿透 Hp 细菌细胞壁和细胞膜,进入细菌细胞内,与细菌的 DNA 结合,干扰 DNA 的正常复制和修复<sup>[24-25]</sup>。

**2.3 伴同疗法** 铋剂是一种常用于治疗 Hp 感染的药物,主要成分为铋,能够降低胃蛋白酶活性,增加黏蛋白分泌,促进黏膜释放前列腺素 2 等,从而起到胃黏膜的保护作用<sup>[26]</sup>。此外,铋剂可进入并聚集于 Hp 菌体,使之发生不规则收缩,菌膜破裂,最终杀灭幽门螺杆菌,抑制幽门螺杆菌所产生的蛋白酶、尿激酶和磷脂酶,对幽门螺杆菌清除率在 20% ~ 60%。尽管铋剂类药物能够保护胃部,但铋剂含重金属,长期过量服用会使重金属沉积在肝肾部位,损害肝功能,且临幊明确对于孕妇、哺乳期妇女、儿童及肾功能不全者慎用。伴同疗法作为一种不依赖铋剂的根除方案,均被我国共识<sup>[27]</sup>、马五共识(Maastricht V)<sup>[28]</sup>、多伦多共识<sup>[29]</sup>认为是最佳的非铋剂四联疗法,即标准剂量 PPI + 克拉霉素 500 mg/bid + 甲硝唑 400 mg/bid + 阿莫西林 1 000 mg/bid 程序 10 d 或 14 d。对于不适宜应用铋剂者而言,伴同疗法可作为一种有效的治疗方案。有荟萃分析显示,10 d 伴同疗法、序贯疗法及含铋剂四联疗法用于慢性胃炎患者的初始治疗,在缓解临幊症状方面无差别。而在对患者的 Hp 根除率方面,10 d 含铋剂四联疗法与伴同疗法要高于序贯疗法;在不良反应发生率方面,10 d 含铋剂四联疗法及序贯疗法要低于伴同疗法。在徐春波<sup>[24]</sup>研究中,发现伴同疗法的 Hp 根除率为 94.87%,高于序贯疗法组的 73.68% 和铋剂四联疗法组的 87.5%,且 3 组疗法的不良反应总发生率无显著性差异,说明伴同疗法对于 Hp 阳性患者根除效果显著。关于不良反应方面,国内学者却得出不同结论,如在吕国增<sup>[25]</sup>研究中显示,不含铋剂四联方案 Hp 根除率明显高于含铋剂四联疗法,不良反应发生率明显低于含铋剂四联疗法。分析可能在于铋剂类药物形成的不溶性胶沉淀难以被消化道吸收,微量的铋吸收后主要分布在肝、肾及其他组织中,以肾脏分布居多,并通过肾脏排泄,长期服用铋剂类药物对器官具有一定毒性作用,继而增加了患者的不良反应。

**2.4 镶嵌疗法** 镶嵌治疗即混合疗法,具有全面、多角度治疗、减少不良反应、提高治疗效果等优势,已成为根治 Hp 的新亮点。左晓春<sup>[30]</sup>研究初步证实 14 日莫西沙星序贯疗法与 14 日镶嵌疗法相比具有更高的 Hp 根除率、治疗依从性及更低的不良反应发生率。一项国外研究显示,混合疗法与目前主流指南推荐的治疗方法相比具有相同的疗效和依从性,且该疗法引

起的不良反应较少<sup>[31]</sup>。何小建等<sup>[32]</sup>将(埃索美拉唑+阿莫西林)×7 d+(埃索美拉唑+阿莫西林+克拉霉素+甲硝唑)×7 d作为根除 Hp 患者的混合疗法,显示混合疗法组 ITT 和 PP 根除率分别为 97.4% (75/77) 和 98.7% (75/76),说明混合疗法可用于 Hp 感染的一线治疗。分析原因可能在于 Hp 细菌容易通过突变产生新的耐药基因,且不同细菌之间可通过质粒传递耐药基因,进而可出现多重耐药菌。而镶嵌疗法能够克服双重耐药问题,并降低细菌负荷量,提高根除 Hp 效果。

**2.5 中药联合疗法** 目前,中医对 Hp 感染的认识已达成一致意见,将其归属中医的“邪气”范畴。已有诸多研究证实中西医联合疗法可获得理想的根除率,包括疏肝理气活血法、健脾清化法及木白散等,与三联疗法联合应用 Hp 根除率在 72.58% ~ 94.44%<sup>[33-36]</sup>。由此可见,中医药在根除 Hp 感染中也取得了较好的效果。中医认为 Hp 感染具“热”“毒”的性质,由于 Hp 外邪侵袭,邪正相争,终致本虚标实,脾胃虚弱为其本,湿热中阻为其标,影响肝脏和脾脏的气机运行,使湿热邪气蕴结于肝脾。同时气之于血,有温煦、推动、统摄的作用,这些作用均有赖于脾胃之气的旺盛充足。如此,胃络血瘀,瘀滞胃体,最终导致正虚、湿热、瘀血等多种病理因素的存在,使 Hp 感染缠绵难愈,故在治法方面当以活血、疏肝、健脾、清热为主。

