

# 高龄产妇孕中期血清 FPG, HbA1c 及 TC 联合检测 预测 GDM 风险的临床研究

陈丽华<sup>a</sup>, 王思思<sup>b</sup>, 朱婕曼<sup>a</sup>, 鲍娜<sup>a</sup>, 石克威<sup>b</sup>, 张洪艳<sup>c</sup>, 姬宏宇<sup>b</sup>, 赵晓霞<sup>b</sup>

(河北北方学院附属第一医院 a. 生殖医学科; b. 妇产科; c. 临床心理专科, 河北 张家口 075000)

**摘要:** **目的** 研究孕中期空腹血糖 (FPG) 用于预测高龄产妇发生妊娠糖尿病 (GDM) 风险的应用价值。**方法** 纳入河北北方学院附属第一医院 2017 年 5 月~2019 年 5 月 46 例高龄产妇 GDM 患者作为观察组, 另纳入同期 46 例健康正常高龄孕妇作为对照组。比较两组患者孕早期和孕中期 FPG、三酰甘油 (TG)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 及总胆固醇 (TC) 水平。采用 Logistic 多因素分析法分析 GDM 的独立影响因素。记录单一指标与联合检测在预测 GDM 风险中的价值。**结果** 观察组患者 HbA1c, 孕中期与孕早期 FPG, TG 及 TC 水平均高于对照组孕妇, 差异均有统计学意义 ( $t=3.038\sim9.378$ , 均  $P<0.05$ )。Logistic 多因素分析结果显示孕中期 FPG, HbA1c 及 TC 与高龄孕妇发生 GDM 相关 ( $P<0.05$ )。受试者工作曲线 (ROC) 分析显示 HbA1c (AUC=0.725, 95%CI=0.623~0.827,  $P=0.000$ ), FPG (AUC=0.623, 95%CI=0.508~0.738,  $P=0.042$ ) 及 TC (AUC=0.716, 95%CI=0.613~0.819,  $P=0.000$ ) 对预测 GDM 具有一定应用价值。HbA1c, FPG 及 TC 联合预测 GDM 准确性高 (AUC=0.870, 95%CI=0.790~0.949,  $P=0.000$ )。**结论** 孕中期 FPG 监测辅助 HbA1c 与 TC, 有助于预测 GDM 风险, 指导临床, 可为临床干预提供依据。

**关键词:** 糖化血红蛋白; 空腹血糖; 胆固醇; 妊娠糖尿病

中图分类号: R714.256; R446.112 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-033-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.009

## Clinical Study on Prediction of GDM Risk by Combined Detection of Serum FPG, HbA1c and TC in the Second Trimester of Pregnancy in Elderly Women

CHEN Li-hua<sup>a</sup>, WANG Si-si<sup>b</sup>, ZHU Jie-man<sup>a</sup>, BAO Na<sup>a</sup>, SHI Ke-wei<sup>b</sup>, ZHANG Hong-yan<sup>c</sup>, JI Hong-yu<sup>b</sup>, ZHAO Xiao-xia<sup>b</sup>

(a. Department of Reproductive Medicine; b. Department of Obstetrics and Gynecology; c. Department of Clinical Psychology Specialty, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** **Objective** To study the value of fasting plasma glucose (FPG) in the second trimester to forecast the gestational diabetes mellitus (GDM) in elderly parturient. **Methods** From May 2017 to May 2019, 46 elderly women with GDM were included as the observation group, and 46 healthy elderly women as the control group. FPG, TG, HbA1c, LDL-C, HDL-C and TC were compared between the two groups. The independent influencing factors of GDM were analyzed by logistic multi factor analysis. Recorded the value of single indicator and jointed detection in predicting GDM risk. **Results** The levels of HbA1c, FPG, TG and TC in the observation group were significantly higher than those in the control group ( $t=3.038\sim9.378$ , all  $P<0.05$ ). The results of logistic multivariate analysis showed that FPG, HbA1c and TC in the second trimester were correlated with GDM ( $P<0.05$ ). The ROC analysis showed that HbA1c (AUC = 0.725, 95% CI = 0.623~0.827,  $P=0.000$ ), FPG (AUC = 0.623, 95% CI = 0.508~0.738,  $P=0.042$ ) and TC (AUC = 0.716, 95% CI = 0.613~0.819,  $P=0.000$ ) had certain application value to predict GDM. The combined prediction of HbA1c, FPG and TC was of high accuracy (AUC = 0.870, 95% CI = 0.790~0.949,  $P=0.000$ ). **Conclusion** FPG monitoring assisted HbA1c and TC in the second trimester is helpful to predict the risk of GDM, guide the clinical practice and provide basis for clinical intervention.

**Keywords:** glycosylated hemoglobin; fasting blood glucose; cholesterol; gestational diabetes

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是孕期常见代谢性并发症, 是造成巨大儿、新生儿高胆红素血症等不良妊娠结局的重要诱因, 也成为孕期管理的重点<sup>[1]</sup>。近年来报道显

示国内 GDM 发生率超过 5%, 尤其对于高龄孕妇, GDM 风险更高<sup>[2]</sup>。目前临床多采用口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 进行诊断, 但 OGTT 检查操作较为复杂, 且检测周期较长, 可能造成漏诊, 影响其

**基金项目:** 河北省医学科学重点计划项目 (项目编号: 20180836); 张家口市科技计划项目 (项目编号: 1921041D)。

**作者简介:** 陈丽华 (1986-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: chenlihua163@163.com。

准确性<sup>[3]</sup>。目前,糖化血红蛋白(HbA1c)被认为是GDM的诊断标准之一,空腹血糖和胆固醇(TC)也是诊断GDM的参考指标<sup>[4-5]</sup>,既往有报道将孕早期空腹血糖(FPG)用于预测GDM风险,但近年研究显示孕早期空腹血糖可能存在生理性下降现象而影响诊断效能<sup>[6]</sup>。因而,本研究选取孕中期FPG作为监测指标,探讨联合预测GDM的价值。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 临床资料纳入2017年5月~2019年5月46例高龄GDM患者作为观察组,另纳入同期46例健康正常高龄孕妇作为对照组。纳入标准:①GDM诊断标准参照指南<sup>[7]</sup>:(1)2次或2次以上血糖检测示空腹血糖 $\geq 5.8\text{mmol/L}$ ;(2)OGTT结果示2项达到或超过上述标准;(3)50g葡萄糖负荷试验示1h血糖 $\geq 11.1\text{mmol/L}$ ,且空腹血糖 $\geq 5.8\text{mmol/L}$ 。②病历资料完整。③所有患者均知悉本研究内容,并签署知情同意书。排除标准:①既往有糖尿病史者;②肝肾功能严重不全者;③并发有凝血功能异常者;④并发有妊娠期高血压者或异位妊娠者。两组孕妇年龄、孕前体重指数、经产史及流产史等基本情况无显著性差异( $P>0.05$ ),具有可比性。见表1。本研究经医院伦理委员会批准同意进行。

1.2 试剂与仪器 HbA1c检测设备为西门子DCAVantage2000型HbA1c分析仪。全自动血液生化分析仪采用泰安康宇医疗HF-180全自动生化分析仪;试剂盒均由北京九强生物技术股份有限公司提供,操作按试剂盒说明书进行。

1.3 方法 于孕中期采集清晨空腹肘静脉血5ml进行血糖及血脂相关检测,参照文献[8],以高效液相色谱法检测HbA1c。分别在孕8~12周和孕

13~20周时连续3天检测清晨空腹血糖,取平均值,作为孕早期和孕中期FPG值。低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、三酰甘油(TG)及胆固醇(TC)采用全自动血液生化分析仪进行检测。

表1 两组基本资料比较

类别	观察组( <i>n</i> =46)	对照组( <i>n</i> =46)	<i>t</i> / $\chi^2$	<i>P</i>	
年龄(岁)	40.26 ± 5.01	39.87 ± 4.52	0.392	0.696	
孕前体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	20.47 ± 1.85	21.03 ± 2.13	1.346	0.182	
经产史	经产妇	17	13	0.791	0.374
	初产妇	29	33		
流产史(次)	1	14	10	2.531	0.470
	2	8	5		
	3	5	1		
	≥ 4	7	3		

1.4 统计学分析 选用SPSS 20.0统计学软件对数据进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间行 $t$ 检验,计数资料以百分比表示,组间行 $\chi^2$ 检验,预测价值采用受试者工作曲线(ROC)分析,结果以曲线下面积(AUC) $>0.75$ 为诊断价值较高, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组实验室指标比较 见表2。两组LDL-C与HDL-C水平无显著性差异( $P>0.05$ )。观察组患者HbA1c,孕早期与孕中期FPG,TG及TC水平均高于对照组孕妇,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.2 高龄孕妇发生GDM多因素分析 见表3。分析有统计学意义的指标,包括HbA1c,TG,孕早期FPG,孕中期FPG及TC,以实际检验量纳入Logistic多因素分析模型,结果显示孕中期FPG,HbA1c及TC与高龄孕妇发生GDM相关( $P<0.05$ )。

表2 两组实验室指标比较( $\bar{x}\pm s$ )

项目	观察组( $n=46$ )	对照组( $n=46$ )	$t$	$P$
HbA1c(%)	5.87 $\pm$ 1.29	5.04 $\pm$ 1.33	3.038	0.003
LDL-C(mmL)	1.89 $\pm$ 0.51	2.03 $\pm$ 0.48	1.356	0.179
HDL-C(mmL)	1.91 $\pm$ 0.32	1.86 $\pm$ 0.29	0.785	0.434
TG(mmL)	3.01 $\pm$ 0.75	2.28 $\pm$ 0.91	4.199	0.000
孕早期FPG(mmL)	4.75 $\pm$ 0.59	4.29 $\pm$ 0.61	3.676	0.000
孕中期FPG(mmL)	5.37 $\pm$ 0.65	4.73 $\pm$ 0.82	4.148	0.000
TC(mol/L)	3.80 $\pm$ 0.95	2.16 $\pm$ 0.71	9.379	0.000

表3 高龄孕妇发生GDM多因素分析

指标	$\beta$	S.E.	Wald $\chi^2$	OR	$P$	95%CI
HbA1c	0.521	0.250	4.335	1.684	0.037	1.031~2.751
TG	0.813	0.437	3.458	2.254	0.063	0.957~5.309
孕早期FPG	0.640	0.468	1.871	1.897	0.171	0.758~4.748
孕中期FPG	0.922	0.178	26.909	2.515	0.000	1.775~3.564
TC	0.560	0.167	11.257	1.750	0.001	1.262~2.427

2.3 HbA1c, 孕中期 FPG 及 TC 判断 GDM 价值分析 以 HbA1c, FPG 及 TC 为检验变量, 以是否为 GDM 为状态变量, 绘制 ROC 曲线, 见图 1。结果显示 HbA1c, 孕中期 FPG 及 TC 单一检测预测

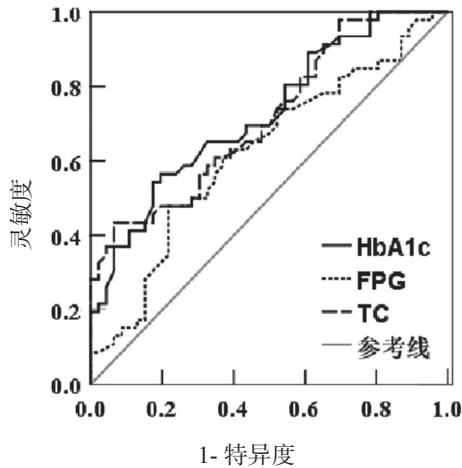


图1 HbA1c, FPG 及 TC 预测 GDM 的 ROC 分析

GDM 具有一定作用 ( $AUC < 0.75$ ), 见表 4。以最佳截断值为界绘制 ROC 曲线, 见图 2, 进行联合预测, 满足任意一项即可确诊, 结果显示三项联合预测价值较高 ( $AUC = 0.870$ ,  $P < 0.05$ ), 见表 5。

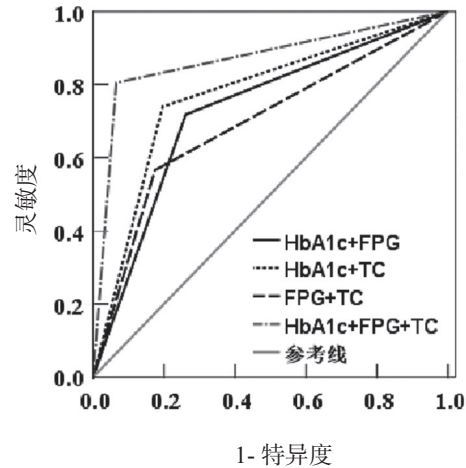


图2 HbA1c, FPG 及 TC 联合预测 GDM 的 ROC 分析

表 4 HbA1c, FPG 及 TC 单项预测 GDM 的 ROC 分析结果

指标	AUC	S.E.	95%CI	P	灵敏度	特异度	最佳截断值
HbA1c	0.725	0.052	0.623~0.827	0.000	0.687	0.739	5.160
FPG	0.623	0.059	0.508~0.738	0.042	0.720	0.609	5.085
TC	0.716	0.053	0.613~0.819	0.000	0.587	0.674	3.155

表 5 HbA1c, FPG 及 TC 联合预测 GDM 的 ROC 分析结果

指标	AUC	S.E.	95%CI	P	灵敏度	特异度
HbA1c+FPG	0.728	0.054	0.623~0.834	0.000	0.717	0.739
HbA1c+TC	0.772	0.051	0.672~0.871	0.000	0.739	0.704
FPG+TC	0.746	0.056	0.586~0.805	0.001	0.765	0.726
HbA1c+FPG+TC	0.870	0.041	0.790~0.949	0.000	0.804	0.835

### 3 讨论

高龄产妇是 GDM 的危险人群, 因高龄产妇既往不良妊娠分娩史和脏器功能下降, GDM 发生率明显升高, 产后并发症和不良妊娠结局风险也相应增加<sup>[9]</sup>。因此, 长期以来, 对 GDM 的防治是高龄孕妇孕期管理重点。HbA1c 由己糖经非酶促作用缩合而成, AULINAS 等<sup>[10]</sup>研究证实 HbA1c 与血糖存在显著量化关系。另外, HbA1c 不受应激反应、药物等因素影响, 稳定性好, 其作为临床筛查 GDM 的重要参考指标也被普遍认可<sup>[11-12]</sup>。本研究显示 HbA1c 是预测 GDM 的独立危险因素, 其 AUC 为 0.725, 提示 HbA1c 预测 GDM 具有一定应用价值, 但 HbA1c 水平受检测方法、患者年龄及红细胞寿命等因素影响, 对于存在溶血性贫血、活动性失血患者, 临床应引起重视, 而对于超过 35 岁的高龄孕妇, 2 型糖尿病机率显著增加<sup>[13]</sup>。因而, HbA1c 对于在 GDM 的评估中存在一定漏诊率。另

外, 有学者提出提高 HbA1c 预测切点有助于提高评估的准确性, 但灵敏度却有所下降。所以, 本研究考虑采用联合平行预测方法, 以期提高对 GDM 的预测价值。

孕期母体为适应胎儿需求, 生理机能发生相应改变, TC 和脂蛋白升高, 部分患者发生代谢紊乱, 这成为导致血管内皮功能损害的重要诱因<sup>[14]</sup>。TC 是脂代谢紊乱临床重要观测指标, 高永妹等<sup>[15]</sup>还发现对于 TC 异常升高 GDM 患者, 伴发子痫风险增加 1.9 倍。夏莉等<sup>[16]</sup>则证明 TC 与患者胰岛素抵抗相关, 且与空腹血糖水平升高具有一致性, 因而, TC 有可能作为诊断 GDM 的补充指标。

空腹血糖是目前筛查 GDM 的指标之一, 但因空腹血糖为瞬时血糖, 且受患者和饮食药物等因素干扰, 其诊断效果具有一定局限性<sup>[17]</sup>。而张东铭等<sup>[18]</sup>的一项报道发现 GDM 患者孕中期与孕晚期空腹血糖无显著性差异, 而健康孕妇空腹血糖在孕中晚期



则逐渐降低。另有分层对比试验研究显示对于孕中期孕妇, FPG 超过 5.6% 时, 其判断 GDM 的准确率达 100%<sup>[19]</sup>。本研究也显示孕中期 FPG 是 GDM 的高危因素, 提示孕中期 FPG 可能参与 GDM 过程, 监测孕中期 FPG 水平有助于指导临床, 控制血糖水平, 进而改善孕妇产后康复效果。

综上, 孕中期 FPG 可作为筛查 GDM 的血清指标, 辅助 HbA1c 与 TC, 提高预测 GDM 的准确度。

#### 参考文献:

- [1] 李精华, 杨柳, 陈庆, 等. 妊娠前体质指数及妊娠期体重增加对妊娠并发症和妊娠结局影响的前瞻性队列研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(3): 184-188.  
LI Jinghua, YANG Liu, CHEN Qing, et al. Prospective cohort study on the influence of body mass index before pregnancy and weight gain during pregnancy on pregnancy complications and pregnancy outcome [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2019, 54(3): 184-188.
- [2] 乔国昱, 何亚萍, 周洁. 妊娠期糖尿病并发甲状腺功能减退孕妇凝血功能指标的变化研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 109-111.  
QIAO Guoyu, HE Yaping, ZHOU Jie. Study on the alteration of blood coagulation function of pregnant women with pothyroidism companied with gestational diabetes mellitus [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 109-111.
- [3] HARDY K, KIM W, KEVIN K, et al. High prevalence and heterogeneity of diabetes in patients with TB in south india: a report from the effects of diabetes on tuberculosis severity (EDOTS) study [J]. Chest, 2016, 149(6): 1501-1508.
- [4] 孙田歌, 杨敏, 黄新梅, 等. 妊娠期糖尿病患者 75g 糖耐量试验血糖水平与大于胎龄儿的相关性研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(2): 120-122.  
SUN Tiange, YANG Min, HUANG Xinmei, et al. Relationship between 75g OGTT glucose levels and large-for-gestational age newborns in women with gestational diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2017, 33(2): 120-122.
- [5] 克迪尔叶·吐鲁洪, 艾克然木·艾合买提, 杜国利. 妊娠期糖尿病孕妇血糖、血脂、糖化血红蛋白水平与新生儿体重的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(21): 4380-4383.  
KEDIERYE·Tuluhong, AIKERANMU·Aihemaiti, DU Guoli. The relationship between blood glucose, blood lipid, glycosylated hemoglobin and newborn weight in pregnant women with gestational diabetes [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2016, 31(21): 4380-4383.
- [6] CICERO A F G, ROSTICCI M, BOVE M, et al. Serum uric acid change and modification of blood pressure and fasting plasma glucose in an overall healthy population sample: data from the Brisighella heart study [J]. Annals of Medicine, 2017, 49(4): 275-282.
- [7] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病临床诊断与治疗推荐指南 (草案) [J]. 中华围产医学杂志, 2007, 10(4): 283-285.  
Obstetrics Group of Obstetrics and Gynecology Branch of Chinese Medical Association, Pregnancy and Diabetes Collaborative group of Perinatal Medicine Branch of Chinese Medical Association. Recommended guidelines for clinical diagnosis and treatment of pregnancy and diabetes (Draft) [J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2007, 10(4): 283-285.
- [8] 闫颖, 张传宝, 张江涛, 等. 三种相同原理的糖化血红蛋白分析仪检测结果的初步比对 [J]. 检验医学, 2012, 27(7): 575-578.  
YAN Ying, ZHANG Chuanbao, ZHANG Jiangtao, et al. Primary comparison of three automatic analyzers with same principle for glycosylated hemoglobin measurement [J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(7): 575-578.
- [9] 韩娜, 刘珏, 金楚瑶, 等. 2013-2017 年北京市通州区 34 637 例孕妇妊娠期糖尿病流行情况及其影响因素研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23(2): 156-161.  
HAN Na, LIU Jue, JIN Chuyao, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus and its related risk factors among 34 637 pregnant women in Tongzhou district of Beijing from 2013 to 2017 [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2019, 23(2): 156-161.
- [10] AULINAS A, COLOM C, GARCÍA PATTERSON A, et al. Smoking affects the oral glucose tolerance test profile and the relationship between glucose and HbA1c in gestational diabetes mellitus [J]. Diabetic Medicine, 2016, 33(9): 1240-1244.
- [11] 刘然. 体质指数与血清 C 反应蛋白和糖化血红蛋白在妊娠期糖尿病诊断中的意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5): 49-52.  
LIU Ran. Diagnostic significance of BMI, serum CRP and HbA1c in gestational diabetes mellitus [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 49-52.
- [12] SWEETING A N, ROSS G P, HYETT J, et al. Baseline HbA1c to identify high-risk gestational diabetes: utility in early versus standard gestational diabetes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2017, 102(1): 150-156.
- [13] BARQUIEL B, HERRANZ L, HILLMAN N, et al. HbA1c and gestational weight gain are factors that influence neonatal outcome in mothers with gestational diabetes [J]. Journal of Women's Health, 2016, 25(6): 579-585.
- [14] 鲁花丽, 于坚伟, 程雪芹. 妊娠期糖尿病不同血糖水平孕妇的临床特点与妊娠结局分析 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(5): 12-15.  
LU Huali, YU Jianwei, CHENG Xueqin. Analysis on clinical characteristic and pregnancy outcome of women with gestational diabetes mellitus on different blood glucose levels [J]. Chinese Journal Of Family Planning & Gynecotokology, 2016, 8(5): 12-15.
- [15] 高永妹. 诱发妊娠期糖尿病孕妇发生子痫前期的风险因素探讨及其对妊娠结局的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(23): 4980-4982.  
GAO Yongmei. Risk factors of preeclampsia in pregnant women with gestational diabetes mellitus and their influence on pregnancy outcome [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2016, 31(23): 4980-4982.
- [16] 夏莉, 胡红琳, 王长江, 等. 妊娠糖尿病患者血脂水

- 平与胰岛素抵抗相关性分析[J]. 安徽医科大学学报, 2017,52(5):749-752.
- XIA Li, HU Honglin, WANG Changjiang, et al. Correlative analysis of blood lipid level and insulin resistance in gestational diabetes mellitus patients[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2017,52(5):749-752.
- [17] 楼公先, 楼时先, 程秒驾, 等. 孕早期 FBG, HbA1c, TC, TG 联合检测在妊娠期糖尿病诊断中的应用价值分析[J]. 中华全科医学, 2019,17(5):809-812
- LOU Gongxian, LOU Shixian, CHENG Shiyuan, et al. Analysis of the application value combined detection of FBG, HbA1c, TC and TG in diagnosis of GDM in early pregnancy[J]. Chinese Journal of General Practice, 2019,17(5): 809-812.
- [18] 张东铭, 何月, 张静, 等. 中孕期空腹血糖水平与妊娠期糖尿病的相关性研究[J]. 系统医学, 2018,3 (16): 1-3,23.
- ZHANG Dongming, HE Yue, ZHANG Jing, et al. Study on correlation between the fasting blood glucose level in the middle pregnancy and gestational diabetes[J]. Systems Medicine, 2018,3 (16): 1-3,23.
- [19] HE Leqi, SHEN Chunmei, ZHANG Yanan, et al. Evaluation of serum ferritin and thyroid function in the second trimester of pregnancy[J]. Endocrine Journal, 2017,65(1):75-82.
- [20] 雷国勤, 徐欢, 黄畅晓, 等. 重庆地区孕妇 HbA1c 及早中孕空腹血糖正常参考区间的建立以及联合诊断妊娠期糖尿病的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2016,39(6):413-417.
- LEI Guoqin, XU Huan, HUANG Changxiao, et al. Reference intervals of HbA1c and fasting plasma glucose for pregnant women in Chongqing and the value of their combination in screening gestational diabetes mellitus[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2016,39 (6):413-417.