### 3 小结与展望

由于 Hp 感染除了导致胃肠道本身病变外,还可能导致其他系统的疾病,包括神经系统疾病、皮肤病、血液病、眼部疾病、心血管疾病、代谢性疾病、过敏性疾病、肝胆疾病等。因此,Hp 的根除至关重要。目前对于根治 Hp 治疗研究也逐渐开展,包括双联疗法、序贯疗法、伴同疗法、镶嵌疗法等,绝大多数对于根治 Hp 效果显著,且不良反应较少。同时发现中医药联合疗法多以活血、疏肝、健脾、清热为主,无疑为医学研究提供新的思路和方向。然而,本研究也存在一定局限性,多数研究随访时间较短、观察指标单一等,缺乏大样本、多中心研究,希望今后能开展相关研究,为根治 Hp 的作用机制提供循证依据。

### 参考文献

- [1] Van Leerdam ME, Tytgat GNJ. Helicobacter pylori infection in peptic ulcer haemorrhage [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2002, 16 ( Suppl 1 ) : 66-78. DOI: 10. 1046/j. 1365-2036. 2002. 0160s1066. x.
- [2] Furuta T, Graham DY . Pharmacologic aspects of eradication therapy for Helicobacter pylori infection. [J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2010, 39(3) : 465-480. DOI: 10. 1016/j. gtc. 2010. 08. 007.
- [3] Li M, Sun Y, Yang J, et al. Time trends and other sources of variation in Helicobacter pylori infection in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. Helicobacter, 2020, 25 ( 5 ) : e12729. DOI: 10. 1111/hel. 12729.
- [4] Figura N, Franceschi F, Santucci A, et al. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection [J]. Helicobacter, 2010, 15 ( Suppl 1 ) : 60-68. DOI: 10. 1111/j. 1523-5378. 2010. 00778. x.
- [5] 薛建华,俞海萍.幽门螺杆菌感染的流行现状和危险生活方式研究进展[J].健康教育与健康促进,2021,16(4):378-382. DOI: 10.16117/j.cnki.31-1974/r.202104378.
- [6] 吕农华,谢川.我国幽门螺杆菌感染研究的回顾与展望[J].中华消化杂志,2021,41(4):217-220. DOI:10.3760/cma.j.cn311367-20210201-00075.
- [7] Zou YZ, Qian X, Liu XQ, et al. The effect of antibiotic resistance on Helicobacter pylori eradication efficacy: A systematic review and meta-analysis[J]. Helicobacter, 2020, 25 ( 4 ) : e12714. DOI: 10. 1111/hel. 12714.
- [8] Nakamura S, Matsumoto T . Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Recent progress in pathogenesis and management[J]. World J Gastroenterol, 2013 ( 45 ) : 7. DOI: 10. 3748/wjg. v19. i45. 8181.
- [9] 薛建华,俞海萍.幽门螺杆菌感染的流行现状和危险生活方式研究进展[J].健康教育与健康促进,2021,16(4):378-382. DOI: 10.16117/j.cnki.31-1974/r.202104378.
- [10] 李健,马林科,闫晨薇,等.宁夏海原县胃癌癌前病变危险因素分析[J].现代肿瘤医学,2021,29(14):2530-2535. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4992. 2021. 14. 029.
- [11] Wang ZJ, Han Y, Xing X, et al. MiRNA-98 inhibits ovarian carcinoma cell proliferation, migration and invasion via targeting SALL4[J]. Münchener medica, 2021, 112 ( 1 ) : 154-155. DOI: 10. 23736/S0026-4806. 19. 06179-2 .
- [12] Unge P, Gad A, Gnarpe H, et al. Does Omeprazole, 40 mg o. m. , improve antimicrobial therapy directed towards gastric campylobacter pylori in patients with antral gastritis [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1989, 24 ( Suppl 166 ) : 184. DOI: 10. 3109/00365528909091298.
- [13] 王川,周鸣强,黄文才.奥美拉唑关键中间体杂质[5-甲氧基苯并[d]噁唑-2(3H)-硫酮]的分离及结构确证[J].合成化学,2018, 26 ( 4 ) : 284-287. DOI: 10. 15952/j. cnki. ejsc. 1005-1511. 2018. 04. 17261.
- [14] 徐小平,王曙,贺英菊,等.奥美拉唑胶囊在健康人体内的药物动力学研究[J].华西药学杂志,2001,16(3):178-180. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-0103. 2001. 03. 006.
- [15] 韩德玉.奥美拉唑和阿莫西林治疗 Hp 感染并十二指肠球部溃疡出血的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(44): 87-88. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-3141. 2016. 44. 075.
- [16] 李强.奥美拉唑和阿莫西林联合治疗幽门螺杆菌阳性消化性溃疡的临床观察[J].中国现代医生,2010(19):2. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-9701. 2010. 19. 019.
- [17] Al-Jenoobi FI, Alkhafry KM, Alghamdi AM et al. CYP2C19 genetic polymorphism in Saudi Arabians. [J]. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2013, 112 ( 1 ) : 50-54. DOI: 10. 1111/j. 1742-7843. 2012. 00919. x.
- [18] Kesavan R, Narayan SK, Adithan C. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on phenytoin-induced neurological toxicity in Indian epileptic patients. [J]. European journal of clinical pharmacology, 2010, 66(7):689-696. DOI: 10. 1007/s00228-010-0817-2.
- [19] 余文珠.细胞色素P450 2C19 基因多态性对质子泵抑制剂抗幽门螺杆菌治疗的影响[D].南昌:南昌大学医学院,2015.
- [20] 田玲琳,李亚芳,楚俊红,等.含大剂量阿莫西林二联方案与含常规剂量阿莫西林四联方案用于幽门螺杆菌根除初次治疗的疗效分析[J].中国药物与临床,2018,18(6):954-956. DOI: 10. 11655/zgyylc2018. 06. 042.

(下转 1280 页)

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2024. 10. 024

## 综述

# 光学相干断层扫描血管成像技术在高度近视中的应用研究进展

李鲜综述 李雁杰审校

基金项目：山西省回国留学人员科研资助项目合同(2021-163)

作者单位：030001 太原，山西医科大学第一临床医学院(李鲜)；山西医科大学第一医院眼科(李雁杰)

通信作者：李雁杰，E-mail:liyanjie-0311@126.com



**【摘要】** 高度近视在亚洲人群中常见,发病率约4%,多为轴性近视,眼球后极部前后轴伸长。眼轴增长会使视网膜血管系统变化,如血管变窄、流速降低、毛细血管丢失,还会因视网膜薄弱导致脉络膜新生血管长入。因此,诊治时要考虑其对黄斑区、视盘区血流的影响。光学相干断层扫描血管成像技术能分层显示视网膜、脉络膜血管形态结构,为诊断和随访评估提供依据。文章对此技术在高度近视中的应用研究作一综述,为诊疗提供思路。

**【关键词】** 高度近视;光学相干断层扫描血管成像技术;临床应用

**【中图分类号】** R445.1;R778.1<sup>+</sup>1      **【文献标识码】** A

**Progress in the application of optical coherence tomography angiography in high myopia** Li Xian<sup>\*</sup>, Li Yanjie. <sup>\*</sup>The First Clinical College of Shanxi Medical University, Shanxi Province, Taiyuan 030001, China

**Funding program:** Scientific Research Support Project Contract for Returned Overseas Students in Shanxi Province (2021-163)

**Corresponding author:** Li Yanjie, E-mail: liyanjie-0311@126.com

**【Abstract】** High myopia is common in the Asian population, with an incidence of about 4%. Most of them are axial myopia, and the posterior pole of the eyeball is elongated in the anterior and posterior axis. Axial length can cause changes in the retinal vascular system, such as narrowing of blood vessels, reduction of blood flow velocity, loss of capillaries, and choroidal neovascularization due to weak areas of the retina. Therefore, its effect on blood flow in the macular area and optic disc area should be considered in the diagnosis and treatment. Optical coherence tomography angiography can display the vascular morphology of the retina and choroid in layers, which provides a basis for diagnosis and follow-up evaluation. This article reviews the application of this technology in high myopia, so as to provide ideas for diagnosis and treatment.

**【Key words】** High myopia; Optical coherence tomography angiography; Clinical application

我国人口近视发生率为33%,是世界平均水平22%的1.5倍,近视人数近4亿,居世界第一<sup>[1-2]</sup>。高度近视通常伴有裸眼视力下降、夜间视力差等多种症状<sup>[3]</sup>。高度近视可能通过减少视眼黄斑区或视盘区血管密度影响眼底微循环<sup>[4-5]</sup>,也可能因眼轴增长、眼球后壁牵引改变眼球及眼底正常功能<sup>[6-8]</sup>,这两种机制都可能使视网膜微血管密度降低<sup>[9]</sup>。所以,对高度近视进行检查时,需考虑其对黄斑区、视盘区血流的影响。光学相干断层扫描血管成像(optical coherence tomography angiography,OCTA)作为新一代眼科影像学检查,具有无创、快速、高分辨率等优势,已被迅速应用于眼底的临床诊疗和研究领域<sup>[10-13]</sup>。它能早期发现检眼镜等检查不显著的眼底病变,如中心凹无血管区扩大等。由于结合了光学和超声特点,其可识别视网膜、脉络膜结构及血流运动信息,为医生提供更详细的微血管图像,在高度近视的管理随访和治疗效果检测等方面独具优势。文章对该技术在高度近视中应用的研究进展予以综述。