收稿日期: 2020-04-22 修回日期: 2020-05-28

### (上接第3页)

#### 10.2 肿瘤细胞

10.2.1 检出可疑恶性间皮瘤细胞, 提示浆膜腔原发性恶性肿瘤, 建议结合免疫组化及其它检查进一步明确。

10.2.2 检出腺癌细胞、鳞状上皮癌细胞、未分化(或低分化)癌细胞、小细胞癌、骨髓瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、恶性黑色素瘤细胞、肉瘤细胞, 提示肿瘤细胞浆膜腔转移, 建议结合免疫组化及组织病理学进一步明确。

10.2.3 检出造血淋巴组织系统原始细胞、淋巴瘤细胞, 则提示白血病细胞、淋巴瘤细胞侵犯浆膜腔, 需结合病史。

#### 10.3 其它有形成分

10.3.1 检出结晶类: 胆固醇结晶提示囊性、包裹性积液; 检出胆红素结晶并发脂肪滴、细菌或真菌、鳞状上皮细胞等, 提示空腔脏器穿孔; 检出橙色血质结晶(血晶), 提示浆膜腔陈旧性出血。

10.3.2 检出细菌及真菌, 提示浆膜腔细菌或真菌感染(需排除污染)。

10.3.3 检出寄生虫, 提示寄生虫感染。

10.3.4 检出花粉或植物细胞, 提示空腔脏器穿孔(需排除污染)。

#### 参考文献:

- [1] 王兰兰, 尚红. 实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- WANG Lanlan, SHANG Hong. Laboratory diagnosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Analysis of body fluids in clinical chemistry. 2nd ed. CLSI guideline C49. [S]. Wayne: PA, CLSI document C49-A, 2019.
- [3] 张纪云, 龚道元. 临床检验基础[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- ZHANG Jiyun, GONG Daoyuan. Fundamentals of clinical laboratory [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.
- [4] 龚道元, 张时民, 黄道连. 临床基础检验形态学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- GONG Daoyuan, ZHANG Shimin, HUANG Daolian. Morphology of basic clinical laboratory[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.
- [5] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- SHANG Hong, WANG Yusan, SHEN Ziyu. National guide to clinical laboratory procedures[S]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 662-2020: 临床体液检验技术要求(2020版)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- National Health Commission of the People's Republic of China. WS/T 662-2020: Technical requirements for clinical body fluids analysis [S]. Beijing: China Standards Press, 2020.
- [7] 彭明婷. 临床血液与体液检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- PENG Mingting. Clinical laboratory hematology and body fluid analysis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017.
- [8] 吴茅. 浆膜积液细胞图谱新解及病例分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- WU Mao. New interpretation of serous effusion cell map and case analysis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
- [9] 王建中, 张时民, 刘贵建. 临床检验诊断学图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- WANG Jianzhong, ZHANG Shimin, LIU Guijian. Atlas of clinical laboratory diagnostics[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012.

收稿日期: 2020-09-02 修回日期: 2020-10-15

# 外周血 NLR 与 PLR 对儿童完全型川崎病 冠状动脉损伤的预测分析

张书婉<sup>1</sup>, 黄君华<sup>2</sup>, 吴文婧<sup>3</sup>, 祝颖英<sup>1</sup>, 杨立<sup>3</sup>, 曹三成<sup>1</sup>

(1. 西安市儿童医院检验科, 西安 710003; 2. 西安医学院医学技术学院, 西安 710021;

3. 西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061)

**摘要:**目的 探讨中性粒细胞与淋巴细胞比值(NLR)和血小板与淋巴细胞比值(PLR)预测完全型川崎病(CKD)患儿冠状动脉损伤(CAL)的价值。方法 回顾性分析2018年1月1日~12月31日在西安市儿童医院和西安交通大学第一附属医院确诊为CKD的185例患儿的临床资料,其中发生CAL者37例,未发生CAL者148例;选取同时期93例上呼吸道感染儿童为发热对照组,60例健康体检儿童为健康对照组。收集所有纳入对象的血细胞检测结果并进行统计学分析。结果 CKD患儿中发生CAL者NLR和PLR均高于未发生CAL者,差异有统计学意义( $\chi^2=3.69, 4.13$ , 均 $P<0.01$ );NLR和PLR预测川崎病CAL的cut-off值分别为4.13和126.82,敏感度和特异度分别为83.8%和76.1%(NLR)及81.1%和67.0%(PLR);NLR与PLR联合预测CAL的敏感度和特异度分别为86.5%和80.7%,ROC曲线下面积0.874。结论 CKD急性期NLR与PLR对预测患儿是否发生CAL具有一定的价值。

**关键词:** 川崎病;冠状动脉损伤;中性粒细胞与淋巴细胞比值;血小板与淋巴细胞比值

中图分类号: R725.5; R446.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-038-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.010

## Prediction Analysis of NLR and PLR for the Development of Coronary Artery Lesions in Patients with Complete Kawasaki Disease

ZHANG Shu-wan<sup>1</sup>, HUANG Jun-hua<sup>2</sup>, WU Wen-jing<sup>3</sup>, ZHU Xie-ying<sup>1</sup>, YANG Li<sup>3</sup>, CAO San-cheng<sup>1</sup>.

(1.Department of Clinical Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China; 2.Department of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 3.Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract: Objective** To explore the prediction value of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) for the development of coronary artery lesions (CAL) in children with complete Kawasaki disease (CKD). **Methods** 185 CKD patients who were hospitalized in Xi'an Children Hospital and the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University from January 1, 2018 to December 31, 2018 were recruited in this study. Of these patients, 37 individuals were with CAL and 148 were not with CAL. In addition, 93 children with upper respiratory tract infection were enrolled as febrile controls and 60 children suffering healthy physical examination were as healthy controls. The blood routine results of all included subjects were collected for statistical analysis. **Results** The NLR and PLR values of CKD children suffering CAL were higher than those of CKD patients non-suffering CAL, the difference were statistically significant ( $\chi^2=3.69, 4.13$ , all  $P<0.01$ ). The cut-off values of NLR and PLR predicting KD-CAL were 4.13 and 126.82, respectively, resulting a 83.8% sensitivity and 76.1% specificity (NLR) and 81.1% sensitivity and 67.0% specificity (PLR). The prediction sensitivity and specificity of NLR combined with PLR were 86.5% and 80.7%, respectively, and the area under the ROC curve(AUC) was 0.874. **Conclusion** NLR combined with PLR has a good effect on predicting the development of CAL in CKD children.

**Keywords:** kawasaki disease; coronary artery lesion; neutrophil-to-lymphocyte ratio; platelet-to-lymphocyte ratio

川崎病(kawasaki disease, KD)是一种以血管炎症为主要特征的急性发热性疾病<sup>[1]</sup>,好发于5岁以下婴幼儿,尤其是东亚地区儿童<sup>[2]</sup>,且发病率有逐年升高趋势<sup>[3]</sup>。由于本病可发生严重的并发症-冠

状动脉损伤(coronary artery lesion, CAL),因此成为人们关注的焦点。未经及时治疗的KD患儿CAL发生率达20%~40%,已成为儿童后天性心脏病的首要原因<sup>[4]</sup>。因此筛查CAL高危患儿对及时调整

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2020JQ-884); 西安市儿童医院院级课题扶持项目(2019C10)。

作者简介: 张书婉(1987-),女,硕士,主管技师,研究方向: 临床免疫学与免疫疾病诊断, E-mail: shuwan0103@163.com。

通讯作者: 曹三成,主任技师,西安市儿童医院检验科主任, E-mail: jianyan2080@163.com。



治疗方案和预防 CAL 至关重要<sup>[5]</sup>。有研究发现中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR) 和血小板与淋巴细胞比值 (platelet-to-lymphocyte ratio, PLR) 与 KD 密切相关<sup>[6]</sup>, 但对二者的研究多集中于预测静脉注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 抵抗, 而其联合预测 KD 冠脉损伤 (KD-CAL) 报道较少。KD 按临床症状可分为完全型川崎病 (complete Kawasaki disease, CKD) 和不完全型川崎病 (incomplete Kawasaki disease, IKD), 二者的实验室检查多有不同<sup>[7]</sup>, 其中 CKD 占川崎病的大多数, 因此为探讨 NLR 和 PLR 预测 KD-CAL 的作用并建立针对本地区 KD 患儿的 cut-off 值, 本研究回顾性分析了 185 例确诊为 CKD 患儿的血细胞检测结果, 通过受试者操作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析 NLR 与 PLR 预测 CAL 的能力。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2018 年 1 月 1 日~12 月 31 日西安市儿童医院和西安交通大学第一附属医院收治的 185 例诊断为 CKD 患儿的相关临床资料, 诊断标准参照美国心脏学会标准<sup>[8]</sup>: 发热 >5 天, 并具有以下 5 项临床表现中至少 4 项, 同时除外其他疾病: ①双侧球结膜充血; ②多形性皮疹; ③非化脓性颈淋巴结肿大; ④口唇充血、皲裂或口腔黏膜弥漫性充血或草莓舌; ⑤急性期掌跖红斑或手足硬性水肿; 恢复期指趾末端膜状脱皮。所有患儿出院后均随访 2~6 个月, 至 2019 年 7 月全部随访结束, 发生 CAL (定义为 KD-CAL 组) 37 例, 未发生 CAL (定义为 KD-nonCAL 组) 148 例。CAL 诊断标准参照文献<sup>[7]</sup>: ①冠状动脉扩张:  $2 \leq Z < 2.5$  或随访过程中 Z 值下降  $\geq 1$ ; ②小型冠状动脉瘤:  $2.5 \leq Z < 5$ ; ③中型冠状动脉瘤:  $Z < 10$  且内径绝对值  $< 8$  mm; ④巨型冠状动脉瘤:  $Z \geq 10$  或内径绝

对值  $\geq 8$  mm。另纳入同时期 93 例上呼吸道感染儿童为发热对照组, 60 例健康体检儿童为健康对照组。排除标准为: ①发热小于 5 天或超过 10 天者; ②并发有其他系统急慢性疾病者; ③临床资料不全者。

**1.2 仪器与试剂** EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管 (美国 BD 公司); 血液常规分析仪 (日本 Sysmex 公司, XS500) 行血细胞检测; 心脏彩超 (德国飞利浦, iE Elite)。

**1.3 方法** 本研究采集了以下临床信息: 一般信息: 性别、年龄、发热时间; 实验室检测结果: 白细胞计数 (流式细胞计数法)、中性粒细胞计数 (流式细胞计数法)、淋巴细胞计数 (流式细胞计数法), 血小板计数 (鞘流 DC 检测法); 初诊及复查时心脏超声检测结果。

**1.4 统计学分析** 正态性检验应用 Kolmogorov-Smirnov(K-S) 检验; 方差齐性检验采用 Levene 检验。数据符合正态和方差齐, 样本特征用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。CKD 组、发热对照组与健康对照组性别分布的比较选择  $\chi^2$  检验, 其他变量的组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验; 分别应用  $\chi^2$  检验和  $t$  检验比较 KD-CAL 组和 KD-nonCAL 组的性别比例和计量变量之间的统计学差异。上述所有分析及 ROC 曲线的绘制均应用 SPSS 22.0 统计软件完成,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同组别血细胞参数比较** 见表 1。CKD 组、发热对照组、健康对照组间性别比例和平均月龄差异均无统计学意义 ( $\chi^2=0.670$ ,  $P=0.190$ )。三组间淋巴细胞计数和血小板计数差异无统计学意义; 而白细胞计数、中性粒细胞计数、NLR 和 PLR 差异有统计学意义, CKD 组均高于发热对照组和健康对照组 ( $P < 0.05$ )。

表 1 CKD 组与对照组间基本情况和血细胞分析指标 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	CKD( $n=185$ )	发热对照组 ( $n=93$ )	健康对照组 ( $n=60$ )	$F/\chi^2$	$P$
年龄 (月)	$35 \pm 18$	$34 \pm 17$	$36 \pm 18$	0.670	0.190
性别 [男 (%)]	115(62.2)	56(60.2)	31(51.7)	146.959	0.744
白细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	$14.82 \pm 7.51^{ab}$	$10.52 \pm 4.32^b$	$7.32 \pm 1.93$	12.320	$<0.001$
中性粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	$10.93 \pm 6.74^{ab}$	$5.42 \pm 3.21^b$	$2.47 \pm 1.22$	17.307	$<0.001$
淋巴细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	$3.29 \pm 1.65$	$4.10 \pm 2.65$	$4.21 \pm 1.53$	2.038	0.113
血小板 ( $\times 10^9/L$ )	$377.21 \pm 167.56$	$325.33 \pm 141.47$	$323.72 \pm 111.39$	1.213	0.309
NLR	$4.68 \pm 3.10^{ab}$	$2.48 \pm 2.41^b$	$0.71 \pm 0.32$	6.139	0.001
PLR	$145.54 \pm 92.47^{ab}$	$97.43 \pm 49.28^b$	$82.58 \pm 35.28$	4.037	0.010

注: <sup>a</sup> 表示与发热对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 表示与健康对照组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.2 KD-CAL 与 KD-nonCAL 血细胞参数比较** 见表 2。两组间性别比例和平均月龄差异均无统计学

意义。除淋巴细胞计数在两组间无统计学差异外,其他血细胞检测指标及 NLR 和 PLR KD-CAL 组高

于 KD-nonCAL 组,差异有统计学意义( $P \leq 0.001$ )。

表2 KD-CAL 组与 KD-nonCAL 组间基本情况和血细胞分析指标( $\bar{x} \pm s$ )

指标	KD-CALs( $n=37$ )	KD-nonCALs( $n=148$ )	$t/\chi^2$	$P$
年龄(月)	28.55 $\pm$ 16.43	36.87 $\pm$ 19.79	1.450	0.156
性别[男(%)]	25(67.6)	90(60.8)	32.760	0.478
白细胞计数( $\times 10^9/L$ )	20.85 $\pm$ 8.43	13.12 $\pm$ 5.19	66.766	<0.001
中性粒细胞计数( $\times 10^9/L$ )	16.72 $\pm$ 7.53	9.47 $\pm$ 5.45	34.407	<0.001
淋巴细胞计数( $\times 10^9/L$ )	3.35 $\pm$ 1.88	3.18 $\pm$ 1.39	0.108	0.924
血小板( $\times 10^9/L$ )	336.54 $\pm$ 131.54	293.82 $\pm$ 187.12	208.714	<0.001
NLR	6.64 $\pm$ 4.61	3.85 $\pm$ 1.61	3.69	0.001
PLR	195.09 $\pm$ 99.68	124.71 $\pm$ 81.19	4.13	<0.001

2.3 NLR 及 PLR 预测川崎病冠脉损伤的 ROC 曲线 KD-CAL 患儿 NLR 和 PLR 高于 KD-nonCAL 组,通过构建 ROC 曲线对后期是否会发生 CAL 进行预测。应用 SPSS 软件绘制 ROC 曲线后发现, NLR 曲线下面积(AUC)为 0.811, NLR 在 4.13 时尤登指数最大(为 0.599),此时 NLR 预测 CAL 的灵敏度为 83.8%,特异度为 76.1%。PLR 的 AUC 为 0.773, PLR 在 126.82 时尤登指数最大(为 0.481),此时 PLR 预测 CAL 的灵敏度为 81.1%,特异度为 67.0%。二者联合后 AUC 为 0.874,预测 CAL 的灵敏度和特异度分别为 86.5% 和 80.7%。

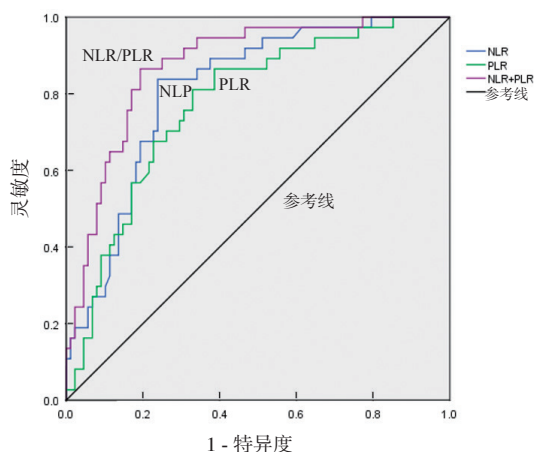


图1 NLR 和 PLR 及二者联合预测 KD-CAL 的 ROC 曲线

### 3 讨论

CAL 是川崎病最严重的并发症之一,预防 CAL 的发生一直是 KD 研究中的重要领域。在临床实践中,发热十天内及时应用 IVIG 可极大地降低 CAL 的发生率<sup>[9]</sup>,然而部分患儿对 IVIG 治疗抵抗,这部分儿童发生 CAL 的概率较治疗敏感者更高<sup>[10]</sup>,因此目前国内外多是通过建立 IVIG 治疗抵抗预测体系来间接预测 CAL。但 IVIG 抵抗仅仅是众多预测 CAL 的危险因素之一<sup>[11]</sup>,通过预测 IVIG

抵抗来筛查 CAL 高危患儿会存在偏差。另外,由于遗传背景等因素的不同导致同一指标或预测模型在不同人群中的效果有很大不同<sup>[12]</sup>,所以不同地区需建立适合本地区的预测 KD-CAL 的 cut-off 值或体系。作为炎性指标, NLR 和 PLR 被用于自身免疫病、炎症性疾病、心血管疾病等的诊断和预后判断中并取得良好效果<sup>[13-15]</sup>。对于川崎病,目前国内外研究主要集中在 NLR 和 PLR 预测 IVIG 抵抗方面,而与 CAL 的关系研究甚少。本研究纳入来自两所大型三级甲等医院的 CKD 患儿为研究对象,通过 ROC 曲线分析探索 NLR 和 PLR 在预测 KD-CAL 中的价值,有助于进一步认识这两种指标在川崎病中的作用。

NLR 和 PLR 升高表明机体处于炎症状态<sup>[16]</sup>,本研究发现治疗前 CKD 组 NLR 和 PLR 高于发热对照组和健康对照组,且发生 CAL 组高于未发生 CAL 组,说明 KD 急性期处于严重的炎症过程,炎症越严重越容易发生 CAL。袁迎第等<sup>[17]</sup>应用单一指标 NLR 预测 KD 冠状动脉扩张,发现 NLR 最佳预测截点为 4.51,曲线下面积为 0.82,敏感度和特异度分别为 78% 和 80%;本研究发现以 4.13 为 cut-off 值, NLR 预测冠脉损伤敏感度(83.8%)高于该研究而特异度(76.1%)略低,然而联合 PLR 后特异度可提高到 80.7%,与该研究接近;并且联合后的敏感度(86.5%)和 AUC(0.874)均高于该研究,说明二者联合应用预测 CAL 优于单一指标。