## 1 OCTA 技术概述

OCTA技术是现代眼科影像学领域的一项重大突破。该技术基于光学相干断层扫描原理,巧妙地利用了相干光的干涉特性和血流中红细胞的运动特征来实现血管成像。相干光在眼内不同深度的组织界面发生反射,通过检测反射光的强度和时间延迟,构建出高分辨率的断层结构图像。同时,基于血流中运动的红细胞与周围静止组织对光的散射特性差异,采用多种算法,如相位对比法、幅度去相关法等,精确识别并提取出血管的信息。OCTA系统采用频域OCT技术,光源多为近红外波段,具有良好的组织穿透性。其扫描模式包括线性扫描、环形扫描和放射状扫描等,以适应不同部位和病变的检测需求。通过这些扫描方式,能够获取大量的断层图像数据,并借助强大的图像处理软件进行三维重建,从而全面展示视网膜和脉络膜血管的立体结构。OCTA技术具有诸多显著优势。其超高的空间分辨率可达到数微米级别,能够清晰分辨视网膜各层的细微

血管,包括毛细血管,这对于早期病变的检测至关重要。而且,它能够在短时间内完成大面积的扫描,快速获取血管图像,大大提高了检查效率。定量分析功能更是其一大亮点,不仅可以测量血管的密度、管径、血流速度等参数,还能对血管网络的复杂性和连通性进行评估<sup>[14]</sup>。与传统的血管造影技术如荧光素眼底血管造影和吲哚青绿血管造影比较,OCTA 无需注射外源性造影剂,避免了造影剂可能引起的过敏反应、肾损伤等潜在风险<sup>[15]</sup>。同时,它具有非侵入性、可重复性高的特点,患者接受度更好。此外,OCTA 能够分层显示视网膜和脉络膜的血管,使其对病变的定位和分层分析更为精准,有助于深入理解疾病的病理生理过程。

## 2 OCTA 技术在高度近视血流检测中的应用

**2.1 在脉络膜血流检测中的应用** 脉络膜是眼球器官中的重要组成部分,由血管构成,其不仅能够通过调节血流量来维持稳定的眼内压力,还能阻止光线在眼前内部的反射和散射,减少眼球内部的光干扰,提高视觉的清晰度<sup>[16]</sup>。已有研究发现,脉络膜血流密度降低引发的巩膜缺血、缺氧可能是导致近视发展的关键因素,进一步阐明脉络膜的厚度和近视发展的速度密切相关<sup>[17]</sup>。李疏凤等<sup>[18]</sup>研究指出,患者视网膜浅层和深层血流密度随着近视度数不断增加而降低,当每增加近视度数达到 100 度时,视网膜浅层血流密度则相应降低 0.35%,视网膜深层血流密度相应降低 0.33%。虽然临床很早观察到高度近视患者脉络膜会发生薄变,但脉络膜厚度变化是微米级的,过去没有定量的观察手段而无法准确地测量脉络膜厚度<sup>[19]</sup>。随着技术的发展,科学家开始将血管内超声和光学相干断层扫描结合起来,形成 OCTA 技术,一项研究发现<sup>[20]</sup>,高度轴性近视与巩膜和脉络膜后部变薄、视网膜变薄和赤道区视网膜色素上皮密度有关,而布鲁赫膜厚度与轴长无关。Da Silva 等<sup>[21]</sup>也发现高度近视患者的脉络膜非常薄,且随着近视程度的增加而进一步变薄,脉络膜的异常可能在近视退行性变的发病机制中发挥作用。廖燕红等<sup>[22]</sup>研究发现高度近视患者的脉络膜毛细血管密度与眼轴均呈负相关,说明随着眼轴增加脉络膜微血管密度相应减少。张丹凤等<sup>[23]</sup>对 94 例青少年近视患者双眼进行 OCTA 技术检测,发现低度、中度、高度近视患者脉络膜厚度差异显著,且脉络膜毛细血管密度与年龄呈正相关。刘帆等<sup>[24]</sup>使用 OCTA 测量高度、中度、低度近视患者和正常眼者脉络膜的差异,发现高度、中度近视患者脉络膜毛细血管血流空白区百分比高于正常者,且脉络膜毛细血管血流空白区百分比与眼轴长度呈正相关。此外,视盘旁萎缩弧是一种特征性的眼底改变,主要表现为视网膜的色素上皮层和脉络膜的毛细血管层均呈现一定萎缩的状态。王继文等<sup>[25]</sup>发现 50 例高度近视患者的上方、下方、颞侧和平均视网膜神经纤维厚度均显著低于 56 例中度近视患者及 44 例轻度近视患者,视盘旁萎缩弧  $\beta$  区血流密度显著低于中度及轻度近视患者,视盘旁萎缩弧  $\alpha$  区存在微血管丢失占比显著高于中度及轻度近视患者( $P < 0.05$ )。证实视盘旁萎缩弧  $\beta$  区微血管丢失可作为观察高度近视患者视神经乳头周围脉络膜毛细血管微血管变化的指标之一。

## 2.2 在视网膜黄斑区血流检测中的应用 黄斑中心凹的血液

供应来自脉络膜的毛细血管,高度近视会引起脉络膜毛细血管萎缩,导致脉络膜新生血管形成。这种新生血管容易破裂出血,对黄斑区造成损害。有研究发现,黄斑中心凹区域视网膜增厚能够增加近视患者黄斑中心凹血管密度及灌注密度<sup>[26]</sup>。冯立森等<sup>[27]</sup>研究发现,黄斑中心凹深层微血管密度与眼轴无相关性,黄斑中心凹处表层微血管密度与眼轴呈负相关,黄斑中心凹处深层微血管密度及表层微血管密度均与眼轴呈正相关。田春柳等<sup>[28]</sup>对单纯高度近视患者患眼黄斑不同区域视网膜血管密度采用 OCTA 进行观察,发现中心区、内层、外层的视网膜血管灌注密度差异显著,且眼轴长度与黄斑区整体及内层、外层的视网膜血管灌注密度均呈负相关。Ucak 等<sup>[29]</sup>将 92 例高度近视(眼轴长度  $\geq 26$  mm)患者和 70 例无任何已知系统性或眼部疾病的对照病例纳入前瞻性研究,经 OCTA 检查发现高度近视患者黄斑区视网膜浅层和深层的血管密度随着视轴长度的增加而降低,随视网膜神经纤维层和视网膜黄斑区神经节细胞复合体厚度的降低而降低。Liu 等<sup>[30]</sup>利用 OCTA 技术对轻度、中度、高度和极端近视组视网膜浅层、深层和全层的黄斑血管系统进行成像。发现轻度近视组视网膜浅层、深层和全层微血管密度最高,中度近视组次之,高度近视组更低,极端近视组最低。在同一层内,两两比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在四个象限中,只有鼻下象限的血管密度在轻度和中度组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。曾桂香<sup>[31]</sup>将儿童、青少年、青年非病理性高度近视患者纳入研究,使用 OCTA 技术观察视网膜脉络膜血流密度及黄斑各区域视网膜厚度,研究发现黄斑视网膜脉络膜血流密度与视网膜厚度呈正相关,且高度近视发病年龄越低可能影响黄斑深层血管复合体的血流密度。

**2.3 在视乳头周围血流检测中的应用** 视乳头是视神经与视网膜相连的部分,主要起到传递视觉信息的作用,视乳头的供血主要来自眼底的视网膜动脉和视网膜静脉<sup>[32]</sup>。高度近视患者视神经乳头会发生一些形态学改变,这是由于在眼轴增长的过程会导致 Bruch 膜开口在视神经乳头处扩大。同时,由于巩膜对后极部视网膜造成的机械性牵拉,极易导致视乳头的脉络膜发生出血的情况<sup>[33]</sup>。Liu 等<sup>[34]</sup>发现高度近视中约有 3.6% 的患者存在视乳头周围的脉络膜内空洞,且高发于近视黄斑病变程度较高的患眼。熊翩翩等<sup>[35]</sup>对 76 只高度近视行 OCTA 检查以及彩色眼底照相检查,发现视盘区放射状视盘周围毛细血管层血管密度与高度近视豹纹状眼底加深程度密切相关。李惠等<sup>[36]</sup>研究显示,高度近视的视盘内血管密度均低于正常眼、低度近视、中度近视,视盘鼻侧象限中血管密度均低于正常眼、低度近视、中度近视。视盘周围血管密度与视网膜神经纤维层厚度分别在 4 个象限均呈正相关,其与眼轴呈负相关,提示高度近视患者视盘周围血管密度随近视眼轴增加而降低,视盘内血管密度随近视眼轴增加而增加,以鼻侧象限下降更为明显。