在预测川崎病 IVIG 抵抗方面, NLR 和 PLR 在不同的研究中也表现为不同的预测效能。陈利涛<sup>[18]</sup>研究认为治疗前 NLR 和 PLR 预测川崎病患儿 IVIG 抵抗的最佳临界值分别为 5.46 和 147.87, AUC 为 0.87 和 0.84;而一项来自日本的回顾性研究<sup>[6]</sup>发现 NLR  $\geq 3.83$  和 PLR  $\geq 150$  时对 IVIG 抵抗的预测效果最佳,二者联合后预测 IVIG 抵抗的敏感度和



特异度分别是 0.72 和 0.67, 可见研究人群的差异可导致 NLR 和 PLR 的预测截断值相差较大。另外, 值得注意的是, 袁迎第研究组一项关于 NLR 和 PLR 预测川崎病 IVIG 抵抗的研究发现, NLR 最佳截断值为 4.36, 其预测敏感度和特异度分别为 85% 和 63%, 曲线下面积为 0.78<sup>[19]</sup>, 这与上述的该研究组关于 NLR 在预测 KD 冠状动脉损伤时的效能不同<sup>[17]</sup>, 可见同一指标在预测冠脉损伤和 IVIG 抵抗时具有不同的 cut-off 值。综合以上结果可见不同研究的 cut-off 值存在差别, 这可能与纳入人群的人口学分布 (如年龄) 有关, 如 CHEN 等<sup>[20]</sup>将 NLR 应用于预测 1 岁以下川崎病婴幼儿 IVIG 抵抗时发现 NLR  $\geq 2.51$  时预测效果最佳, 该值与上述研究结果差异较大, 说明年龄可能是影响 cut-off 值的因素之一, 也提示我们应用该指标预测 CAL 时需根据年龄分层建立 cut-off 值可能更为合理。这种差别也可能与人种和地区、检测方法、样本量、样本纳入时间有关系, 还有可能是 NLR 和 PLR 在预测 IVIG 抵抗和预测 CAL 时客观上存在不同的截断值。

川崎病分为 CKD 和 IKD, 两种型别的临床特点不同<sup>[7]</sup>, CKD 的临床表现较 IKD 更为严重且发生 CAL 和 IVIG 抵抗的概率更高<sup>[21]</sup>。本研究以症状更为典型、更易确诊的 CKD 患儿为研究对象, 排除了临床不易诊断且可能与其他疾病混淆的 IKD, 可以更好地便于我们认识 NLR 和 PLR 这两个指标在预测 KD-CAL 中的作用。

考虑到 NLR 和 PLR 在预测冠脉损伤时独具优势 (如检测成本低, 简单快速等) 并结合本实验结果, 我们认为这两项指标非常适合预测川崎病冠脉损伤, 但不同地区需建立适合本地区的 cut-off 值。另外, 无论是预测 IVIG 抵抗还是预测 CAL, 单一指标和二指标联合时均有较好的灵敏度, 但特异度不高, 提示 NLR 和 PLR 的筛检能力高于确诊能力, 当患儿检查结果高于截断值时临床医师应给予更多的关注以便于及时调整治疗方案。

综上所述, CKD 患儿 NLR 和 PLR 升高且发生 CAL 者升高更明显; NLR > 4.13, PLR > 126.82 时对 CAL 的发生具有较好的预测作用; 二者联合预测 CAL 的灵敏度和特异度分别为 86.5% 和 80.7%。

#### 参考文献:

- [1] LO M S. A framework for understanding Kawasaki disease pathogenesis [J]. Clin Immunol, 2020, 214: 108385.
- [2] KAINTH R, SHAH P. Kawasaki disease: origins and evolution[J]. Arch Dis Child, 2019. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2019-317070>.
- [3] XIE Liping, YAN Weili, HUANG Min, et al. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Shanghai from 2013 through 2017 [J]. Journal of Epidemiology, 2020, 30(10): 429-435.
- [4] ELAKABAWI K, LIN Jing, JIAO Fuyong, et al. Kawasaki disease: global burden and genetic background [J]. Cardiology Research, 2020, 11(1): 9-14.
- [5] CHEN Shaojie, DONG Ying, KIUCHI M G, et al. Coronary artery complication in Kawasaki disease and the importance of early intervention a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Pediatrics, 2016, 170(12): 1156-1163.
- [6] KAWAMURA Y, TAKESHITA S, KANAI T, et al. The combined usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in predicting intravenous immunoglobulin resistance with Kawasaki Disease[J]. J Pediatr, 2016, 178: 281-284, e1.
- [7] BEHMADI M, ALIZADEH B, MALEK A. Comparison of clinical symptoms and cardiac lesions in children with typical and atypical Kawasaki Disease[J]. Medical Sciences (Basel, Switzerland), 2019, 7(4): 63.
- [8] MCCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al. Diagnosis, treatment, and Long-Term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American heart association[J]. Circulation, 2017, 135(17): e927-e999.
- [9] NOVAL RIVAS MN, ARDITI M. Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models[J]. Nature Reviews Rheumatology, 2020, 16(Suppl1):391-405.
- [10] MOUSSA T, WAGNER-WEINER L. Kawasaki disease: beyond IVIG and aspirin[J]. Pediatric Annals, 2019, 48(10): e400-e405.
- [11] SON MARY B F, GAUVREAU K, TREMOULET A H, et al. Risk model development and validation for prediction of coronary artery aneurysms in Kawasaki Disease in a North American population[J]. Journal of the American Heart Association, 2019, 8(11):e011319.
- [12] QIAN Weiguo, TANG Yunjia, YAN Wenhua, et al. A comparison of efficacy of six prediction models for intravenous immunoglobulin resistance in Kawasaki disease[J]. Italian Journal of Pediatrics, 2018, 44(1): 33.
- [13] CAN E, CAN C. The value of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) parameters in analysis with fetal malnutrition neonates[J]. Journal of Perinatal Medicine, 2019, 47(7): 775-779.
- [14] QIN Baodong, MA Ning, TANG Qingqin, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) were useful markers in assessment of inflammatory response and disease activity in SLE patients[J]. Modern Rheumatology, 2016, 26(3): 372-376.
- [15] KAPLAN M, ATES I, OZTAS E, et al. A new marker to determine prognosis of acute pancreatitis: PLR and NLR combination[J]. Journal of Medical Biochemistry, 2018, 37(1): 21-30.

## LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织中的表达及其对细胞增殖和迁移的影响

赵芳芳, 郭红, 陈嘉 (汉中市人民医院内分泌科, 陕西汉中 723000)

**摘要:**目的 检测 LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织及细胞中的表达, 探究其对细胞增殖和迁移的影响。方法 收集 2015 年 1 月~2018 年 6 月在汉中市人民医院行手术治疗并经病理确诊的 36 例甲状腺癌患者癌组织标本及其相对应的正常癌旁甲状腺组织进行研究。采用 qRT-PCR 法检测甲状腺癌组织及 SW1736, FTC-133 细胞株中 LncRNA TUG1 表达水平。将 shRNA 插入慢病毒质粒中构建 LncRNA TUG1 低表达质粒 (LV-shTUG1)。采用 MTT 法、集落形成实验及 Transwell 实验检测敲降 LncRNA TUG1 表达对甲状腺癌细胞增殖和迁移的影响; 采用蛋白印迹分析实验检测 LncRNA TUG1 对 EMT 相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 表达的影响。**结果** 与正常癌旁甲状腺组织相比, 甲状腺癌组织中 LncRNA TUG1 高表达, 差异有统计学意义 ( $6.90 \pm 1.19$  vs  $1.51 \pm 1.02$ ,  $t=20.634$ ,  $P < 0.000$ )。与 Nthy-ori 3-1 细胞相比, FTC-133 细胞 ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $4.61 \pm 0.15$ ) 和 SW1736 细胞 ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $2.59 \pm 0.23$ ) 中 LncRNA TUG1 水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $t=35.744$ ,  $P < 0.000$ ;  $t=11.150$ ,  $P < 0.000$ )。敲降 LncRNA TUG1 表达后, SW1736 细胞 ( $1.31 \pm 0.19$  vs  $0.89 \pm 0.16$ ) 和 FTC-133 细胞 ( $2.17 \pm 0.09$  vs  $1.68 \pm 0.05$ ) 增殖能力较对照组明显降低, 克隆形成数目明显减少, 差异有统计学意义 ( $t=2.929$ ,  $P=0.021$ ;  $t=8.243$ ,  $P=0.001$ )。敲降 LncRNA TUG1 表达后, FTC-133 细胞迁移能力 ( $1\ 675.2 \pm 64.2$  vs  $898.1 \pm 156.4$ ) 较对照组显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=7.961$ ,  $P=0.001$ )。敲降 LncRNA TUG1 表达后, 与对照组相比, E-cadherin 表达量 ( $0.74 \pm 0.06$  vs  $1.66 \pm 0.17$ ) 显著升高, N-cadherin 表达量 ( $1.27 \pm 0.18$  vs  $0.39 \pm 0.07$ ) 显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=8.839$ ,  $P < 0.000$ ;  $t=7.892$ ,  $P=0.001$ )。**结论** LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织及细胞中高表达, 促进甲状腺癌细胞增殖和迁移, 可能通过促进 EMT 的形成进而促进甲状腺癌细胞的生物学行为。

**关键词:** LncRNA TUG1; 甲状腺癌; 生物学行为

中图分类号: R736.1; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-042-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.011

## Expression of LncRNA TUG1 in Thyroid Carcinoma Tissues and Its Effect on Cell Proliferation and Migration

ZHAO Fang-fang, GUO Hong, CHEN Jia

(Department of Endocrinology, the People's Hospital of Hanzhong City, Shaanxi Hanzhong 723000, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression of LncRNA TUG1 in thyroid carcinoma tissues and cells, and explore its effect on cell proliferation and migration. **Methods** From January 2015 to June 2018, 36 patients with thyroid cancer who underwent surgical treatment and were confirmed by pathology in Hanzhong People's Hospital were collected, and their corresponding normal para-cancer thyroid tissues were collected for study. The expression levels of LncRNA TUG1 in thyroid carcinoma tissues and SW1736 and FTC-133 cell lines were detected by qRT-PCR. LncRNA TUG1 low expression plasmid (LV-ShTUG1) was constructed by inserting shRNA into lentivirus plasmid. MTT assay, colony formation assay and Transwell assay were used to detect the effects of knocked down LncRNA TUG1 expression on proliferation and migration of thyroid cancer cells. The effect of LncRNA TUG1 on the expression of EMT-related proteins E-cadherin and N-cadherin was detected by western blot analysis. **Results** The expression of LncRNA TUG1 in thyroid carcinoma tissues was significantly higher than that in normal para-carcinoma thyroid tissues ( $6.90 \pm 1.19$  vs  $1.51 \pm 1.02$ ,  $t=20.634$ ,  $P < 0.000$ ). LncRNA TUG1 levels in FTC-133 cells ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $4.61 \pm 0.15$ ) and SW1736 cells ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $2.59 \pm 0.23$ ) were significantly increased compared with Thy-ORI cells ( $t=35.744$ ,  $P < 0.000$ ;  $t=11.150$ ,  $P < 0.000$ ). After LncRNA TUG1 expression was knocked down, the proliferation ability of SW1736 cells ( $1.31 \pm 0.19$  vs  $0.89 \pm 0.16$ ) and FTC-133 cells ( $2.17 \pm 0.09$  vs  $1.68 \pm 0.05$ ) was significantly reduced compared with the control group, and the number of clones was significantly reduced, with statistically significant difference ( $t=2.929$ ,  $P=0.021$ ;  $t=8.243$ ,  $P=0.001$ ). After LncRNA TUG1 expression was knocked down, FTC-133 cell migration ability ( $1\ 675.2 \pm 64.2$  vs  $898.1 \pm 156.4$ ) was significantly lower than that of the control group, and the difference was statistically significant ( $t=7.961$ ,

作者简介: 赵芳芳 (1981-), 女, 硕士, 主治医师, E-mail: netsomuch@163.com。

通讯作者: 郭红 (1975-), 女, 本科, 主治医师, 内分泌肾病科。

$P=0.001$ ). After LncRNA TUG1 expression was knocked down, E-cadherin expression was significantly increased ( $0.74 \pm 0.06$  vs  $1.66 \pm 0.17$ ) and N-cadherin expression was significantly decreased ( $1.27 \pm 0.18$  vs  $0.39 \pm 0.07$ ) compared with the control group, the difference was statistically significant ( $t=8.839$ ,  $P<0.000$ ;  $t=7.892$ ,  $P=0.001$ ). **Conclusion** LncRNA TUG1 was highly expressed in thyroid cancer tissues and cells. Promoting the proliferation and migration of thyroid cancer cells may promote the biological behavior of thyroid cancer cells by promoting the formation of EMT.

**Keywords:** LncRNA TUG1; thyroid cancer; biological behavior

甲状腺癌 (thyroid carcinoma, TC) 是来源于甲状腺上皮细胞的恶性肿瘤, 约占全身恶性肿瘤的1%, 其发病呈年轻化趋势, 女性多发于男性<sup>[1]</sup>。临床上对 TC 患者的治疗有肿瘤切除、药物靶向治疗、化疗放疗等手段, 但治疗过程中仍然存在预后差等问题<sup>[2]</sup>, 对患者的健康和生活质量产生严重影响。因此, 进一步了解和揭示 TC 的发生发展机制, 找寻更多特异性分子标志物及治疗靶点, 对临床诊治意义重大。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一段长度大于 200 个核苷酸的 RNA 序列, 已被证实是癌症发生发展的关键调节因子<sup>[3-4]</sup>。牛磺酸上调基因 1 (taurine upregulated gene 1, TUG1) 是位于染色体 22q12 的一种 LncRNA<sup>[5]</sup>, 据报道 LncRNA TUG1 已在多种癌症中表达上调, 与癌症发生发展、细胞耐药及预后密切相关, 如 LncRNA TUG1 通过 EZH2 调控 LIMK2b 参与小细胞肺癌的细胞生长和化疗耐药性<sup>[6]</sup>; Meta 分析显示, LncRNA TUG1 升高是肿瘤患者不良总生存期 (overall survival, OS) 的独立预后标志物<sup>[7]</sup>; LncRNA TUG1 通过 WNT/ catenin 通路促进上皮性卵巢癌细胞增殖和侵袭<sup>[8]</sup>。然而 LncRNA TUG1 在 TC 中的功能机制目前仍不清楚, 因此, 本研究探究了 LncRNA TUG1 在 TC 组织及细胞中的表达及其对细胞增殖、迁移、侵袭的作用, 并初步探索其调控 TC 发生发展的作用机制, 为 TC 的分子靶向治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2015 年 1 月~2018 年 6 月于我院进行肿瘤切除手术治疗并经病例确诊的 36 例 TC 组织标本 (未分化癌 5 例, 滤泡状癌 25 例, 乳头状癌 6 例) 及其相对应正常的癌旁甲状腺组织。从 ATCC 公司购买人 TC 细胞株 SW1736 和 FTC-133 以及人正常甲状腺上皮细胞 Nthy-ori 3-1, 含 10ml/dl 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中培养。

**1.2 试剂和仪器** 酶联免疫检测仪购自美国 BioTek 公司。PCR 扩增仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。Lipofectamine 2000 试剂盒及 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒及 SYBR Prime Script RT-PCR Kit 试剂盒购自日本 Takara 公司。DMEM 培养基购自美国 HyClone

公司。6 孔板、96 孔板及 Transwell 小室购自美国 Corning 公司。E-cadherin 抗体、N-cadherin 抗体和 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 实时定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR):** 用 Trizol 试剂提取组织和细胞的总 RNA。使用 PrimeScript RT Reagent Kit 根据说明书进行逆转录。使用 SYBR Prime Script RT-PCR Kit 进行 qRT-PCR。引物如下, LncRNA TUG1 正向: 5'-CTATACTCAGCTTCAGTGTT-3', 反向: 5'-TACTGTATGGCCACCACTCC-3'; GAPDH 正向: 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTTGCAGGG-3', 反向: 5'-GGTGCAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'。对纯化的 RNA 进行 qRT-PCR 分析, 并用 GAPDH 内参进行校正。

**1.3.2 LncRNA TUG1 低表达细胞系模型构建:** 将 shRNA 插入慢病毒质粒中构建 LncRNA TUG1 低表达质粒 (LV-shTUG1), 以插入无意义序列的慢病毒载体 (negative control) 作为对照。使用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒 (Invitrogen) 按照说明书步骤将低表达质粒及对照质粒转染至细胞 SW1736 和 FTC133 中。

**1.3.3 MTT 实验和集落形成实验检测细胞增殖:** MTT 法: 将细胞接种于 96 孔板培养 24 h, 利用 pcDNA3.1 转染细胞, 转染后 0, 24, 48, 72 和 96 h, 向每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液, 室温孵育 4 h, 除去培养基, 每孔加入 100  $\mu$ l DMSO, 于 560 nm 处测量吸光度 ( $A$ )。集落形成实验: 将细胞以 500 个/孔浓度接种于 6 孔板, 在含 10 ml/dl 胎牛血清的 DMEM 中 37  $^{\circ}$ C 温育两周, 后固定细胞, 0.1 g/dl 结晶紫染色, 计数可见菌落数。

**1.3.4 Transwell 试验检测细胞迁移:** 将含有  $5 \times 10^4$  个细胞的细胞悬液置于 Transwell 小室的上室, 含 10 ml/dl 胎牛血清的培养基加入 Transwell 小室的下室, 温育 48 h, 擦去残留在上膜中的细胞, 用甲醇固定迁移过膜的细胞, 下层细胞用 0.1 g/dl 结晶紫染色并在显微镜下计数。

**1.3.5 Western blot 检测 EMT 相关蛋白表达:** 取转染后细胞, 使用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 将提取蛋白与上样缓冲液混合, 于 10 g/dl SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜,



5 g/dl BSA 室温封闭 2 h, 加入 E-cadherin (1:2000), N-cadherin (1:2 000) 一抗, 室温孵育 4 h, TBST 洗膜 3 次; 加入二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 使用增强的化学发光检测试剂盒检测信号, 使用 Tanon 5200 化学发光成像系统进行分析。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, LncRNA TUG1 在甲状腺癌组织及癌旁组织中的表达差异应用配对样本  $t$  检验; 各细胞组间差异比较采用独立样本  $t$  检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

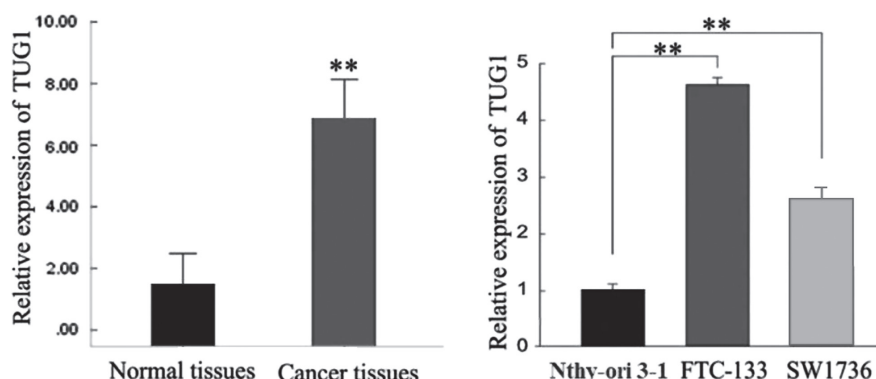


图1 qRT-PCR法检测TC组织及细胞中LncRNA TUG1的表达水平 (\*\* $P < 0.01$ )

2.2 敲降 LncRNA TUG1 表达抑制 TC 细胞的增殖 见图 2, 图 3。MTT 和集落形成实验检测显示, 与对照组相比, 敲降 LncRNA TUG1 表达后 SW1736 细胞 ( $1.31 \pm 0.19$  vs  $0.89 \pm 0.16$ ) 和 FTC-

## 2 结果

2.1 LncRNA TUG1 在 TC 组织及细胞中高表达 见图 1。采用 qRT-PCR 法检测显示, 与癌旁正常组织相比, 癌组织中 LncRNA TUG1 表达 ( $1.51 \pm 1.02$  vs  $6.90 \pm 1.19$ ) 显著升高, 差异有统计学意义 ( $t=20.634$ ,  $P < 0.000$ ); 与正常甲状腺上皮 Nthy-ori 3-1 细胞相比, FTC-133 细胞 ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $4.61 \pm 0.15$ ) 和 SW1736 细胞 ( $1.00 \pm 0.09$  vs  $2.59 \pm 0.23$ ) 中 LncRNA TUG1 水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $t=35.744$ ,  $P < 0.000$ ;  $t=11.150$ ,  $P < 0.000$ )。