## 3 小结与展望

高度近视是近视程度中发展最重的一种类型,其机制较为复杂,导致眼脉络膜血流、黄斑区血流、视神经乳头血流等发生一系列改变。因此,观察眼脉络膜血流、黄斑区血流、视网膜神经纤维层、视神经乳头血流情况及其变化,可以间接了解高度

近视的病理情况。OCTA 技术凭借高清晰度的眼底断层图像、血流图像及多种检查功能的优势,被广泛应用于眼科及其他各个医学领域。其通过信号振幅去相关等特殊的计算方法,产生静止性与活动性结构的对比,从中获得血流信号,据此进行血管结构的三维重建,准确清晰地显示视网膜的各层结构及不同层次的血管。高度近视成人的脉络膜血管和绒毛膜毛细血管血流灌注较低,这些变化与近视的严重程度和脉络膜变薄有关,表明近视患者的脉络膜血流易受到近视干扰。高度近视的脉络膜非常薄,且随着年龄和近视程度的增加而进一步变薄,脉络膜的异常可能在近视退行性变的发病机制中发挥作用。高度近视的视网膜毛细血管微血管密度比中度近视眼更低,高度近视黄斑区的绒毛膜毛细血管较中度近视显示出更大的损伤。高度近视黄斑中心凹处表层微血管密度与眼轴呈负相关,黄斑中心凹处深层及表层微血管密度均与眼轴呈正相关。高度近视使眼轴增长,视网膜变薄,视神经纤维层厚度也会随之变薄,同时高度近视中心凹外区上方神经纤维层厚度与屈光度呈负相关。视盘区放射状视盘周围毛细血管层血管密度与高度近视豹纹状眼底加深程度密切相关。但由于目前不同算法类型 OCTA 技术对高度近视视网膜血流分期尚未统一标准,相信未来通过更多大样本、高质量的研究,可为 OCTA 技术在高度近视早期识别、动态评估、疗效评价等方面提供可靠依据。

## 参考文献

- [1] GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: An analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. Lancet Glob Health, 2021, 9 (2) : e130-e143. DOI: 10. 1016/S2214-109X(20)30425-3.
- [2] 慕璟玉,王雁,杨依宁,等.近视的流行病学、病因学与发病机制研究现状[J].眼科新进展,2021,41(11):1089-1096. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2021.0229.
- [3] 邓国涛,刘祥开,钟伟友,等.不同类型视疲劳与眼动参数的相关分析[J].贵州医药,2021,45(6):901-902. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-744X. 2021. 06. 026.
- [4] Yao H, Xin D, Li Z. The deep vascular plexus density is closely related to myopic severity [J]. Ophthalmic Res, 2022, 65 (4) : 455-465. DOI: 10. 1159/000523938.
- [5] Li S, Li F, Sun J, et al. Microvasculature and microstructure alteration in dry-type high myopia [J]. J Biophotonics, 2023, 16 (9) : e202200390. DOI: 10. 1002/jbio. 202200390.
- [6] Chen Y, Rong H, Liu Y, et al. Analysis of the relationship between axial length, optic disc morphology, and regional variations in retinal vessel density in young adults with healthy eyes [J]. Front Med (Lausanne), 2024, 10:1280048. DOI: 10. 3389/fmed. 2023. 1280048.
- [7] Tang W, Luo Y, Duan X. Distribution of the retinal microcirculation based on the morphology of the optic nerve head in high myopia [J]. Semin Ophthalmol, 2023, 38 (6) : 584-591. DOI: 10. 1080/08820538. 2023. 2169581.
- [8] Zhang Z, Mu J, Wei J, et al. Correlation between refractive errors and ocular biometric parameters in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis [J]. BMC Ophthalmol, 2023, 23 (1) : 472. DOI: 10. 1186/s12886-023-03222-7.
- [9] Benavente-Perez A. Evidence of vascular involvement in myopia: A review [J]. Front Med (Lausanne), 2023, 10: 1112996. DOI: 10. 3389/fmed. 2023. 1112996.
- [10] 王雪,底煜,王月.光学相干断层扫描血管成像(OCTA)在小儿眼病中的应用进展[J].中国斜视与小儿眼科杂志,2020,28(2):43-46. DOI: 10. 3969/j. ISSN. 1005-328X. 2020. 02. 016.
- [11] Yang D, Tang Z, Ran A, et al. Assessment of parafoveal diabetic macular ischemia on optical coherence tomography angiography images to predict diabetic retinal disease progression and visual acuity deterioration [J]. JAMA Ophthalmol, 2023, 141 (7) : 641-649. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2023. 1821.
- [12] Xu B, Chen J, Zhang S, et al. Association between the severity of diabetic retinopathy and optical coherence tomography angiography metrics [J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 777552. DOI: 10. 3389/fendo. 2021. 777552.
- [13] Schiavon S, Reibaldi M, Lupidi M, et al. Real-world outcomes of anti-VEGF therapy in treatment-naïve neovascular age-related macular degeneration diagnosed on OCT angiography: The REVEAL study [J]. Acta Ophthalmologica, 2022, 100 (4) : e936-e942. DOI: 10. 1111/ao. 15005.
- [14] 余慧敏,孙旭芳.光学相干断层扫描血管成像量化指标在眼底疾病中的应用[J].眼科新进展,2021,41(3):276-281. DOI: 10. 13389/j.cnki.rao. 2021. 0058.
- [15] 李小凤,高健,廖荣丰.荧光素血管造影与光学相干断层扫描血管成像对比研究糖尿病视网膜病变[J].安徽医科大学学报,2020,55(8):1290-1294. DOI: 10. 19405/j. cnki. issn1000-1492. 2020. 08. 028.
- [16] Liu Y, Wang L, Xu Y, et al. The influence of the choroid on the onset and development of myopia: From perspectives of choroidal thickness and blood flow [J]. Acta Ophthalmol, 2021, 99 (7) : 730-738. DOI: 10. 1111/ao. 14773.
- [17] 何洁琼,王艳华.青少年近视对外层视网膜厚度和脉络膜厚度影响及相关性研究[J].临床眼科杂志,2023,31(2):105-111. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-8422. 2023. 02. 003.
- [18] 李疏凤,李雪,黄莹莹,等.儿童近视进展与眼底血流及脉络膜厚度的关系[J].中华眼视光学与视觉科学杂志,2021,23(10):7. DOI: 10. 3760/cma.j. cn115909-20210413-00153.
- [19] 徐静,宋泽娟,马强,等.成年近视人群黄斑中心凹视网膜厚度、脉络膜厚度与眼轴长度、等效球镜的相关性[J].海南医学,2022,33(5):594-597. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-6350. 2022. 05. 014.
- [20] Jonas JB, Wang YX, Dong L, et al. Advances in myopia research anatomical findings in highly myopic eyes [J]. Eye and Vision, 2020, 7 (1) :45. DOI: 10. 1186/s40662-020-00210-6.
- [21] Da Silva FBB, Silva LCP, Cunha LP, et al. Relationship between automated choroidal thickness measurements and retinal sensitivity using microperimetry in patients with myopia and different stages of myopic maculopathy [J]. Int J Retina Vitreous, 2024, 10 (1) : 26. DOI: 10. 1186/s40942-024-00541-9.
- [22] 廖燕红,龚雁,陈利双,等.不同轴长高度近视黄斑区微血管的光