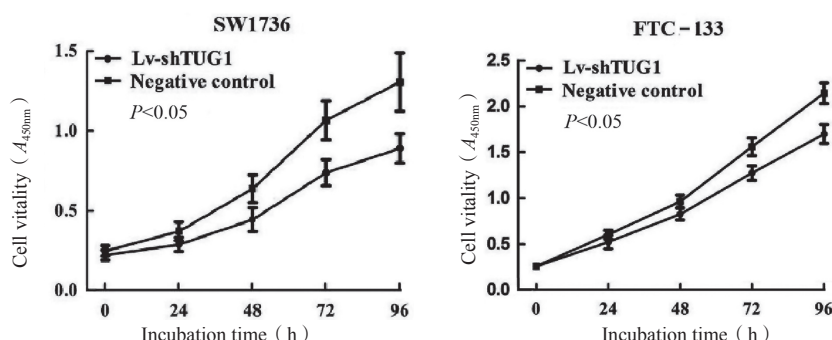


图2 MTT实验检测敲降LncRNA TUG1表达对TC细胞增殖的影响

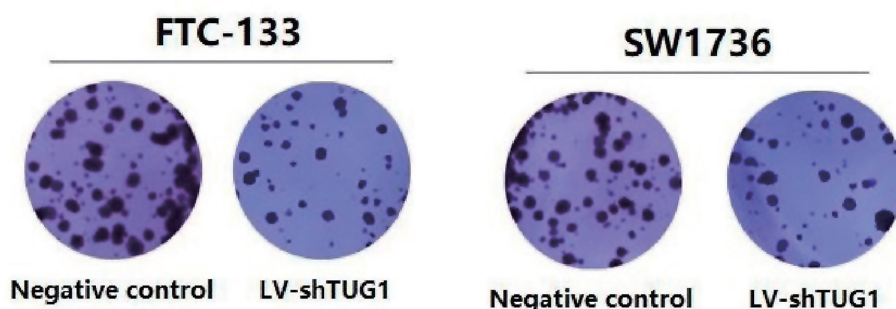


图3 集落形成实验检测敲降LncRNA TUG1表达对TC细胞克隆形成能力的影响

2.3 敲降 LncRNA TUG1 表达抑制 TC 细胞的迁移 见图 4。以 FTC-133 细胞为例, Transwell 实

验检测显示, 与对照组相比, 敲降 LncRNA TUG1 表达后, FTC-133 细胞迁移能力 ( $1\ 675.2 \pm 64.2$

vs  $898.1 \pm 156.4$ ) 显著降低, 差异有统计学意义

( $t=7.961$ ,  $P=0.001$ )。

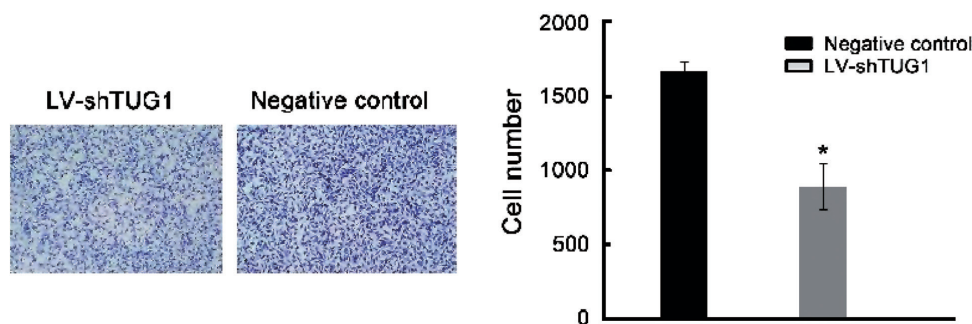


图4 敲降 LncRNA TUG1 表达对 FTC-133 细胞迁移的影响 (\* $P<0.05$ )

2.4 敲降 LncRNA TUG1 表达抑制 TC 细胞 EMT 的形成 见图 5。采用 Western blot 检测 EMT 相关蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达情况, 结果显示: 与对照组相比, 敲降 LncRNA TUG1 表达后 E-cadherin 表达量 ( $0.74 \pm 0.06$  vs  $1.66 \pm 0.17$ ) 显著升高,

N-cadherin 表达量 ( $1.27 \pm 0.18$  vs  $0.39 \pm 0.07$ ) 显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=8.839$ ,  $P<0.000$ ;  $t=7.892$ ,  $P=0.001$ )。提示 LncRNA TUG1 促进 TC 细胞 EMT 形成。

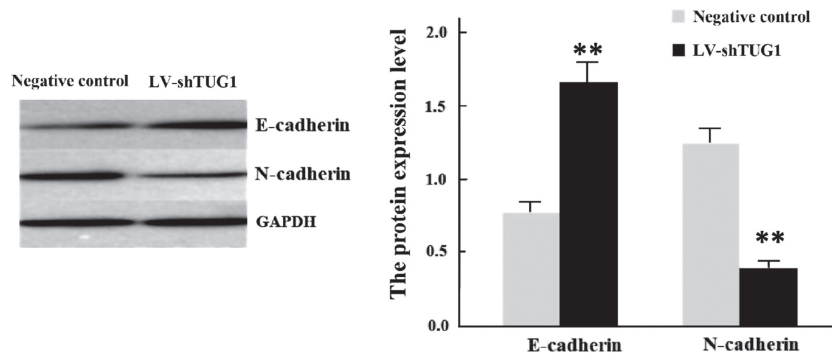


图5 LncRNA TUG1 调节 EMT 相关蛋白的表达 (\*\* $P<0.01$ )

### 3 讨论

TC 是由机体碘缺乏、辐射、遗传等因素引起的最常见的恶性肿瘤之一, 近年发病率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>, 但其具体的发病机制目前尚不清楚。LncRNA 通过多种途径调控基因表达及相关信号通路, 进而调控肿瘤细胞的生物学行为, 参与癌症的发生发展, 被认为是多种癌症的关键调节因子<sup>[9]</sup>。深入研究 LncRNA 与 TC 发生发展间的关系, 可以为 TC 的分子诊断、靶向治疗及预测预后提供一定借鉴。

LncRNA 在表观遗传、转录和转录后水平上参与基因表达的调控<sup>[10]</sup>, 被广泛报道通过多种机制调节病理生理过程, 如基因印记, 组蛋白修饰, 染色质重塑, 转录激活<sup>[11]</sup>等。并发现 LncRNA 可通过与微小 RNA (miRNA) 竞争性结合并因此抑制其功能 (即阻断与靶 mRNA 的相互作用)<sup>[11]</sup>。大量研究发现, LncRNAs 在众多不同疾病类型中均差异表达, 通过多种途径参与调控肿瘤细胞增殖、侵袭及迁移等恶性生物学行为, 诱导癌症的恶性进展, 表现为原癌基因或抑癌基因发挥作用<sup>[12-16]</sup>。

LncRNA TUG1 最初被鉴定为是由牛磺酸上调的转录物, 在许多癌症中已经报道了 LncRNA TUG1 的异常表达, 发现 TUG1 可通过招募某些 RNA 结合蛋白, 进而促进靶基因表达, 影响肿瘤血管生成或充当竞争性内源性 RNA (ceRNA) 调控肿瘤的发生发展<sup>[5]</sup>。CAO 等<sup>[17]</sup>研究发现, LncRNA TUG1 是骨肉瘤患者存活的预后因素。LncRNA TUG1 高表达与膀胱癌和食管鳞癌细胞的增殖和转移有关<sup>[18-19]</sup>。NIU 等<sup>[6]</sup>研究发现, LncRNA TUG1 通过 EZH2 调控 LIMK2b 参与小细胞肺癌的细胞生长和化疗耐药性。LI 等<sup>[20]</sup>发现, LncRNA TUG1 通过与 PRC2 结合调节胃癌细胞增殖。WANG 等<sup>[21]</sup>研究发现, LncRNA TUG1 通过 EMT 途径促进结肠直肠癌的转移。由此可见, LncRNA TUG1 在调节多种转录因子和生理过程中具有重要意义, 提示 TUG1 有望成为众多肿瘤诊断及预后的生物标志物或治疗新靶点。因此, 研究 LncRNA TUG1 在 TC 中发挥的功能及其分子机制对寻找新的治疗靶点至关重要。

本研究应用 qRT-PCR 检测发现 TC 组织及细胞中 LncRNA TUG1 表达水平较癌旁正常组织及

正常甲状腺上皮细胞明显升高 ( $P<0.05$ ), 提示 LncRNA TUG1 与 TC 的发生发展密切相关。将 shRNA 插入慢病毒质粒构建 LncRNA TUG1 低表达细胞系, 采用 MTT 法、集落形成实验、Transwell 实验于细胞水平检测发现敲降 LncRNA TUG1 表达明显抑制 TC 细胞的增殖及迁移能力 ( $P<0.05$ ), 提示 TC 中 LncRNA TUG1 扮演促癌基因。EMT 是上皮细胞获得迁移能力的有效方式, 也是 TC 细胞浸润转移的重要形式, 因此本研究通过蛋白印迹探究了 LncRNA TUG1 表达对 TC 细胞 EMT 形成的影响, 发现敲降 LncRNA TUG1 表达抑制了 EMT 形成。表明 LncRNA TUG1 在 TC 中高表达, 促进细胞的增殖及迁移, 可能通过促进 EMT 的形成进而发挥作用。本研究初步证明了 LncRNA TUG1 通过调控 EMT 形成参与 TC 的发生发展, 然而肿瘤的形成是一个复杂的调控过程, TUG1 调控肿瘤发生发展的方式多样, 必定涉及多种基因或因子的相互调节及信号转导通路, 其调控 TC 恶性发展进程的分子机制还需进一步深入探究分析阐明。此外, 包含 TUG1 在内的多个 LncRNA 近年被研究报道能够调控肿瘤能量代谢影响肿瘤恶性行为, 其中 LIN 等<sup>[22]</sup>在 Hepatoligy 上报道 TUG1 可调控肝癌细胞的糖酵解能力, 影响癌细胞增殖、迁移。HAN 等<sup>[23]</sup>研究指出, LncRNA TUG1 通过调节糖酵解作用影响骨肉瘤细胞的存活率。徐苏娟等<sup>[24]</sup>通过 Seahorse 能量分析仪对卵巢癌 OVCAR3 细胞糖酵解压力及线粒体压力变化, 显示干扰 TUG1 表达能显著降低癌细胞的线粒体呼吸和糖酵解通量, 指出卵巢癌细胞的增殖及迁移可能与 TUG1 调控肿瘤能量代谢有关。目前, 糖酵解作为肿瘤能量来源已被广泛接受, 且主流观点认为肿瘤细胞即使在足氧条件下, 仍可通过糖酵解方式消耗大量葡萄糖以给肿瘤细胞供能, 即瓦氏效应 (Warburg effect)<sup>[25-26]</sup>。而 TC 中 LncRNA TUG1 是否也可通过调控能量代谢进而影响 TC 的生物学行为本研究尚未触及, 是本研究的不足和缺陷, 但可将其作为后期研究的一个新的探究方向。

综上所述, LncRNA TUG1 在 TC 中过表达, 可能通过促进 EMT 的形成进而促进癌细胞的增殖及迁移, 可作为一种新的潜在癌基因, 靶向抑制 LncRNA TUG1 的表达可能是 TC 治疗的一种新方法, 对临床诊治及预测预后具有重要潜在价值。

#### 参考文献:

- [1] VANDERPUMP MARK P J. Epidemiology of thyroid disorders: A comprehensive guide for the clinician[M]. The Thyroid and Its Diseases, 2019:75-85.
- [2] 王卓颖, 钱凯. 晚期甲状腺癌新辅助治疗进展 [J].

中国实用外科杂志, 2019, 39 (3): 275-279.

WANG Zuoying, QIAN Kai. Progress of neoadjuvant therapy for advanced thyroid cancer [J]. Chinese Journal of Applied surgery, 2019, 39 (3): 275-279.

- [3] MAO Y, LIU R, ZHOU H, et al. Transcriptome analysis of miRNA-lncRNA-mRNA interactions in the malignant transformation process of gastric cancer initiation [J]. Cancer Gene Therapy, 2017, 24 (6): 267-275.
- [4] ZHU Shiyu, LI Wei, LIU Jingze, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library [J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(12): 1279-1286.
- [5] LI Zheng, SHEN Jianxiong, CHAN M T, et al. TUG1: a pivotal oncogenic long non-coding RNA of human cancers [J]. Cell Proliferation, 2016, 49(4): 471-475.
- [6] NIU Yuchun, MA Feng, HUANG Weimei. Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2 [J]. Molecular cancer, 2017, 16(1): 5.
- [7] LIU Jia, LIN Jieru, LI Yingqi, et al. Prognostic role of lncRNA TUG1 for cancer outcome: Evidence from 840 cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 50051-50060.
- [8] LIU Shankun, LIU Ying, LU Qiang, et al. The lncRNA TUG1 promotes epithelial ovarian cancer cell proliferation and invasion via the WNT/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 6845-6851.
- [9] 张振, 李芬. ceRNA 与肿瘤 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31 (4): 128-130.
- ZHANG Zhen, LI Fen. ceRNA and tumor [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31 (4): 128-130.
- [10] FOK E T, DAVIGNON L, FANUCCHI S, et al. The lncRNA connection between cellular metabolism and epigenetics in trained immunity [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 3184.
- [11] KOCH L. Functional genomics: Screening for lncRNA function [J]. Nature Reviews Genetics, 2017, 18(2): 70.
- [12] ZHANG Pengfei, CAO Limian, FAN Pingsheng, et al. LncRNA-MIF, a c-Myc-activated long non-coding RNA, suppresses glycolysis by promoting Fbxw7-mediated c-Myc degradation [J]. EMBO Reports, 2016, 17(8): 1204-1220.
- [13] 白盈盈, 朱光旭, 潘兴华. 长链非编码 RNA 对结直肠癌潜在诊断价值的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (1): 161-164.
- BAI Yingying, ZHU Guangxu, PAN Xinghua. Advances in the potential diagnostic value of long non-coding RNA in colorectal cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 33 (1): 161-164.
- [14] XUE Mei, PANG Huan, LI Xu, et al. Long non-coding RNA urothelial cancer-associated 1 promotes bladder cancer cell migration and invasion by way of the hsa-miR-145-ZEB1/2-FSCN1 pathway [J]. Cancer science, 2016, 107(1): 18-27.



- [15] CHEN Xuemei, HAN Hongyu, LI Yuqi, et al. Upregulation of long noncoding RNA HOTTIP promotes metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via induction of EMT[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84480-84485.
- [16] SUN Ming, NIE Fengqi, WANG Yunfei, et al. LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(21): 6299-6310.
- [17] CAO Jiaqing, HAN Xinyou, QI Xin, et al. TUG1 promotes osteosarcoma tumorigenesis by upregulating EZH2 expression via miR-144-3p[J]. *International Journal of Oncology*, 2017, 51(4): 1115-1123.
- [18] XU Youtao, WANG Jie, QIU Mantang, et al. Upregulation of the long noncoding RNA TUG1 promotes proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biology*, 2015, 36(3): 1643-1651.
- [19] ILIEV R, KLEINOVA R, JURACEK J, et al. Overexpression of long non-coding RNA TUG1 predicts poor prognosis and promotes cancer cell proliferation and migration in high-grade muscle-invasive bladder cancer[J]. *Tumour Biology*, 2016, 37(10): 13385-13390.
- [20] LI Jun, AN Gang, ZHANG Meng, et al. Long non-coding RNA TUG1 acts as a miR-26a sponge in human glioma cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 477(4): 743-748.
- [21] WANG Liang, ZHAO Zhenxian, FENG Weidong, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes colorectal cancer metastasis via EMT pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51713-51719.
- [22] LIN Y H, WU Menghan, HUANG Yahui, et al. Taurine up-regulated gene 1 functions as a master regulator to coordinate glycolysis and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2018, 67(1): 188-203.
- [23] HAN Xiufu, YANG Yanming, SUN Yongjie, et al. LncRNA TUG1 affects cell viability by regulating glycolysis in osteosarcoma cells[J]. *Gene*, 2018, 674: 87-92.
- [24] 徐苏娟, 付子毅, 刘丝雨, 等. lncRNA TUG1 对卵巢癌细胞 OVCAR3 的增殖迁移及能量代谢的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(1): 26-31.
- XU Sujuan, FU Ziyi, LIU Siyu, et al. Effects of lncRNA TUG1 on proliferation, migration and energy metabolism of OVCAR3 cells[J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2019, 24(1): 26-31.
- [25] BOROUGHS L K, DEBERARDINIS R J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(4): 351-359.
- [26] DANHIER P, BAŃSKI P, PAYEN V L, et al. Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2017, 1858(8): 556-572.

收稿日期: 2020-06-09

修回日期: 2020-06-30

## (上接第24页)

- JIN Guangming, PU Lianshan. Association between NADPH oxidase subunit p22phox gene C242T polymorphism and lower limb arteriosclerosis in type 2 diabetic patients[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2008, 34(15): 2510-2513.
- [11] 李小青, 康德, 张安平, 等. 老年2型糖尿病患者血浆同型半胱氨酸与动脉硬化相关性研究[J]. *交通医学*, 2015, 29(5): 474-476.
- LI Xiaoqing, KANG De, ZHANG Anping, et al. Correlation between plasma homocysteine and atherosclerosis in elderly patients with type 2 diabetes[J]. *Medical Journal of Communications*, 2015, 29(5): 474-476.
- [12] 叶成松. 血清同型半胱氨酸与2型糖尿病合并下肢动脉病变相关性研究[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2018, 5(A3): 27, 32.
- YE Chensong. Correlation between serum homocysteine and type 2 diabetes mellitus with lower extremity arterial disease[J]. *Journal of Clinical Medical Literature (Electronic Edition)*, 2018, 5(A3): 27, 32.
- [13] 张天瀛. 早期胰岛素泵强化治疗对新诊断2型糖尿病患者下肢血管病变发生发展的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- ZHANG Tianying. The effect of intensive therapy with insulin pump on the occurrence and development of low limb vascular disease in newly diagnosed patients with type 2 diabetic mellitus[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.
- [14] 刘娜, 杨秋萍, 张健伟. 云南彝族 Fetuin A 基因多态性与2型糖尿病合并下肢动脉硬化的相关性研究[J]. *医学研究杂志*, 2008, 47(6): 45-51.
- LIU Na, YANG Qiuping, ZHANG Jianwei, et al. Study on the correlation of Fetuin A gene polymorphism and lower extremity atherosclerosis with type 2 diabetes of Yi Nationality in Yunnan Province[J]. *Journal of Medical Research*, 2008, 47(6): 45-51.
- [15] 刘小玲, 李卫国, 李振华. 2型糖尿病患者颈动脉内-中膜厚度与血清IL-6和Fetuin-A水平的关系研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(5): 115-117.
- LIU Xiaoling, LI Weiguo, LI Zhenhua. Study on the relationship of carotid intimal-medial wall thickness and the expression of IL-6 and fetuin-A in the serum of two type diabetes[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(5): 115-117.
- [16] JUNG S H, WON K J, LEE K P, et al. The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction[J]. *Clinical Science*, 2015, 129(1): 27-38.

收稿日期: 2020-05-08

修回日期: 2020-05-25

# 广西贵港地区人群 MN 血型等位基因多态性的调查研究

徐庆萍<sup>1</sup>, 王 杰<sup>2</sup>, 岑松光<sup>1</sup>, 赵卫新<sup>1</sup>, 陆 永<sup>1</sup>, 黄冬梅<sup>1</sup>, 梁延连<sup>3</sup>

(1. 贵港市平南县人民医院检验科, 广西平南 537300; 2. 大连医科大学检验医学系, 辽宁大连 116027;  
3. 深圳市血液中心输血医学研究所, 广东深圳 518035)

**摘要:**目的 探讨广西贵港地区人群 MN 血型等位基因的分布特点。方法 收集 2018 年 9 月~2019 年 6 月期间广西贵港地区随机人群 300 人份血样, 采用血型血清学方法鉴定其 MN 表现型, 同时提取血样中的 DNA, 对 MN 血型相关基因 GYPA 的 exon-2 序列扩增后测序, 分析广西贵港地区人群 MN 等位基因的多态性并与中国西安、新疆、贵州、广东等地区随机人群的 MN 血型基因频率作比较。结果 广西贵港地区人群的 MN 血型血清学定型与基因测序结果完全一致, 300 例 MN 血型血清学鉴定中, MM 表型为 140 例, MN 表型为 121 例, NN 表型为 39 例; M 基因频率为 0.668, N 基因频率为 0.332。通过数据比较分析可知广西贵港地区人群基因各型的构成比与国内其他地区人群不同, MN 血型抗原在不同个体中存在明显的剂量效应。结论 广西贵港地区人群 MN 血型基因具有独特的多态性, 了解这种多态性有助于广西贵港地区临床的安全输血, 预防新生儿溶血性疾病, 为广西贵港地区人类群体遗传学特征及分子生物学研究奠定基础。

**关键词:** MN 血型; 红细胞血型糖蛋白; GYPA 第 2 外显子; MN 血型基因频率; 多态性  
**中图分类号:** R457.11; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-048-05  
**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.012

## Investigation on Allele Polymorphism of MN Blood Group in Guigang Area of Guangxi

XU Qing-ping<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, CEN Song-guang<sup>1</sup>, ZHAO Wei-xin<sup>1</sup>, LU Yong<sup>1</sup>, HUANG Dong-mei<sup>1</sup>, LIANG Yan-lian<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Pingnan County People's Hospital of Guigang City, Guangxi Pingnan 537300, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China;  
3. Institute of Transfusion Medicine, Shenzhen Blood Center, Guangdong Shenzhen 518035, China)

**Abstract: Objective** To investigate the distribution of MN alleles in Guigang area of Guangxi. **Methods** The areas random population of 300 blood samples were collected from September 2018 to June 2019 in Guangxi. Blood group serology was used to identify the MN phenotype and the DNA in the blood samples were extracted. The exon-2 sequence of MN blood group related gene GYPA were amplified and sequenced. The polymorphism of MN alleles for the population of Guigang in Guangxi were analyzed and compared with the frequency of MN blood group gene in random population with Xi'an, Xinjiang, Guizhou and Guangdong of China. **Results** The MN blood group were authenticated for the 300 blood samples by the serological methods and the genes were sequenced. The results showed that 140 people with MM phenotype, the 121 people with MN phenotype and the 39 people with NN phenotype were identified. The frequency of M gene was 0.668 and the N gene was 0.332. Through data comparison and analysis that can be seen the composition ratio of each genotype for the population in Guigang Area of Guangxi were different from that in other areas of China. The MN blood group antigens had obvious dose effect in different individuals. **Conclusion** The MN blood group genes in Guigang area of Guangxi have a unique polymorphism. Understanding this polymorphism is conducive to the safe clinical transfusion in Guigang Area of Guangxi and the prevention of hemolytic diseases in newborns. These results lay a foundation for the study of genetic characteristics and molecular biology of human population in Guigang Area of Guangxi.