- 学相干断层扫描血管成像观察 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(11):1377-1379. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2020.11.036.
- [23] 张丹凤, 蔡劲锋, 王平, 等. 基于 OCTA 的青少年近视患者黄斑区视网膜脉络膜血管特点观察 [J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 2020, 28(3): 1-4. DOI: 10.3969/j. ISSN. 1005-328X. 2020.03.001.
- [24] 刘帆, 李宁, 唐丽成, 等. 不同程度近视脉络膜、视网膜黄斑区微循环和视敏度观察及其相关性研究 [J]. 中华眼底病杂志, 2020, 36(12): 929-935. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20201119-00566.
- [25] 王继文, 邓锐东, 陈子林. OCTA 检测青少年不同程度近视患者视网膜神经纤维层厚度和视乳头周围脉络膜毛细血管的微观结构改变 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(3): 321-325. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2024.03.025.
- [26] Cheng F, Tian D. Correlation in retinal thickness and macular retina plus choroidal microcirculation in pediatric myopia [J]. Medicine (Baltimore), 2024, 103(30): e38915. DOI: 10.1097/MD.00000000000038915.
- [27] 冯立森, 杨叶, 胡亮, 等. 应用光学相干断层扫描血管成像技术分析近视眼黄斑区微血管变化 [J]. 温州医科大学学报, 2017, 47(6): 391-396. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9400.2017.06.001.
- [28] 田春柳, 赵军, 张娟美, 等. 基于 OCTA 的高度近视患眼黄斑区视网膜血管密度分析 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(3): 257-260. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2020.0060.
- [29] Ucak T, Icel E, Yilmaz H, et al. Alterations in optical coherence tomography angiography findings in patients with high myopia [J]. Eye,
- [30] Liu M, Wang P, Hu X, et al. Myopia-related stepwise and quadrant retinal microvascular alteration and its correlation with axial length [J]. Eye, 2021, 35(8): 2196-2205. DOI: 10.1038/s41433-020-01225-y.
- [31] 曾桂香. 基于 OCTA 研究年轻的非病理性高度近视眼黄斑区视网膜厚度及血流灌注的特点 [D]. 南昌:南昌大学医学部, 2021.
- [32] Tomita R, Iwase T, Ueno Y, et al. Differences in blood flow between superior and inferior retinal hemispheres [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(5): 27. DOI: 10.1167/iov.61.5.27.
- [33] Sung MS, Heo H, Piao H, et al. Parapapillary atrophy and changes in the optic nerve head and posterior pole in high myopia [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 4607. DOI: 10.1038/s41598-020-61485-2.
- [34] Liu R, Li Z, Xiao O, et al. Characteristics of peripapillary intrachoroidal cavitation in highly myopic eyes: The Zhongshan Ophthalmic Center-Brien Holden Vision Institute High Myopia Cohort Study [J]. Retina (Philadelphia, Pa.), 2021, 41(5): 1057-1062. DOI: 10.1097/IAE.0000000000002963.
- [35] 熊翩翩, 王佳琳, 孙姣, 等. 高度近视豹纹状眼底视网膜脉络膜血流改变及相关性分析 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(2): 114-121. DOI: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.421.
- [36] 李惠, 孙功勋, 张雷, 等. 光学相干断层扫描血管成像技术对中青年近视患者视盘区血管密度的观察 [J]. 皖南医学院学报, 2021, 40(5): 451-454. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0217.2021.05.012.