**Keywords:** MN blood group; erythrocyte blood type glycoprotein; GYPA exon 2; MN blood group gene frequency; polymorphism

人类 MNS 血型系统已被证明了共有 46 种抗原, MNS 血型基因结构调控的相关抗原严重干扰血型鉴定、临床输血与新生儿同种免疫性疾病; 同时在器官移植、法医学鉴定等方面均有着重要的应用

**基金项目:** 贵港市科技局立项项目 (贵科转 1803016); 广东省医学科研基金 (B2020179)。

**作者简介:** 徐庆萍 (1978-), 女, 学士学位, 副主任技师, 从事医学检验及临床输血检验工作, E-mail: pnyyjk@163.com。

**通讯作者:** 梁延连 (1973-), 女, 副主任技师, 从事红细胞血型免疫遗传学及临床输血研究, E-mail: lianviky@126.com。

价值<sup>[1-2]</sup>。在亚洲、欧洲、美洲和澳大利亚均有报道由MNS血型抗体引起的临床输血反应,胎儿和新生儿溶血病,在所报道的病例中至少有40%的病例报告了严重的病情。事实证明,由MNS血型基因变异所表达的糖蛋白(抗原)在临床输血与免疫性疾病中具有重大意义。MNS血型系统的抗体复杂多样,对应的临床有意义的抗体包括:抗-M,抗-N,抗-S,抗-s,抗-“Mia”,抗-Vw,抗-MUT,抗-Hil,抗-TSEN,抗-“Mi”等。因此,研究MNS血型等位基因多态性已成为迫切的问题。MN血型抗原的多态性是由编码血型糖蛋白A(glycoprotein A, GPA)的相关基因GYPA的第2外显子决定的,在遗传过程中发生的碱基突变、交换、错排、缺失等都会影响MN抗原的数量或型别的差异。本实验通过随机选择广西贵港地区人群的300例全血,以血清学与分子生物学手段来分析本地区人群的MN血型等位基因的多态性,现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 随机选取广西贵港地区300例无血缘关系的抗凝血,其中男性109例,女性191例,采集静脉血5ml并用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝。4℃保存,后进行MN血型鉴定及提取全血DNA。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂:单克隆鼠IgM性质血清Anit-M(批号:20190709),Anit-N(批号:20190428)均由上海血液生物科技有限责任公司提供;ID-Card(批号:50531.44.21)由BIO-RAD提供;Gentra DNA提取试剂盒(批号:106412)由Promega公司提供。

1.2.2 仪器:Eppendorf9700 PCR扩增仪与Prism™ ABI3730XL基因测序仪,Embitec电泳仪及D77W-WL-20-M凝胶成像仪。Diamed-ID 12SI卡式离心机;Diamed-ID 37SI孵育器。

### 1.3 方法

1.3.1 MN血型血清学剂量效应检测方法:定量血清与定量红细胞悬液检测M抗原与N抗原的凝集强度,以判断MN抗原在不同个体间的剂量效应,取5μl红细胞压积加入500μl生理盐水稀释成5%的红细胞悬液,吸取50μl稀释5%(v/v)的红细胞悬液加入ID-Card微板中,分别加入抗-M或抗-N血清,放入Diamed-ID 12SI卡式离心机中以1030r/min离心10min后判读结果,根据凝集强度判定MN抗原在不同个体间的表达。

1.3.2 基因频率计算方法:以m代表M基因频率,n代表N基因频率,根据基因频率的计算公式: $m = \frac{M + MN}{2}$ , $n = \frac{N + MN}{2}$ 计算得到M,N的基因频率。

1.3.3 DNA提取与PCR扩增体系:使用Gentra

试剂盒提取300例广西贵港地区人群血样的DNA,并控制DNA的浓度在100ng/μl左右,以利于后续PCR扩增。参照深圳市血液中心梁延连<sup>[3]</sup>设计的引物与扩增条件对贵港地区人群的MN血型相关基因GYPA第2外显子进行扩增,以直接测序碱基序列的多态性来验证MN血型的型别,PCR扩增引物的正向引物序列为:5'-CCACATAGCAATTCTCTAAAC-3';反向引物序列为:5'-GCATTTCTCAGTGTGTTGTCAC-3'。

1.3.4 PCR扩增体系与条件:PCR采用50μl体系:10×Buffer:5μl;MgCl<sub>2</sub>:3μl,dNTP 4μl;正,反向引物各2μl;TaqDNA聚合酶:1μl;DNA模板:2μl;ddH<sub>2</sub>O:31μl。扩增条件:94℃预变性5min;94℃×1min,56℃×1min,72℃×1min,30个循环;72℃延伸5min,4℃保存。

1.3.5 扩增产物验证:取3μl扩增产物经2g/dl琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段与产物的纯度。

1.3.6 扩增产物纯化与测序:使用离心过滤柱法(Millipore公司)纯化扩增产物,以纯化后的扩增产物作为测序反应模板,再一次进行扩增,测序引物与第一次扩增引物序列相一致,采用10μl反应体系:引物(终浓度为0.0625pmol/L):3μl;模板DNA:1μl;ddH<sub>2</sub>O:2.0μl;ABI Big-Dye v3.1测序反应液4μl。PCR扩增条件:94℃预变性10min;94℃变性10s,50℃退火5s,60℃延伸4min,运行25个循环后产物于4℃保存。对以上扩增产物用醋酸钠/乙醇沉淀法提纯后使用Prism™ ABI3730XL基因测序仪检测,并使用Oli6instatler分析软件进行分析。

## 2 结果

2.1 广西贵港地区人群的MN血型抗原剂量效应 通过红细胞与抗体血清定量试验,发现广西贵港地区人群的MN血型抗原在不同个体间存在明显的剂量效应,即MM型的红细胞结合抗-M抗体的凝集强度达到3+以上,MM型不同个体间的凝集强度在3+~4+之间;NN型的红细胞结合抗-N抗体的凝集强度也达到3+以上,NN型不同个体间的凝集强度在2+~4+之间;而MM型红细胞结合抗-M抗体比MN型红细胞结合抗-M抗体的凝集强度要高出2+,同样的NN型红细胞结合抗-N抗体比MN型红细胞结合抗-N抗体也高出2+的凝集强度,说明广西贵港人群不同个体间的MN抗原存在明显的表达差异,这与文献报道的相一致<sup>[4]</sup>。

2.2 广西贵港地区人群MN血型基因频率调查结果 见表1。通过MN血型鉴定,得到本地区的MN血型基因频率,与已报道的中国新疆哈萨克族人群基因频率接近<sup>[6]</sup>,与西安地区人群<sup>[5]</sup>、贵州省



区布依族人群<sup>[7]</sup>、广东省河源地区人群<sup>[8]</sup>、深圳地区人群<sup>[9]</sup>等的MN表型及基因频率对比,差异均有统计学意义。

表1 广西贵港地区人群MN血型基因分布与其他地区人群的比较

类别	n	MM	MN	NN	M基因频率	N基因频率
广西贵港地区	300	140	121	39	0.668 0	0.332 0
西安地区 <sup>[5]</sup>	200	54	79	67	0.467 5	0.532 5
中国新疆哈萨克族 <sup>[6]</sup>	196	73	107	16	0.645 4	0.354 6
贵州地区布依族 <sup>[7]</sup>	138	30	87	21	0.532 6	0.467 4
广东省河源地区 <sup>[8]</sup>	1 000	316	493	191	0.562 5	0.437 5
广东省深圳地区 <sup>[9]</sup>	246	59	116	71	0.475 6	0.524 4

2.3 基因测序结果 见表2。经PCR扩增后,对

300例广西贵港地区人群血样进行单特异性碱基序列分析,MN血型基因特异性关键位点在GYPA基因的第2外显子1号位、22号位、34,35号位的碱基区别。

表2 广西贵港地区人群MN血型GYPA基因的第2外显子位点区别

基因	1	22	34,35
MM	C/A	C	C,T
MN	C	T/C	A/G, G/T
NN	A	T	A,G

从测序结果可清晰的区分MN杂合子、MM纯合子、NN纯合子血型,基因测序分型与血清学结果完全一致,MN血型特异性鉴定在GYPA基因第2外显子上的碱基缩略图见图1。

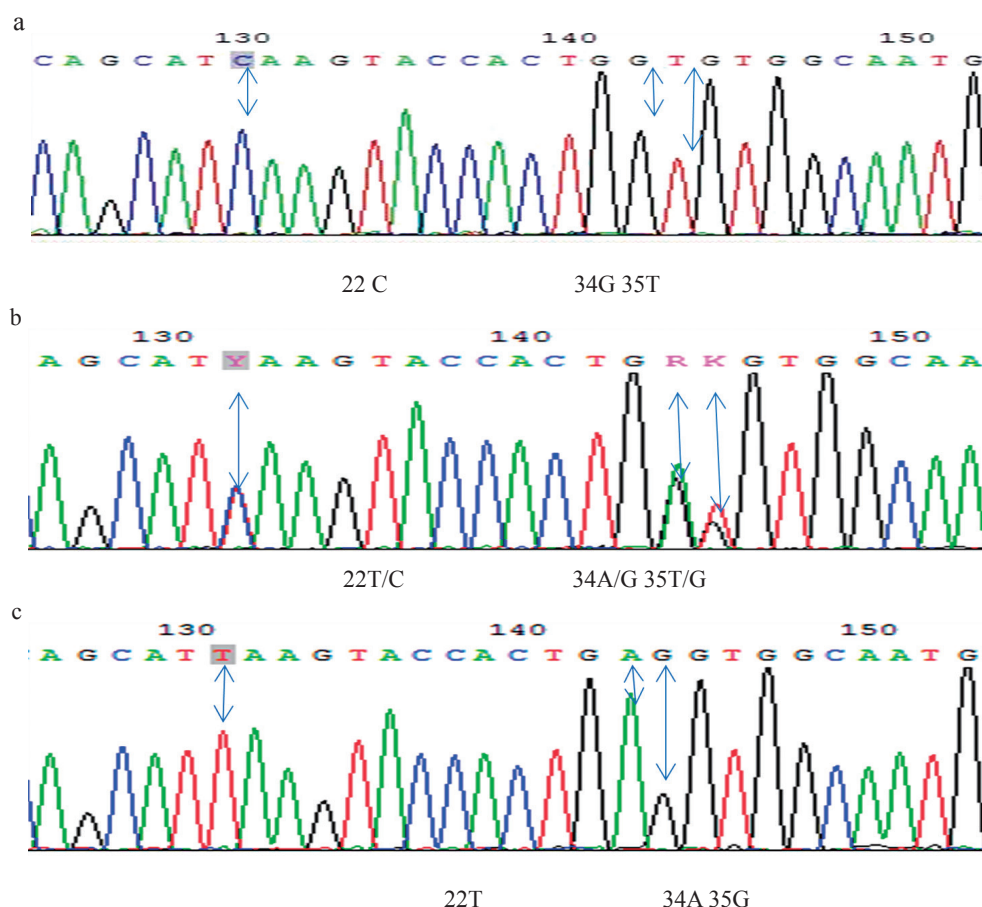


图1 MM, MN, NN基因型测序代表图(a. MM纯合子表型; b. MN杂合子表型; c. NN纯合子表型)

通过基因测序GYPA第2外显子的碱基序列,发现所选的广西贵港地区人群均在第22,34/35位点上区分出MN血型的特异性,准确地鉴定了MM, MN, NN基因型,基因分型与血清学检测结果完全相符。

### 3 讨论

由GPA糖蛋白决定的MN血型系统抗原具有免疫原性,在异型输血与妊娠后可以产生异源免疫IgG抗体,引起临床输血反应与人类免疫性疾病。

MN血型分布具有明显的地区与人类种族间的差异,在分子水平上,已有研究确定了GPA的结构和分子遗传基础,同时证明MNS血型基因家族具有明显的多样性模式<sup>[10-13]</sup>。MNS血型的高度多态性,主要由高度同源的GYPA, GYPB和GYPE基因之间的重组以及单核苷酸变化产生的多态抗原组成,不同地区人群GYPA基因单核苷酸的变异会构成该区域人群的种族MN血型基因多态性特征<sup>[14]</sup>。

决定MN血型抗原的相关基因GYPA由7个

外显子组成,红细胞膜中成熟的 GPA 仅由 GYPA 基因外显子 2 ~ 7 编码,每个红细胞中大约表达  $2.5 \times 10^5$  个 GPA 糖蛋白<sup>[15-17]</sup>。区分 M, N 抗原的血型糖蛋白在 GPA 的第 1 位和第 5 位氨基酸 (M:Ser1/Gly5, N:Leu/Glu5), 两个氨基酸均位于 GYPA 基因的第 2 外显子区间<sup>[18]</sup>。遗传过程中 GYPA 基因与 GYPB 基因同源区域的交叉或转换会产生不同的混合型糖蛋白基因,这些基因编码的糖蛋白表现为不同的 MNS 变异表型<sup>[19]</sup>。广西贵港地区人群的调查研究采用了血型血清学与碱基测序的方法分析了 GYPA 的第 2 外显子,并根据 GYPA 的第 2 外显子的碱基序列区分出 MN 型杂合子,MM 型纯合子与 NN 型纯合子。根据贵港地区人群 MN 血型抗原的定量检测发现:M 与 N 抗原在不同个体中具有明显的剂量效应,同时发现了广西贵港地区 M 基因频率明显偏高, N 基因频率相对较低的分布特征,这与中国新疆哈萨克族人群的 MN 血型基因频率接近<sup>[6]</sup>,与西安地区人群、贵州地区的布依族人群、广东河源地区人群、广东深圳地区人群的 MN 型基因频率均有差异<sup>[5,7-9]</sup>。这说明:MN 血型存在地区的多态性特征,如果广西贵港地区的患者血浆中存在抗 -M 不规则抗体时,较难筛选到 M 抗原阴性的血液,因为 NN 型纯合子的频率只有 13%,这将给临床输血带来一定的困扰,以上结论是本研究的应用价值及推广性。随机选择广西贵港地区的 300 例人群从基因测序结果证实了 GYPA 基因第 2 外显子碱基序列的鉴定结果与抗 -M、抗 -N 抗体血清检测分型一致,而且未发现 GYPA 的第 2 外显子中存在特异性突变,其他外显子的碱基是否有异常表达有待进一步的研究。

综上,通过对广西贵港地区人群 MN 血型基因频率的调查分析和 GYPA 第 2 外显子结构特征的了解,明确了广西贵港地区人群的 MN 基因多态性,为临床输血前 MN 同型输血的储备用血做好铺垫,为广西贵港地区的器官移植、新生儿免疫性溶血性疾病的诊断、法医学鉴定以及群体遗传关系和种族迁移等领域的研究奠定了基础。基于 MN 血型的地域性特征比较明显,可能还有相关基因的碱基突变未被发现,有待增加标本量对广西贵港地区人群的 MN 血型进行深入与更广泛的研究。

#### 参考文献:

- [1] ISHIDA A, OHTO H, YASUDA H, et al. Anti-M antibody induced prolonged anemia following hemolytic disease of the newborn due to erythropoietic suppression in 2 siblings[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2015, 37(6):e375-377.
- [2] WU K H, CHU S L, CHANG J G, et al. Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan[J]. Transfusion Medicine, 2003, 13(5):311-314.
- [3] 梁延连, 苏宇清, 张印则. GPA, GPB 分子相关基因 GYPA, GYPB 外显子全长序列直接测序方法的建立及应用评价 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2013, 36 (2) : 102-105.  
LIANG Yanlian, SU Yuqing, ZHANG Yinze. New DNA direct sequencing method of the GPA and GPB related gene GYPA, GYPB exons overall length[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2013, 36 (2) : 102-105.
- [4] 梁延连, 苏宇清, 喻琼, 等. 中国汉族人群红细胞 MNS 血型系统 M、N 抗原数量表达的研究 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2010, 33(5):391-394.  
LIANG Yanlian, SU Yuqing, YU Qiong, et al. Study of the M and N antigen's quantities on the red cells of the MNSs human blood group in Chinese han population[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2010, 33 (5) : 391-394.
- [5] 彭进, 梁延连, 徐华, 等. 西安地区献血人群 MNS 血型基因多态性研究 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30(6):590-592.  
PENG Jin, LIANG Yan-lian, XU Hua, et al. Analysis of genetic polymorphism of blood donors in Xi'an based on the MNS human blood group system[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2017, 30 (6) : 590-592.
- [6] 虞彬, 单金晶, 张雅楠, 等. 中国新疆哈萨克族人 9 种稀有血型系统基因频率分布状况 [J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 36 (1) : 4-10.  
YU Bin, SHAN Jinjing, ZHANG Yanan, et al. Distribution of gene frequencies of nine rare blood groups in Kazak[J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2008, 36 (1) : 4-10.
- [7] 梁延连, 黄敏, 宋飞峰 等. 贵州地区布依族人群 MNS 血型基因 GYPA 和 GYPB 的群体遗传学研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 38-41.  
LIANG Yanlian, HUANG Min, SONG Feifeng, et al. Study on the population genetics of GYPA and GYPB gene about the MNS blood group in Guizhou Buyi nationality[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 38-41.
- [8] 黄璐, 陈丽红, 庄运芳, 等. 广东省河源地区 MN 血型基因频率调查 [J]. 国际医药卫生导报, 2014, 20(14):2052-2054.  
HUANG Lu, CHEN Lihong, ZHUANG Yunfang, et al. Gene frequencies of MN blood group in Heyuan, Guangdong[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2014, 20(14):2052-2054.
- [9] 张艳艳, 梁延连, 苏宇清 等. 广东省深圳地区汉族人群 MN 血型表现型的特点及基因频率调查 [J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(6):59-62.  
ZHANG Yanyan, LIANG Yanlian, SU Yuqing, et al. Characteristic phenotype and gene frequencies of MN blood group in han population of Guangdong-Shenzhen Area [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(6):59-62.

# 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究

张筱东<sup>1</sup>, 谢星星<sup>1</sup>, 李 佳<sup>2</sup>, 朱 帅<sup>2</sup>

(1. 延安市人民医院检验科, 陕西延安 716000; 2. 延安大学医学院, 陕西延安 716000)

**摘要:** 目的 研究血清外泌体中 miR-221 和 miR-378 水平及其联合检测对诊断胃癌的价值。方法 选取延安市人民医院收治的胃癌患者 92 例为试验组, 选取同期诊断为胃息肉的患者 68 例和同期健康体检者 50 例为对照组, 空腹采集静脉血提取血清外泌体用 Western Blot 和 Nanosight 法鉴定, 用实时荧光定量 PCR 检测血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平, 用 ROC 曲线分析 miR-221 和 miR-378 联合检测对胃癌的诊断效能。结果 血清外泌体标本经 Western Blot 蛋白标志物检测鉴定和 Nanosight 颗粒浓度检测鉴定, 结果显示所提取的标本中确实含有外泌体。用实时荧光定量 PCR 对标本进行定量检测结果显示, 血清外泌体中 miR-221 和 miR-378 水平胃癌组高于胃息肉组, 胃息肉组又高于健康对照组, 差异均有统计学意义 ( $F=7.112\sim10.986$ , 均  $P < 0.01$ )。ROC 曲线分析显示, miR-221 和 miR-378 联合检测对胃癌诊断的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值都明显高于单独检测, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明这两种 miRNA 联合检测对胃癌的诊断效能高于单独检测。结论 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平联合检测对诊断胃癌有潜在的应用价值。

**关键词:** 外泌体; miRNA; 胃癌

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-052-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.013

## Application Study of Serum Exosome miR-221 and miR-378 Detection in the Diagnosis of Gastric Cancer

ZHANG Xiao-dong<sup>1</sup>, XIE Xing-xing<sup>1</sup>, LI Jia<sup>2</sup>, ZHU Shuai<sup>2</sup>

(1. Yan'an People's Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China;

2. Medical School of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

**Abstract: Objective** To study the levels of miR-221 and miR-378 in serum exosomes and their combined detection value in the diagnosis of gastric cancer. **Methods** Selected 92 gastric cancer cases from Yan'an People's Hospital as experimental group, selected 68 gastric polyps cases in the same period, and selected 50 healthy persons doing physical examinations as control group. Fasting venous blood was collected to extract and identify exosomes using Western Blot and Nanosight method. Real-time quantitative PCR was used to detect levels of miR-221 and miR-378 in the serum exosomes. ROC curve analysis was used to analyze diagnostic efficiency of joint detection of miR-221 and miR-378 for gastric cancer. **Results** Western Blot protein marker identification and Nanosight particle concentration detection results of serum exosome samples showed that the extracted samples did contain exosomes. Real-time quantitative PCR detection showed that the expression levels of miR-221 and miR-378 in serum exosomes were higher in gastric cancer group than those in gastric polyp control group, which were higher than those in healthy control group, and the differences were statistically significant ( $F=7.112\sim10.986$ , all  $P < 0.01$ ). ROC curve analysis showed that the specificity, sensitivity, diagnostic coincidence rate and negative predictive value of the combined detection of miR-221 and miR-378 were significantly higher than those of the single detection, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The results indicated that the combined detection was more effective than single detection. **Conclusion** The combined detection of serum exosome miR-221 and miR-378 levels has potential application value in the diagnosis of gastric cancer.