(收稿日期:2024-06-19)

(上接 1276 页)

- [21] 陈羽, 吴礼浩, 何兴祥. 中国序贯疗法与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(32): 3365-3369. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2009.32.018.
- [22] 纪眉. 10 天序贯疗法与传统三联疗法根除 Hp 的疗效 [J]. 中国医学工程, 2013(10): 2. DOI: CNKI:SUN:YCGC.0.2013-10-049.
- [23] 张楠. 首次 Hp 根治失败者应用序贯疗法的临床疗效评估 [J]. 中国校医, 2019, 33(8): 3. DOI: CNKI:SUN:XIYI.0.2019-08-027.
- [24] 徐春波. 三种疗法在幽门螺杆菌阳性患者中的应用效果比较 [J]. 中国当代医药, 2022, 29(24): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2022.24.006.
- [25] 吕国增. 不含铋剂四联疗法根除幽门螺杆菌效果观察 [J]. 中国乡村医药, 2014(16): 17-18.
- [26] 刘芳勋, 张晶, 张华, 等. 铋剂在幽门螺杆菌根除中的不良反应及预防 [J]. 临床药物治疗杂志, 2014, 12(5): 59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3384.2014.05.013.
- [27] 中华医学会儿科学分会消化学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童幽门螺杆菌感染诊治专家共识 [J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(7): 496-498. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2015.07.006.
- [28] Malfertheiner P, Megraud F, OMorain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report [J]. Gut: Journal of the British Society of Gastroenterology, 2017, 66(1): 6-30. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
- [29] Dore MP, Lu H, Graham DY, et al. Role of bismuth in improving Helicobacter pylori eradication with triple therapy [J]. Gut: Journal of the British Society of Gastroenterology, 2016, 65(5): 870-878. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-311019.
- [30] 左晓春. 莫西沙星序贯疗法与镶嵌疗法根除幽门螺旋杆菌临床有效性的比较研究 [J]. 现代医学, 2017, 45(4): 504-507. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2017.04.010.
- [31] Gao CP, Zhang D, Zhang T, et al. PPI-amoxicillin dual therapy for Helicobacter pylori infection: An update based on a systematic review and meta-analysis [J]. Helicobacter, 2020, 25(4): e12692. DOI: 10.1111/hel.12692.
- [32] 何小建, 王雯, 张志坚, 等. 混合疗法与含铋剂四联疗法根除幽门螺杆菌感染的疗效观察 [J]. 胃肠病学, 2017, 22(3): 168-171. DOI: 10.3969/j.issn.1008-7125.2017.03.009.
- [33] 吴坚芳, 徐进康, 徐宏伟, 等. 疏肝理气活血法联合三联疗法根除消化性溃疡患者 Hp 感染的观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(6): 1.
- [34] 陈晖, 陆喜荣. 疏肝理气活血法联合三联疗法根除慢性胃炎患者 Hp 感染疗效观察 [J]. 光明中医, 2012, 27(5): 2. DOI: 10.3969/j.issn.1003-8914.2012.05.050.
- [35] 王皓云. 健脾清化法联合标准三联根除 Hp 临床疗效观察 [D]. 南京:南京中医药大学, 2012.
- [36] 司明文. 木白散加减联合三联方案治疗消化性溃疡伴 Hp 感染的根治效果及对胃黏膜形态学的影响 [J]. 四川中医, 2016, 34(12): 83-85.

(收稿日期:2024-03-28)