**Keywords:** exosome; microRNA; gastric cancer

胃癌 (gastric cancer) 在我国是发病率很高的一种恶性肿瘤, 其死亡率根据近年统计占我国城乡人口癌症死因之第二位<sup>[1]</sup>。目前胃癌的早期诊断率比

较低, 多数患者在就诊时已经到了癌症中晚期或晚期。因此, 寻找灵敏度和特异度比较高的胃癌肿瘤标志物, 从而提高胃癌的早期诊断率非常有必要。

作者简介: 张筱东 (1984-), 男, 硕士, 主管检验师, 执业医师, E-mail: 411733157@qq.com。

通讯作者: 谢星星 (1982-), 男, 主管检验师, 副主任医师, E-mail: 548411302@qq.com。



微RNA或microRNA(miRNA)是一类长度为21~23个碱基的非编码小RNA分子,他们的表达水平在多种癌症出现异常,并在不同肿瘤中呈差异表达,miRNA目前被认为是可用于诊断恶性肿瘤的一种比较好的生物标志物。研究发现,胃癌患者的miRNA miR-221和miR-378表达水平均升高,对胃癌具有潜在诊断意义<sup>[2]</sup>。外泌体(exosome)是近年来发现的一种大小为30~150 nm的微囊泡,由细胞分泌并在血液中循环,囊泡中携带着多种生物信息分子,如mRNA, miRNA, linRNA和DNA片段等,这些信息分子往往与癌症发生、侵袭和转移相关,通过检测外泌体内容物中的特定信息分子对恶性肿瘤进行辅助诊断,在最近几年备受重视<sup>[3]</sup>。本文研究了血清外泌体中miR-221和miR-378的联合检测对诊断胃癌的应用价值,报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2017年1月~2020年1月在延安市人民医院就诊且经病理检查确诊的胃癌患者92例为胃癌组,其中男性53例,女性39例,年龄46~81岁。根据美国癌症联盟委员会第7版胃癌肿瘤TNM标准进行分期,其中I期16例,II期21例,III期45例,IV期10例。按分化程度分,分为低分化65例,中、高分化27例。纳入标准:患者经过胃镜检查 and 活检确诊为胃癌,患者同意并签署知情同意书。排除标准:并发有其他肿瘤,自身免疫性疾病/血液疾病,并发感染性疾病如肝炎、结核等,临床资料不完整。选择同期在我院诊断为胃息肉的患者68例为胃息肉对照组,男性40例,女性28例,年龄46~81岁。选择同期我院健康体检者50例为健康对照组,男性29例,女性21例,年龄46~81岁。以上三组的年龄和性别等一般资料匹配。

1.2 仪器与试剂 血清外泌体的提取采用日本SBI公司ExoQuick-TM外泌体提取试剂,血清外泌体颗粒浓度用英国Malvern公司Nanosight试剂检测,Western Blot检测用的兔抗calnexin, CD9, CD63和TSG101蛋白一抗购自Abcam上海贸易有限公司,羊抗兔二抗购自碧云天杭州生物科技有限公司, RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, miRNA逆转录和定量测定分析用德国QIAGEN公司的mirVana试剂盒。

## 1.3 研究方法

1.3.1 血液标本采集:患者于确诊入院后2周内进行采血,清晨空腹取静脉血10 ml, 4℃静置30 min, 1 800 r/min离心20 min, 弃上清, 置-80℃冰箱保存。

1.3.2 外泌体提取鉴定:血清外泌体的提取严格按照SBI公司ExoQuick-TM外泌体提取试剂盒的说

明进行操作。外泌体鉴定用Western Blot检测外泌体表面4种蛋白标志物(calnexin, CD9, CD63和TSG101蛋白)的表达水平。血清外泌体颗粒浓度检测用Nanosight法,将样品稀释50 000~20 000倍,使样品中颗粒浓度为 $10^7/\text{ml}$ ~ $10^9/\text{ml}$ , Nanosight检测参数不变、阈值设定为5。

1.3.3 外泌体miRNA定量测定:外泌体中miRNA的定量测定,先用RNA提取试剂提取外泌体总RNA,再用mirVana试剂以实时荧光定量PCR(RTqPCR)对miRNA进行逆转录和定量测定分析。按照miR-221和miR-378在GeneBank中的序列号,用Premier Primer 5.0软件进行引物序列设计。RTqPCR的总反应体系为25  $\mu\text{l}$ , 预变性95℃ 10 min, 反应条件95℃ 5s, 60℃ 60s, 反应40个循环。用ABI7700软件采集荧光信号做溶解曲线分析,每样品3个复孔,进行绝对定量测定分析。用化学合成的1 mol/L miRNA, 稀释成不同浓度作为标准品( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  fmol/L), 以每个浓度的对数值为X轴, 以每个浓度相对应的Ct值为Y轴, 绘制标准曲线。用标准曲线根据所测得的Ct值计算miR-221和miR-378的绝对浓度。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件做统计学分析。实验结果计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),在此之后用LSD做两两比较分析,用ROC曲线评估miR-221和miR-378联合检验在胃癌诊断中的效能,率的比较用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 外泌体鉴定 血清外泌体标本经Western Blot分析鉴定,结果显示,来自胃癌组、胃息肉组和健康组的血清外泌体标本的Calnexin, CD63, CD93和TSG101这4种外泌体标志蛋白均呈高表达,而来自相应组细胞裂解物的这4种标志性蛋白均呈低表达。Nanosight颗粒浓度检测结果显示,标本中含有大量的直径为30~100 nm的细胞外微囊泡颗粒。故认为所获得的血清外泌体标本中确实含有外泌体。

2.2 外泌体miR-221和miR-378定量检测 见表1。血清外泌体标本中miR-221和miR-378水平用RTqPCR进行定量检测,检测结果经ANOVA分析发现各组均数之间的差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。进一步用LSD做两两比较分析,结果显示,血清外泌体miR-221和miR-378水平在胃癌组和健康对照组( $F=10.986$ ,  $10.721$ )之间、在胃癌组和胃息肉组( $F=7.112$ ,  $7.238$ )之间以及在胃息肉组和健康对照组( $F=3.863$ ,  $3.579$ )之间差异

均有显著性统计学意义(均  $P < 0.01$ ), 胃癌组高于健康对照组并高于胃息肉组、胃息肉组高于健康对照组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。

表1 三组间血清外泌体 miR-221 和 miR-378

水平 ( $\bar{x} \pm s$ ) 比较

检测项目 (fmol/L)	胃癌组 (n=92)	胃息肉组 (n=68)	健康组 (n=50)	P
miR-221	197.62 ± 27.88	114.70 ± 20.54	54.49 ± 13.75	< 0.01
miR-378	189.44 ± 25.36	101.39 ± 17.28	47.65 ± 13.09	< 0.01

2.3 外泌体 miR-221 与 miR-378 联合检测的诊断效能评价 见表2和表3。用ROC曲线分析比较外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和健康对照组诊断效能的数据显示, miR-221

的曲线下面积为 0.689, miR-378 的曲线下面积为 0.657, 联合检测 miR-221 和 miR-378 的曲线下面积为 0.776, 联合检测的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值均明显高于单独检测, 差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。用ROC曲线下面积分析比较 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和胃息肉组诊断效能的数据显示, miR-221 的曲线下面积为 0.681, miR-378 的曲线下面积为 0.672, 联合检测 miR-221 和 miR-378 的曲线下面积为 0.755, 联合检测的特异度、灵敏度、诊断符合率以及阴性预测值都明显高于单独检测, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。以上结果说明, 外泌体 miR-221 与 miR-378 联合检测对胃癌的诊断价值高于单独检测。

表2 外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和健康组诊断效能的 ROC 曲线分析

检测项目	ROC 曲线下面积	检测特异度 (%)	检测灵敏度 (%)	诊断符合率 (%)	阴性预测值	阳性预测值
miR-221	0.689	66.61	79.33	80.02	0.685	0.717
miR-378	0.657	65.37	77.08	78.99	0.611	0.793
miR-221 与 miR-378 联合	0.776	88.23	91.55	90.17	0.862	0.939

表3 外泌体 miR-221 与 miR-378 单独检测和联合检测对胃癌组和胃息肉组诊断效能的 ROC 曲线分析

检测项目	ROC 曲线下面积	检测特异度 (%)	检测灵敏度 (%)	诊断符合率 (%)	阴性预测值	阳性预测值
miR-221	0.681	69.66	82.54	82.12	0.692	0.751
miR-378	0.672	60.53	79.89	79.64	0.603	0.834
miR-221 与 miR-378 联合	0.755	90.07	94.36	93.12	0.895	0.926

### 3 讨论

外泌体是细胞形成和分泌的一种具有脂质双层的膜性微囊泡, 囊泡中包含有多种类型的小分子 RNA, DNA 片段和蛋白质等生物信息分子。外泌体的直径介于 30~100 nm, 密度为 1.11~1.19 g/ml<sup>[3]</sup>。几乎所有类型的细胞在正常和病理情况下均能形成和分泌外泌体, 其形成过程包括细胞内内体颗粒的膜内陷形成多囊泡体, 多囊泡体外膜与细胞膜融合后其中的囊泡被释放到胞外即为外泌体。外泌体广泛存在于血液循环、唾液、尿液、羊水和母乳中, 在细胞间交流或信息传递、细胞增殖分化和免疫调节等多种过程中发挥重要的作用, 并参与了心血管、消化、神经、免疫等疾病和肿瘤发生发展的过程, 检测外泌体及其成分有望成为一种新的疾病诊断方法或辅助诊断方法<sup>[4]</sup>。

为保证外泌体和其他细胞外微囊泡研究的可信度与重复性, 国际细胞外囊泡协会制定了最低要求的国际研究指南。外泌体的鉴定主要包括形态学特征、浓度和 / 或直径大小、表面蛋白分子鉴定等<sup>[5-6]</sup>。我们的研究中, 外泌体鉴定用 Western Blot 检测了外泌体表面 4 种蛋白标志物 (calnexin,

CD9, CD63 和 TSG101 蛋白) 的表达水平, 用 Nanosight 法检测了外泌体的颗粒浓度, 所用的方法和指标数均符合国际细胞外囊泡协会的要求。

基于外泌体检测的临床诊断大多聚焦于外泌体内容物的检测。外泌体核酸内容物的检测研究, 多采用二代测序技术、杂交芯片技术和实时荧光定量 PCR (RTqPCR) 或液滴数字 PCR 技术<sup>[5-6]</sup>。我们的研究, 用 RTqPCR 技术定量检测了来自胃癌患者、胃息肉患者和健康体检者的血清外泌体标本中的两种 microRNA, miR-221 和 miR-378 的水平。

MicroRNA 是一类由细胞基因组编码的长度约为 22bp 的非编码单链小 RNA 分子, 广泛存在于各种真核生物, 参与转录后水平的基因表达调控。迄今, 已经报道了约 3 万种 miRNA 分子在不同动植物中存在, 在人类中, 已发现的约有 2 600 种。在病理方面, miRNA 可以参与调控癌基因和抑癌基因的表达, 因而在肿瘤发生发展中起着重要作用。miRNA 在多种肿瘤患者的血清 / 血浆和组织液中以非常稳定的形式存在, 被认为是一种新的实用的肿瘤生物标志物, 在多种肿瘤包括胃癌的诊断方面有很好的应用前景。

在我国已有不少关于胃癌 miRNA 研究的报道<sup>[7-9]</sup>。LIU 等<sup>[10]</sup>用全基因组 miRNA 微阵列技术研究发现,胃癌患者血浆中 miR-378, miR-371-5p 和 miR-187 表达水平升高,其中 miR-378 在胃癌早期即表达升高。SONG 等<sup>[11]</sup>的研究发现,胃癌患者血浆 miR-221, miR-744 以及 miR-376c 的表达水平升高。ZHANG 等<sup>[12]</sup>的研究发现,miR-214 的表达在胃癌组织和患者血浆中均显著升高,其血浆水平在患者术后从第 14 天至第 30 天呈进行性下降。LI 等<sup>[13]</sup>发现,miR-17-92 在胃癌患者中的表达上调。因此,以上 miRNA 均可作为胃癌辅助性诊断的生物标志,联合检测则更有意义<sup>[14-16]</sup>。我们选择了 miR-221 和 miR-378,研究了血清外泌体中这两种 miRNA 联合检测用于诊断胃癌的价值,结果显示,血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平联合检测对诊断胃癌有一定的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] FU Zhaoying, HAN Xiaodong, DU Juan, et al. Euphorbia lunulata extract acts on multidrug resistant gastric cancer cells to inhibit cell proliferation, migration and invasion, arrest cell cycle progression, and induce apoptosis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 212: 8-17.
- [2] 贾晶莹, 本巴吉, 韩军, 等. miRNA 在胃癌诊疗中的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26 ( 17 ) : 3421-3428. JIA Jingying, BEN Baji, HAN Jun, et al. Research progress of miRNA in diagnosis and treatment of gastric cancer [J]. Medical Recapitulate, 2020, 26 ( 17 ) : 3421-3428.
- [3] LEBLEU V S, KALLURI R. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer[J]. Trends in Cancer, 2020, 6(9): 767-774.
- [4] HU Qian, SU Hang, LI Juan, et al. Clinical applications of exosome membrane proteins [J]. Precision Clinical Medicine, 2020, 3(1):54-66.
- [5] DILSIZ N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer[J]. Future Science OA, 2020, 6(4): FSO465.
- [6] 蒲双双. 外泌体的提取、鉴定和保存方法研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5):157-160. PU Shuangshuang. Research progress in isolation, identification and preservation of exosomes [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5):157-160.
- [7] 朱萌, 张宁, 卢新兰, 等. 肿瘤源性外泌体 miR-106a 调控间皮细胞 Smad7 表达影响胃癌腹膜转移 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2020, 41(3):340-346. ZHU Meng, ZHANG Ning, LU Xinlan, et al. Regulatory effect of tumor-derived exosomal miR-106a on Smad7's expression in mesothelial cells to promote the peritoneal metastasis of gastric cancer[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2020, 41(3):340-346.
- [8] 王文博, 韩肖肖, 符兆英, 等. 乳浆大戟增加多药耐药胃癌细胞对化疗药敏感性的研究 [J]. 延安大学学报 (医学科学版), 2017, 15(4):1-6. WANG Wenbo, HAN Xiaoxiao, FU Zhaoying, et al. Euphorbia esula increased the sensitivity of multidrug resistant gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs[J]. Journal of Yan'an University(Medical Sciences), 2017, 15(4):1-6.
- [9] 刘维帅, 郭晓宁, 杨洋, 等. 胃癌病理类型及临床预后与血清 miR-133a 和 DKK-1 相关性分析 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49 ( 6 ) : 751-754. LIU Weishuai, GUO Xiaoning, YANG Yang, et al. Correlation of pathological types and clinical prognosis of gastric cancer with serum miR-133a and DKK-1 [J]. Shaanxi Medical Journal, 2020, 49(6):751-754.
- [10] LIU Hanshao, ZHU Lin, LIU Bingya, et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer[J]. Cancer Letters, 2012, 316(2): 196-203.
- [11] SONG Mingyang, PAN Kaifeng, SU Huijuan, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33608.
- [12] ZHANG Kecheng, XI Hongqing, CUI Jianxin, et al. Hemolysis-free plasma miR-214 as novel biomarker of gastric cancer and is correlated with distant metastasis[J]. American Journal of Cancer Research, 2015, 5(2): 821-829.
- [13] LI Hong, WU Qiong, LI Ting, et al. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review[J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45060-45071.
- [14] GUO Xianli, HAN Xiaodong, TIAN Ziwei, et al. Full extract of euphorbia esula reversed chemoresistance, inhibited cell migration/invasion, and induced apoptosis of multidrug-resistant SGC7901/VCR cells [J]. Phcog Mag, 2018, 14(56):411-417.
- [15] 洪宏, 袁建芬, 喻海忠. 乳腺癌患者血清 miR-765, miR-200b 水平检测及与临床病理学相关研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6):55-58. HONG Hong, YUAN Jianfen, YU Haizhong. Detection of serum miR-765 and miR-200b levels in breast cancer patients and its correlation with clinicopathology[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(6):55-58.
- [16] 黄刚, 陈霏, 肇玉博, 等. 非小细胞肺癌患者血浆 miRNA-145 和 miRNA-221 表达与临床特征及术后复发的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34 ( 4 ) : 40-44. HUANG Gang, CHEN Fei, ZHAO Yubo, et al. Study on the correlation between the expression of microRNA145 and microRNA221 in plasma and clinical characteristics and postoperative recurrence in patients with non-small cell lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4):40-44.

收稿日期: 2020-06-18

修回日期: 2020-07-22



# 诱导痰 Galectin-3BP 及相关炎症因子水平检测在中性粒细胞型哮喘诊断中的价值

刘敏, 李承红, 刘双, 王小江, 钟金男, 石奕

(江汉大学附属医院武汉市第六医院呼吸内科, 武汉 430015)

**摘要:**目的 探讨诱导痰半乳糖凝集素-3结合蛋白(Galectin-3BP)及相关炎症因子水平检测在中性粒细胞型哮喘诊断中的价值。方法 选择2018年10月~2019年6月江汉大学附属医院呼吸与危重症医学科收治的65例哮喘患者为研究对象,其中中性粒细胞型哮喘组(NA)27例,嗜酸粒细胞型哮喘组(EA)38例,ELISA法检测两组患者诱导痰Galectin-3BP的表达水平,并分析Galectin-3BP与诱导痰炎症细胞及炎症因子的相关性。结果 NA组诱导痰Galectin-3BP水平与EA组比较( $102.86 \pm 24.08\text{ng/ml}$  vs  $64.02 \pm 18.93\text{ng/ml}$ ),差异有统计学意义( $t=47.314, P<0.05$ )。直线相关分析显示诱导痰Galectin-3BP与IL-1 $\beta$ , IL-6和IL-8均呈正相关( $r=0.670, 0.632$ 和 $0.651$ ,均 $P<0.001$ ),与诱导痰中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞数均呈正相关( $r=0.475, 0.461$ 和 $0.454$ ,均 $P<0.05$ ),与嗜酸性粒细胞数无明显相关性( $r=-0.219, P>0.05$ )。结论 诱导痰Galectin-3BP在NA患者中高表达,且与中性粒细胞相关炎症因子呈正相关,可作为NA的生物标志物。

**关键词:** 诱导痰;半乳糖凝集素-3结合蛋白;中性粒细胞型哮喘

中图分类号: R562.25; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-056-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.014

## Value of Induced Sputum Galectin-3BP and Related Inflammatory Factors in the Diagnosis of Neutrophil Asthma

LIU Min, LI Cheng-hong, LIU Shuang, WANG Xiao-jiang, ZHONG Jin-nan, SHI Yi

(Department of Respiratory Medicine, Wuhan No.6 Hospital, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430015, China)

**Abstract: Objective** To investigate the value of induced sputum galectin-3BP and related inflammatory factors in the diagnosis of neutrophil asthma. **Methods** 65 cases of patients with asthma from Respiratory Medicine of Wuhan No.6 Hospital Affiliated to Jiangnan University from October 2018 to June 2019 were selected, including 27 neutrophilic cases and 36 eosinophilic cases. The concentrations of Galectin-3BP and inflammatory cytokines in sputum were measured by ELISA. The correlations among Galectin-3BP and airway inflammation were analyzed. **Results** Sputum Galectin-3BP was increased in NA compared with EA ( $102.86 \pm 24.08\text{ng/ml}$  vs  $64.02 \pm 18.93\text{ng/ml}$ ), the differences were statistically significant ( $t=47.314, P<0.05$ ). Galectin-3BP was significantly positively associated with IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 ( $r=0.670, 0.632, 0.651$ , all  $P<0.001$ ), and positively associated with neutrophils, macrophages and lymphocytes ( $r=0.475, 0.461, 0.454$ , all  $P<0.05$ ), while there was no significant correlation with eosinophil number ( $r=-0.219, P>0.05$ ). **Conclusion** Induced sputum Galectin-3BP was highly expressed in NA patients, which is positively correlated to neutrophil-associated inflammatory factors and can be used as a biomarker for NA.

**Keywords:** induced sputum; galectin-3BP; neutrophilic asthma

支气管哮喘(以下简称哮喘)是多种炎性细胞和炎性介质参与的慢性气道炎症性疾病。哮喘的异质性决定哮喘个体间存在不同的气道炎症表型。目前嗜酸粒细胞型哮喘(eosinophilic asthma, EA)得到了广泛的研究。近来研究表明高达50%的哮喘患者为中性粒细胞型哮喘(neutrophilic asthma, NA),对激素治疗反应差<sup>[1]</sup>。半乳糖凝集素-3结合蛋白(galectin-3BP)参与调节细胞黏附、凋亡、

炎性反应、肿瘤转移等许多生理病理过程<sup>[2]</sup>。近年来有证据显示Galectin-3BP在哮喘的发病机制中发挥重要作用,但在NA中的作用尚未见报道<sup>[3]</sup>。诱导痰较外周血能更好地反映气道炎症的本质,本研究拟通过观察NA患者诱导痰Galectin-3BP及相关炎症因子表达水平,探讨其在NA诊断中的价值。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2018年10月~2019年6月

作者简介:刘敏(1986-),女,博士在读,主治医师,研究方向:慢性气道炎症性疾病, E-mail: 714882770@qq.com。

通讯作者:李承红, E-mail: 15827636399@163.com。

江汉大学附属医院呼吸与危重症医学科收治的65例哮喘患者为研究对象。据诱导痰嗜酸粒细胞和中性粒细胞的百分比予以分组,分为EA组(嗜酸粒细胞 $\geq 3\%$ 且中性粒细胞 $< 61\%$ )和NA组(中性粒细胞 $\geq 61\%$ 且嗜酸粒细胞 $< 3\%$ )<sup>[5]</sup>。EA组38例,男性16例,女性22例,平均年龄 $41.41 \pm 9.26$ 岁。NA组27例,男性11例,女性16例,平均年龄 $43.38 \pm 11.53$ 岁。哮喘诊断符合我国支气管哮喘防治指南哮喘的诊断标准<sup>[4]</sup>。排除标准:①哮喘急性加重期,近4周曾全身使用糖皮质激素或吸入糖皮质激素,3天内使用抗过敏药、茶碱等药物者;②合并慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、肺炎、肺结核等其它呼吸系统疾病者;③并发淋巴瘤、白血病、恶性肿瘤、嗜酸粒细胞增高症等疾病者;④并发严重心血管疾病及肝肾功能不全者;⑤患有精神疾病、妊娠及哺乳期妇女;⑥未能完成诱导痰检查或诱导痰标本不合格者。所有受试者均获得知情同意。

## 1.2 试剂和方法

1.2.1 痰液的采集、处理:痰液的采集、质控参照中华医学会呼吸病学分会哮喘学组咳嗽的诊断与治疗指南(2015)中高渗盐水雾化诱导痰炎症细胞检测方法<sup>[6]</sup>。将收集的痰标本用0.1g/dl二硫苏糖醇(DTT)溶液裂解后过滤、离心,重悬沉淀细胞,细胞悬液予以瑞氏染色,光镜下分类计数400个有核细胞,分别计算嗜酸粒细胞(EOS)、中性粒细胞(PMN)、巨噬细胞(M $\phi$ )和淋巴细胞(LYM)

表1 两组患者诱导痰 Galect-3BP, 炎症因子及炎症细胞的比较 [ $\bar{x} \pm s$ , M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]

指标	NA(n=27)	EA(n=38)	t/Z值	P
Galect-3BP (ng/ml)	102.86 $\pm$ 24.08	64.02 $\pm$ 18.93	47.314	0.006
IL-1 $\beta$ (ng/ml)	998.03 $\pm$ 30.67	97.84 $\pm$ 20.59	87.261	<0.001
IL-6 (ng/ml)	958.82 $\pm$ 38.08	506.09 $\pm$ 32.41	34.210	0.017
IL-8 (ng/ml)	75.92 $\pm$ 14.37	11.46 $\pm$ 8.02	52.305	0.003
EOS (%)	0.38(0.14~0.53)	4.68(3.12~12.83)	82.904	<0.001
PMN (%)	81.52(70.03~93.84)	24.86(14.35~36.79)	94.035	<0.001
M $\phi$ (%)	52.14(38.01~74.52)	25.06(6.58~29.37)	38.603	0.014
LYM (%)	0.37(0.24~1.33)	0.52(0.22~1.68)	9.016	0.068

2.2 诱导痰 Galectin-3BP 与炎症因子及炎症细胞的相关性分析 诱导痰 Galectin-3BP 与 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 呈正相关( $r=0.670, P<0.001; r=0.632, P<0.001; r=0.651, P<0.001$ ),与 PMN, M $\phi$ , LYM 呈正相关( $r=0.475, P=0.018; r=0.461, P=0.026; r=0.454, P=0.031$ ),与 EOS 无明显相关性( $r=-0.219, P=0.069$ )。

## 3 讨论

NA 是按哮喘气道炎症表型分类的一种哮喘亚型,目前将诱导痰中性粒细胞计数持续(至少有2

百分比。留取上清液于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于炎症因子的检测。

1.2.2 诱导痰 Galectin-3BP 与 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-8 水平测定:采用 ELISA 法检测诱导痰上清液中 Galectin-3BP, IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-8 水平。Galectin-3BP 试剂盒购自美国 ebioscience 公司, IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-8 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司,操作过程严格按照相关试剂盒说明书。

1.3 统计学分析 用 SPSS 18.0 软件进行统计处理,正态分布的计量资料以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用两独立样本的  $t$  检验。计数资料采用  $n(\%)$  表示,率的比较采用  $\chi^2$  检验。非正态分布计量资料以中位数(四分位数间距)[M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]表示,两组间比较采用 wilcoxon 秩和检验。相关性用 Pearson 进行相关性分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组哮喘患者诱导痰 Galectin-3BP, 炎症因子及炎症细胞的比较 见表1。与 EA 组相比,NA 组诱导痰 Galectin-3BP 明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );NA 组诱导痰 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 明显高于 EA 组,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ );NA 组诱导痰 PMN, M $\phi$  计数明显高于 EA 组,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ );两组患者 LYM 计数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

次)占非鳞状细胞总数的61%~76%,或绝对计数大于 $5.0 \times 10^6/\text{ml}$ 的哮喘定义为NA<sup>[7]</sup>。NA患者存在更明显的气流受限及气道重塑,在临床上往往是重症哮喘、难治性哮喘,与激素抵抗密切相关,近年来已成为学术界关注的焦点<sup>[8-9]</sup>。Galectin-3BP 又称为 Mac-2 结合蛋白(M2BP)或90K糖蛋白,是一种细胞外基质分泌的糖基化蛋白,属于巨噬细胞清道夫受体(scavenger receptor, SR)富含半胱氨酸超家族之一,最早在人乳腺癌细胞培养液中发

现。Galectin-3BP可促进肿瘤的发生、发展、分化及转移,为肿瘤预后的生物标志物之一<sup>[2]</sup>。近年来, Galectin-3BP在病毒感染、纤维化、静脉血栓形成、自身免疫性肝病、慢性胰腺炎、支气管哮喘等炎症和炎症相关性疾病中的作用逐渐被揭示<sup>[10-13]</sup>。

KALAYCI等<sup>[3]</sup>研究发现哮喘患者外周血和肺泡灌洗液(BALF)中Galectin-3BP明显高于健康对照组,且与外周血嗜酸性粒细胞数呈负相关,进一步将Galectin-3BP与外周血单个核细胞(PBMC)共培养,发现Galectin-3BP可以诱导PBMC分泌IL-6,抑制IL-4, IL-5, IL-13等Th2相关炎症因子的转录。本研究结果显示与EA组相比,NA组诱导痰Galectin-3BP显著升高,且与PMN计数及IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8水平均呈正相关。而IL-1 $\beta$ , IL-6和IL-8具有募集、活化中性粒细胞,促进中性粒细胞与炎症部位结合的生物学功能。以上研究结果提示Galectin-3BP促进中性粒细胞性气道炎症,抑制Th2介导的嗜酸性粒细胞性气道炎症。

Galectin-3BP可能通过下列机制参与哮喘中性粒细胞性气道炎症:①通过趋化因子和黏附分子诱导中性粒细胞的募集。研究表明Galectin-3BP可以诱导MCP-1等趋化因子和ICAM-1, VCAM-1, E-selectin等黏附分子的表达,从而介导炎症细胞向炎症部位的迁移<sup>[14]</sup>。②通过激活单核巨噬细胞分泌大量炎症因子从而有效动员、募集和活化中性粒细胞,加重气道炎症。研究表明Galectin-3BP与人单核细胞系THP-1和单核细胞来源的巨噬细胞共培养,可以诱导细胞合成和分泌IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 等炎症因子,且对炎症的调控呈现出时间和浓度依赖性<sup>[14-15]</sup>。③通过活化T细胞介导获得性免疫反应参与哮喘气道炎症。POWELL等<sup>[16]</sup>发现Galectin-3BP可以刺激PBMC诱导T细胞分泌IL-1, IL-6, GM-CSF和TNF- $\alpha$ 等炎症因子,但将Galectin-3BP单独与T细胞共培养则无法诱导T细胞产生炎症因子。因此Galectin-3BP可能通过作用于单核巨噬细胞或其它效应细胞产生效应分子作为共刺激信号激活T细胞参与气道炎症反应。目前Galectin-3BP在哮喘发病机制中的作用尚不完全清楚。Galectin-3BP广泛分布于人体体液和组织器官中,在巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等多种气道炎症细胞中均有表达,其蛋白结构域的复杂性和配体的多样性可能介导多种不同的生物学效应,关于Galectin-3BP介导中性粒细胞性气道炎症的具体机制仍有待于进一步研究及证实。

综上所述,诱导痰Galectin-3BP及相关炎症因子水平检测有助于气道炎症表型的预测,可作

为NA的生物标志物,对哮喘的分型诊断、疗效观察、治疗方案调整和预后判断等具有一定的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] CHUNG Kianfan. Neutrophilic asthma: a distinct target for treatment [J]. *Lancet Respira Med*, 2016, 4(10):765-767.
- [2] NATARAJAMURTHY S H, SISTLA S, DHARMESH S M. Disruption of galectin-3 and galectin-3 binding protein (G3BP) interaction by dietary pectic polysaccharides (DPP) - Arrest of metastasis, inhibition of proliferation and induction of apoptosis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139(19):486-499.
- [3] KALAYCI O, BIRBEN E, TINARI N, et al. Role of 90K protein in asthma and TH2-type cytokine expression [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2004, 93(5):485-492.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(9):675-697. Asthma Study Group of Chinese Thoracic Society, Chinese Medical Association. Guidelines for the management and prevention of asthma(2016)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2016, 39(9):675-697.
- [5] SIMPSON J L, SCOTT R, BOYLE M J, et al. Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum [J]. *Respirology*, 2006, 11(1):54-61.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2015版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(5):323-354. Asthma Study Group of Chinese Thoracic Society, Chinese Medical Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of cough(2015)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2016, 39(5):323-354.
- [7] SCHLEICH F N, MANISE M, SELE J, et al. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation [J]. *BMC Pulm Med*, 2013, 13(1):11.
- [8] HASTIE A T, MOORE W C, MEYERS D A, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes, 2010, 125(5):1028-1036. e13.
- [9] MOORE W C, HASTIE A T, LI Xingnan, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(6):1557-1563. e5.
- [10] AYUMI I, YOSHIHIRO K, YUSUKE E, et al. Establishment of mouse Mac-2 binding protein enzyme-linked immunosorbent assay and its application for mouse chronic liver disease models [J]. *Hepatology Research*, 2017, 47(9):902-909.

(下转第128页)



# Aurora-B 激酶的表达与非小细胞肺癌患者预后及耐药的相关性分析

席俊峰<sup>1a</sup>, 彭彦才<sup>1a</sup>, 马兴聪<sup>2</sup>, 郝光军<sup>1b</sup>

(1. 榆林市第一医院 a. 胸心外科; b 肿瘤科; 陕西榆林 719000;

2. 西安交通大学第二附属医院肿瘤病院, 西安 710004)

**摘要:** **目的** 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者病理组织中 Aurora-B 激酶的表达情况, 并探讨其对患者预后的影响及与肿瘤耐药的相关性。**方法** 收集 194 例非小细胞肺癌患者肿瘤组织标本, 应用免疫组织化学方法检测 Aurora-B 激酶的表达情况。以 Log-Rank 检验比较 Aurora-B 激酶表达阳性患者与阴性患者总生存时间的差异, 采用 COX 模型探索非小细胞肺癌患者预后的影响因素; 分离患者肿瘤细胞进行耐药性诱导实验, 并通过测量 IC<sub>50</sub> 的变化初步评价细胞耐药情况。**结果** 非小细胞肺癌组织中 Aurora-B 激酶表达阳性率为 63.92% (124/194)。Aurora-B 激酶阳性患者的总生存时间低于 Aurora-B 激酶阴性患者 ( $P<0.0001$ ); COX 模型显示 Aurora-B 激酶表达 ( $HR=4.03$ , 95%CI: 1.80~9.01,  $P=0.0007$ )、肿瘤病理类型 ( $HR=2.11$ , 95%CI: 1.17~3.79,  $P=0.0357$ ) 及临床分期 ( $HR=0.42$ , 95%CI: 0.24~0.74,  $P=0.0027$ ) 是影响患者总生存时间的因素; 经过耐药性诱导, Aurora-B 激酶阳性肿瘤细胞 IC<sub>50</sub> 显著增加, 且增幅高于 Aurora-B 激酶阴性肿瘤细胞, 其差异有统计学意义 ( $P<0.0001$ )。**结论** Aurora-B 激酶在非小细胞肺癌中表达异常增高, 与患者预后呈负相关, 并与非小细胞肺癌耐药性相关, 提示 Aurora-B 激酶可能成为非小细胞肺癌预后的标志物及潜在治疗靶点。

**关键词:** 非小细胞肺癌; Aurora-B 激酶; 预后; 耐药性

**中图分类号:** R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-059-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.015

## Study on the Relationship between High Expression of Aurora-B Kinase and Drug Resistance and Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

XI Jun-feng<sup>1a</sup>, PENG Yan-cai<sup>1a</sup>, MA Xing-cong<sup>2</sup>, HAO Guang-jun<sup>1b</sup>

(1a. Cardio-Thoracic Surgery; 1b. Department of Oncology, the First Hospital of Yulin City, Shaanxi Yulin 719000, China; 2. Oncology Hospital, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of Aurora-B kinase in pathological tissues from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), reveal its influence on prognosis of NSCLC patients and the relationship between Aurora-B kinase expression and drug resistance of NSCLC. **Methods** Tumor specimens of 194 patients with NSCLC were collected. The expression of Aurora-B kinase was evaluated by immunohistochemistry. Log-Rank test was used to compare the overall survival of Aurora-B kinase positive and negative patients, and COX model was applied to assess the prognostic factors for NSCLC patients. Cellular drug resistance was simply evaluated by measuring the changes of IC<sub>50</sub> post drug resistance induction assay. **Results** The positive rate of Aurora-B expression in NSCLC was 63.92% (124/194). The overall survival of patients with positive Aurora-B kinase expression was lower than that of patients with negative Aurora-B kinase ( $P<0.0001$ ). COX model showed that expression of Aurora-B ( $HR=4.02$ , 95%CI: 1.80~9.01,  $P=0.0007$ ), tumor pathological type ( $HR=2.11$ , 95%CI: 1.17~3.79,  $P=0.0357$ ) and clinical stage ( $HR=0.42$ , 95%CI: 0.24~0.74,  $P=0.0027$ ) were the influencing factors of overall survival. After drug resistance induction, the increase of IC<sub>50</sub> in Aurora-B positive tumor cells was significantly higher than that in Aurora-B negative tumors cells ( $P<0.0001$ ). **Conclusion** Aurora-B was upregulated in NSCLC and negatively correlated to the prognosis of patients, and overexpression of Aurora-B was related to the drug resistance of NSCLC, suggesting that Aurora-B kinase may become a prognostic biomarker as well as a therapeutic target for NSCLC.

**Keywords:** non-small cell lung cancer; Aurora-B kinase; prognosis; drug resistance

在我国, 肺癌作为发病率和死亡率均位居首位的恶性肿瘤, 严重影响患者的生命健康<sup>[1]</sup>。非小细

**基金项目:** 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (项目编号 2018JM7068), 榆林市科学技术研究与开发项目 (项目编号 [2019] 185 号 -35)。

**作者简介:** 席俊峰 (1978-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌、食管癌治疗研究, E-mail: yuxijunf@163.com。

**通讯作者:** 郝光军 (1979-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肺癌、食管癌治疗研究, E-mail: haoguangjun1129@163.com。

胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的类型, 约占肺癌的 85%。NSCLC 患者的 5 年生存率仅为 15%<sup>[2-4]</sup>。目前临床上 NSCLC 治疗方法主要有化疗、放疗、手术、分子靶向治疗和免疫治疗, 但是由于耐药性和以上方法导致的毒副反应时常影响临床疗效和患者的预后。

近年来有研究表明, Aurora-B 激酶对乳腺癌、结直肠癌、肝癌等恶性肿瘤化疗耐药性的产生具有重要调控作用<sup>[5-8]</sup>, 但其在肺癌中的作用鲜有报道。本研究主要目的是通过对临床 NSCLC 组织的检测, 探究 Aurora-B 激酶在 NSCLC 组织中的表达情况及其与患者预后的相关性, 为发现 NSCLC 新的分子治疗靶点提供理论依据, 另外通过细胞培养方法分析 Aurora-B 激酶的表达与肿瘤细胞耐药性的关系。现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究选取 2006 年 2 月 ~ 2012 年 11 月榆林市第一医院收治并术后经病理检查确诊为 NSCLC 的 194 例患者为研究对象, 年龄 37~72 岁, 中位年龄 56 岁。患者均在签署知情同意后获取其临床样本、病案信息以及远期临床随访资料。本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 Aurora-B 抗体 (美国 LSBIO 公司); 紫杉醇 (四川协力制药有限公司); 顺铂 (德州德药制药有限公司); DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色检测: Aurora-B 激酶的表达: 应用常规方法进行病理组织脱蜡和水化后, 用 3%(体积分数)的过氧化氢溶液在室温下处理组织样本 10 min, 然后用 PBS 漂洗病理组织样本, 将样本浸入枸橼酸钠溶液, 水浴中加热至 95℃ ~ 100℃ 20 min。PBS 漂洗 3 次, 5 min/次。加入 10g/ml 山羊血清孵育 30 min。最后加入稀释 200× 兔抗人 Aurora-B 抗体, 37℃ 孵育 2 h。PBS 漂洗后加入二抗 37℃ 孵育 15 min。再次 PBS 漂洗后加入辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 15 min。自来水充分冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。

1.3.2 免疫组化结果判断标准: 在光学显微镜下用高倍镜 (×400) 进行观察, 随机选取每张切片中的 5 个视野, 并且每个视野计数 200 个细胞。通过观察 NSCLC 细胞核的染色情况评估 Aurora-B 激酶表达。染色阳性的判断标准: NSCLC 细胞核内出现清晰黄色或棕黄色颗粒。每张切片均由两名具有 10 年以上病理科工作经验的执业医师在双盲条件下独立阅读, 评估结果不一致时重新阅片并协商以确

定结果。本次研究中两位读片人读片结果一致率为 96.39%。

1.3.3 耐药性诱导实验: 本研究主要针对 NSCLC 治疗中的两种常用药物, 紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 和顺铂 (Cisplatin, CDDP) 进行耐药性诱导实验。随机选取 60 例 NSCLC 患者的肿瘤组织约 1.0cm<sup>3</sup> 大小尽量剔除纤维组织及黑色颗粒, 立即浸入无菌培养瓶中, 并于 10 min 内转运至实验室。在超净台上, 用无菌 PBS 液冲洗 2 次, 无菌切除组织包膜, 结缔组织与坏死组织, 剪成尽可能小的组织碎块, 大小约 1mm<sup>3</sup>。将组织小块置于 0.25g/dl 胰酶 40ml 中, 装入培养瓶, 置于 37℃ 水浴箱中 30 min, 使其充分消化, 期间在镜下观察, 当细胞变圆接近脱壁时, 弃消化液, 用 10 ml 完全 -1640 终止消化。用 200 目筛网将消化后的细胞悬液过滤收集, 用无菌 PBS 液洗涤 2 次 (离心, 1 500 r/min), 悬于 20ml 完全 -1640 中, 镜下观察细胞。于无菌离心管中依次轻轻加入 100% 及 60% 的淋巴细胞分离液各 10ml, 其上再沿管壁轻轻加入细胞悬液 (离心, 2 000 r/min, 20min), 收集 60% 分离液界面上的细胞, 加 5 倍无菌 PBS 液, 2 000r/min 离心 20 min, 去上清, 加 15 ml 无菌 PBS 液, 离心前进行细胞计数, 再次离心, 2 000r/min, 20min, 去上清, 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/ml~2×10<sup>5</sup>/ml。后经免疫组化染色确认, 其中 Aurora-B 激酶表达阳性患者 41 例, Aurora-B 激酶表达阴性患者 19 例。

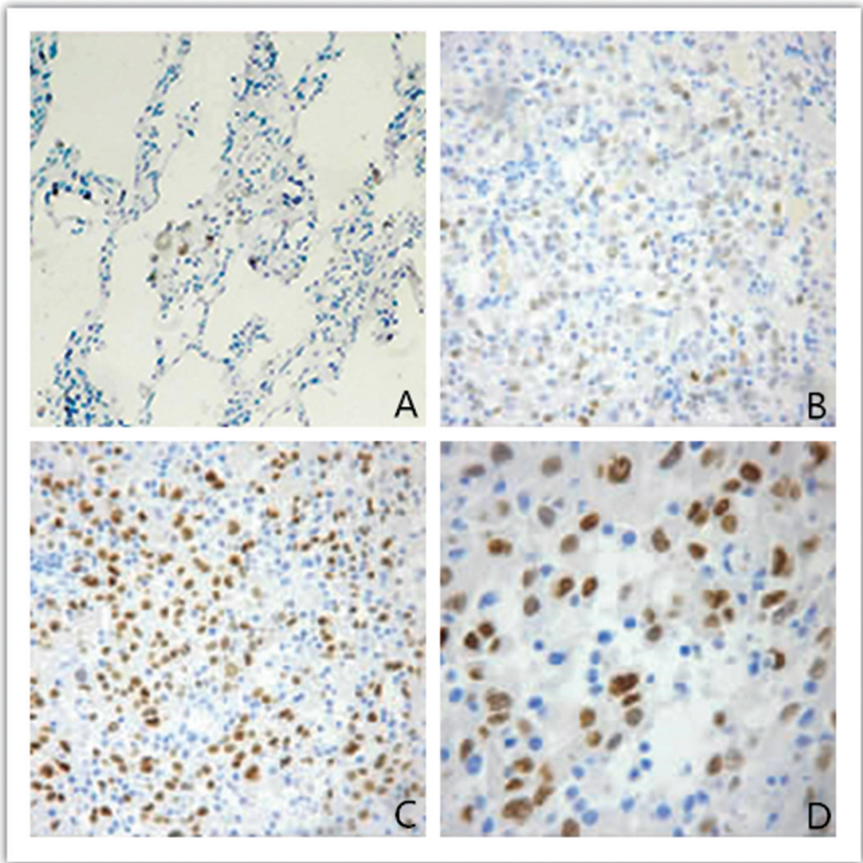
首先将 1×10<sup>4</sup> 个肿瘤细胞置于 96 孔板中吸附 6 h, 然后加入浓度梯度依次为 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μmol/L 的 PTX 和 CDDP, 孵育 72 h。MTT 实验法测定细胞增殖并计算 IC50 值。耐药性诱导实验以 IC50 值为诱导浓度, 在细胞中加入浓度梯度 (0~100 μmol/L) 的 PTX 和 CDDP 后孵育 72 h, 通过 MTT 实验法确定耐药性诱导后的 IC50 值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析。采用  $\chi^2$  检验分析分类资料组间差异, 定量资料采用两独立样本 *t* 检验比较组间差异。采用 Log-Rank 检验比较患者生存时间的组间差异并绘制 K-M 生存曲线。应用 COX 模型分析影响患者预后的因素。本研究中 I 类错误控制水平  $\alpha$  取值为 0.05,  $P<0.05$  时为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的相关性 见图 1 A~D。Aurora-B 激酶表达于 NSCLC 细胞核中, 阳性颗粒染色清晰、对比度强且阳性细胞核较大, 见表 1。Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者的组织类型和临床分期显著相关,

并且其差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。



A. 正常肺组织 (200 倍); B. 弱阳性表达 (200 倍); C. 强阳性表达 (200 倍); D. 强阳性表达 (400 倍)

图 1 Aurora-B 蛋白在非小细胞肺癌组织中表达情况

表 1 Aurora-B 激酶表达与患者临床病理特征的关系 [n(%)]					
临床病理特征	总数	Aurora-B 表达		$\chi^2$	P
		阴性	阳性		
总数	194	70(36.08)	124(63.92)	-	-
年龄 (岁) $\leq 60$	118	46(38.98)	72(61.02)	1.098 8	0.294 5
$> 60$	76	24(31.58)	52(68.42)		
性别 男	158	58(36.71)	100(63.29)	0.144 9	0.703 5
女	36	12(33.33)	24(66.67)		
组织类型 鳞癌	102	27(26.47)	75(73.53)	8.616 2	0.003 3
腺癌及其他类型	92	43(46.74)	49(53.26)		
分化程度 高	21	9(42.86)	12(57.14)	0.468 6	0.493 6
中、低	173	61(35.26)	112(64.74)		
临床分期 I 期	61	40(65.57)	21(34.43)	33.554 5	<0.000 1
II, III 期	133	30(22.56)	103(77.44)		

2.2 Aurora-B 激酶的表达与 NSCLC 患者预后的关系 见图 2。Log-Rank 检验结果提示 Aurora-B 激酶阳性患者较 Aurora-B 激酶阴性患者的总体生存率缩短，并且其差异具有统计学意义 ( $P<0.000 1$ )。

应用 COX 回归模型对 NSCLC 患者的生存时

间进行单因素分析，结果见表 2。Aurora-B 激酶表达、病理组织类型和临床分期是 NSCLC 患者生存时间的影响因素。多因素分析结果见表 3。Aurora-B 激酶表达、病理组织类型和临床分期均可显著影响 NSCLC 患者的生存时间。其差异均具有统计学意



义 (均  $P < 0.05$ )。

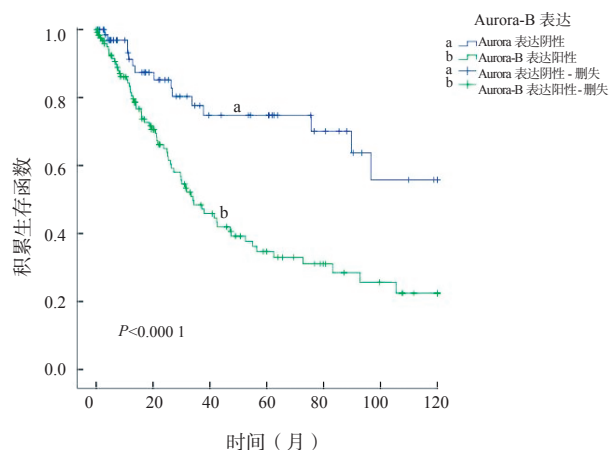


图2 不同 Aurora-B 激酶表达情况患者 K-M 生存曲线  
2.3 非小细胞肺癌患者 Aurora-B 激酶与肿瘤细胞耐药的相关性 见图2。Aurora-B 激酶阳性的

表2 NSCLC 患者生存时间的单因素分析

因素	HR 估计值	95%CI	$\chi^2$	P
Aurora-B 激酶表达 (表达阴性为对照)	5.40	1.63~17.87	7.615 8	0.005 8
年龄 (岁, 60 岁以上为对照)	0.82	0.37~1.79	0.493 8	0.483 2
性别 (女性为对照)	1.28	0.64~2.57	0.250 4	0.616 8
病理组织类型 (腺癌及其他类型为对照)	2.19	1.05~4.54	4.412 6	0.035 7
分化程度 (中、低为对照)	1.22	0.59~2.51	0.280 8	0.596 2
临床分期 (II, III 期为对照)	0.50	0.25~0.89	3.896 1	0.048 4

表3 NSCLC 患者生存时间的多因素分析

因素	HR 估计值	95%CI	$\chi^2$	P
Aurora-B 激酶表达	4.03	1.80~9.01	11.520 9	0.000 7
病理组织类型 (腺癌及其他类型为对照)	2.11	1.17~3.79	6.200 9	0.035 7
临床分期 (II, III 期为对照)	0.42	0.24~0.74	9.027 8	0.002 7

表4 NSCLC 患者 Aurora-B 激酶表达与耐药的相关性

药物名称	组别	n	IC50	95%CI	组内比较 t 值	P 值	组间比较 t 值	P 值
CDDP	Aurora-B 阴性	19	15.72 ± 3.94	14.78~16.66	33.3691	<0.0001	-13.748 03*	<0.000 01
	Aurora-B 阳性	41	28.53 ± 8.95	26.94~30.12	35.5024	<0.0001		
PTX	Aurora-B 阴性	19	7.05 ± 8.86	4.94~9.16	6.6587	<0.0001	-5.827 03*	<0.000 01
	Aurora-B 阳性	41	15.89 ± 12.10	13.74~18.04	14.6302	<0.0001		

注: \*t' 检验。

已有研究证实 Aurora-A 激酶与人多种实体瘤的发生发展密切相关。而关于 Aurora-B 激酶的研究较少。有研究显示, Aurora-B 激酶在胶质瘤细胞、胃癌细胞、宫颈癌细胞中存在高表达, 并且肿瘤细胞染色体出现成倍增长<sup>[11-13]</sup>。本研究发现, 在非小细胞肺癌细胞中 Aurora-B 激酶存在过表达情况, 并且 Aurora-B 激酶异常表达与患者的预后显著相关。生存分析结果显示 Aurora-B 激酶表达阳性是患者预后的重要影响因素。

本次研究还对 Aurora-B 激酶与 CDDP 和 PTX

NSCLC 患者经 CDDP 和 PTX 耐药性诱导后 IC50 值显著升高, 并且差异具有统计学意义 ( $P < 0.000 1$ )。

### 3 讨论

Aurora 激酶家族都有相似的催化结构区域<sup>[9]</sup>, 主要由较短的 C 末端尾部及长度可以不断变化的 N 末端防守侧翼。Aurora-B 激酶可于着丝粒内蛋白 (inner centromere protein, INCENP) 和存活素 (survivin) 共同组成染色体过客蛋白, 并在中心体成熟、分裂、纺锤体组装和稳定等细胞生理过程中起重要作用。染色体过客蛋白在细胞分裂早期随染色体定位, 在中期向内部着丝粒区域聚集, 后期则离开染色体并移动至中心纺锤体。整个过程要求染色体过客蛋白的各组成部分有准确的定位, 一旦任何组成成员缺失或者 Aurora-B 激酶活性不足都能造成定位错误和整体结构不稳定<sup>[10]</sup>, 最终导致细胞分离异常。

耐药间的关系进行了研究。研究结果提示 Aurora-B 的过度表达与肿瘤细胞对 CDDP 及 PTX 的耐药存在相关关系, 此研究结论与其他实体瘤化疗耐药性研究如卵巢浆液性癌, 乳腺癌中所发现 Aurora-B 与化疗药物耐药性存在相关性的结论一致。在正常情况下, 细胞分裂的过程会触发 p53 的活化以及下游修复和凋亡通路, 清除处于异常增殖状态的细胞。然而, 在 Aurora-B 过表达的情况下, p53 的大部分受到泛素介导的蛋白降解, 这进一步降低了 p21 和 BAX 的表达<sup>[14]</sup>。BAX 是一种促凋亡因子, p21 是

DNA 损伤的应答物, 通过在 G1/S 期阻滞细胞周期, 激活细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。p21 和 BAX 的缺失使 DNA 损伤和染色体数目异常的细胞绕过增殖异常细胞检查及清除过程, 避开损伤修复, 最终影响针对癌细胞 DNA 和细胞周期的药物疗效, 导致耐药<sup>[16]</sup>。

综上, 本研究结果表明, Aurora-B 激酶的过度表达与非小细胞肺癌的病理生理过程密切相关, Aurora-B 激酶可能参与了非小细胞肺癌的发生及恶性进展, 与患者不良预后及耐药相关。以上结论提示 Aurora-B 可能是非小细胞肺癌的新标志物及潜在治疗靶点。后续我们拟从 RNA 水平验证上述结论, 并利用细胞学、分子生物学及形态学等研究方法进一步探究 Aurora-B 激酶对肿瘤生物学行为的影响及其作用机制。

#### 参考文献:

- [1] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2015, 24 (1): 1-10. CHEN Wanqing, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. China Cancer, 2015, 24(1): 1-10.
- [2] 张慧颖, 高全立. 非小细胞肺癌免疫治疗研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(3): 218-222. ZHANG Huiying, GAO Quanli. The research progression of immunotherapy for non-small-cell lung cancer [J]. International Journal of Immunology, 2014, 37(3): 218-222.
- [3] 廖晓宁, 罗彪, 张倬彬, 等. 非小细胞肺癌放射治疗研究进展 [J]. 医药前沿, 2017, 7(6): 6-7. LIAO Xiaoning, LUO Biao, ZHANG Zhuobin, et al. Non-small cell lung cancer radiotherapy were reviewed [J]. Journal of Frontiers of Medicine, 2017, 7(6): 6-7.
- [4] 金静思, 贺巾钊, 周黎明, 等. 非小细胞肺癌分子靶向治疗药物的现状及进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(17): 881-885. JIN Jingsi, HE Jinzhao, ZHOU Liming, et al. The progress of molecular-targeted therapeutic drugs in non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2015, 42(17): 881-885.
- [5] HUMBERTO PÉREZ-OLAIS J, RUIZ-JIMÉNEZ F, CALDERÓN-GARCÍA E J, et al. The activity of Aurora kinase B is required for dengue virus release [J]. Virus Research, 2019, 274: 197777.
- [6] ALAFATE W, WANG Maode, ZUO Jie, et al. Targeting aurora kinase B attenuates chemoresistance in glioblastoma via a synergistic manner with temozolomide [J]. Pathology Research and Practice, 2019, 215(11): 152617.
- [7] DING Lidan, YANG Liu, HE Yuqi, et al. CREPT/RPRDIB associates with aurora B to regulate cyclin B1 expression for accelerating the G2/M transition in gastric cancer [J]. Cell Death & Disease, 2018, P(12): 1172.
- [8] CICENAS J. The Aurora kinase inhibitors in cancer research and therapy [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2016, 142(9): 1995-2012.
- [9] TANG Anqun, GAO Keyu, CHU Laili, et al. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23937-23954.
- [10] WILLIAMS M M, MATHISON A J, CHRISTENSEN T, et al. Aurora kinase B-phosphorylated HP1  $\alpha$  functions in chromosomal instability [J]. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2019, 18(12): 1-15.
- [11] HETLAND T E, NYMOEN D A, HOLTH A, et al. Aurora B expression in metastatic effusions from advanced-stage ovarian serous carcinoma is predictive of intrinsic chemotherapy resistance [J]. Human Pathology, 2013, 44(5): 777-785.
- [12] YOON M J, PARK S S, KANG Youjung, et al. Aurora B confers cancer cell resistance to TRAIL-induced apoptosis via phosphorylation of survivin [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(3): 492-500.
- [13] GRUNDY M, SEEDHOUSE C, RUSSELL N H, et al. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the Aurora-B Kinase Inhibitor barasertib-hQPA [J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 254.
- [14] GULLY C P, VELAZQUEZ-TORRES G, SHIN J H, et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(24): 9323-9323.
- [15] MATSUMOTO M, NAKAJIMA W, SEIKE M, et al. Cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 473(2): 490-496.
- [16] GUPTA S, SILVEIRA D A, MOMBACH J C M. ATM/miR-34a-5p axis regulates a p21-dependent senescence-apoptosis switch in non-small cell lung cancer: a Boolean model of G1/s checkpoint regulation [J]. FEBS Letters, 2020, 594(2): 227-239.

收稿日期: 2019-12-12

修回日期: 2020-10-13

欢迎来稿

欢迎订阅

# 急性冠状动脉综合征 (ACS) 患者血清 miR-186-5p, miR-23 和 miR-652 水平检测的临床意义

赵 莉, 白延平, 谢国媛 (延安大学附属医院, 陕西延安 716000)

**摘要:** **目的** 探讨急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者血清 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平检测的临床意义。**方法** 选择 2016 年 1 月~2018 年 1 月在延安大学附属医院行经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 手术的 ACS 患者 68 例作为观察组, 另外选取同期做冠脉造影符合冠心病诊断, 但排除 ACS 的患者 68 例作为对照组。收集两组受试对象外周血, 检测血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平, 并进行相关性分析。绘制 ROC 曲线分析 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 单个指标及联合使用诊断 ACS 的临床价值。**结果** 与对照组比较, 观察组患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平均提高, 差异有统计学意义 ( $Z=3.312\sim6.451$ , 均  $P<0.05$ )。不同病变支数的 ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 的水平比较不全相同, 差异有统计学意义 ( $F=6.017\sim8.151$ , 均  $P<0.05$ )。与术前比较, 术后患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $Z=2.090\sim3.036$ , 均  $P<0.05$ )。ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平与 cTnI 呈显著相关 ( $r=0.689, 0.779, 0.746$ , 均  $P=0.000$ )。其临界值、AUC, 灵敏度和特异度, miR-186-5p 依次为 0.110, 0.775, 61.8% 和 91.2%; miR-23b 依次为 0.133, 0.799, 69.1% 和 88.2%; miR-652 依次为 0.164, 0.789, 67.6% 和 91.2%。三者联用 AUC, 灵敏度和特异度分别为 0.941, 91.2% 和 83.8%。cTnI 的 AUC 灵敏度和特异度分别为 0.857, 76.5% 和 79.4%。miRNAs 联合 AUC 显著高于 cTnI ( $Z=2.243, P<0.05$ )。**结论** ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 和 miR-652 水平升高, 联合使用诊断 ACS 具有一定的临床价值。

**关键词:** 急性冠状动脉综合征; miR-186-5p; miR-23b; miR-652; 诊断价值

**中图分类号:** R543.3; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-064-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.016

## Clinical Value of Serum miR-186-5p, miR-23b and miR-652 Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome (ACS)

ZHAO Li, BAI Yan-ping, XIE Yuan-yuan (Affiliated Hospital of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

**Abstract: Objective** To investigate diagnostic value of serum miR-186-5p, miR-23b and miR-652 levels in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** 68 ACS patients who underwent percutaneous coronary intervention (PCI) in the Affiliated Hospital of Yan'an University from January 2016 to January 2018 were selected as the observation group, and 68 ACS patients who were admitted for coronary angiography during the same period were selected as the control group. The serum levels of miR-186-5p, miR-23b and miR-652 in the subjects were detected by qRT-PCR. Spearman was used to analyze the correlation between miRNAs level and cTnI. ROC curves were drawn to analyze the clinical value of miR-186-5p, miR-23b and miR-652 in the diagnosis of ACS. **Results** Compared with the control group, the serum levels of miR-186-5p, miR-23b and miR-652 in the observation group were all increased the difference were statistically ( $Z=3.312\sim6.451$ , all  $P<0.05$ ). The levels of miR-186-5p, miR-23b and miR-652 in the serum of ACS patients with different lesions were not all the same, and the differences were statistically significant ( $F=6.017\sim8.151$ , all  $P<0.05$ ). After PCI treatment, serum miR-186-5p, miR-23b and miR-652 levels were significantly lower, the difference were statistically significant ( $Z=2.090\sim3.036$ , all  $P<0.05$ ). MiR-186-5p, miR-23b and miR-652 levels in the serum of ACS patients were significantly correlated with cTnI ( $r=0.689, 0.779, 0.746$ , all  $P=0.000$ ). The critical value, the AUC, the sensitivity and the specificity of miR-186-5p were 0.110, 0.775, 61.8% and 91.2%. of miR-23b were 0.133, 0.799, 69.1% and 88.2%. of miR-652 were 0.164, 0.789, 67.6% and 91.2%, respectively. The AUC, sensitivity and specificity of miR-186-5p + miR-23b + miR-652 was 0.941, 91.2% and 83.8%, respectively. The AUC, the sensitivity and the specificity of cTnI were 0.857, 76.5% and 79.4%. The AUC associated with miRNAs was significantly higher than that of cTnI ( $Z=2.243, P<0.05$ ). **Conclusion** Serum miR-186-5p, miR-23b and miR-652 were high-level in patients with ACS. Combined

**基金项目:** 延安市科技专项基金 (2017KS-19)。

**作者简介:** 赵莉 (1980-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 心血管内科疾病的诊治, E-mail: lzhaoli1980@163.com。

**通讯作者:** 谢国媛, 女, 副主任医师, 研究方向: 临床检验, E-mail: 2650974811@qq.com。



use has certain clinical value in the diagnosis of ACS.

**Keywords:** acute coronary syndrome (ACS); miR-186-5p; miR-23b; miR-652; diagnostic value

缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD), 是中老年常见的后天性心脏病, 其发病率在各类心脏疾病中居首位<sup>[1]</sup>。急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是 IHD 的主要表现形式, 是非常严重的医学急症, 主要是由冠状动脉粥样硬化斑块不稳定所导致的心肌缺血, 其临床表现包括急性心肌梗死 (acute myocardium infarction, AMI) 和不稳定心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP)。ACS 的诊断目前主要基于临床症状、心电图或侵入性血管造影。然而, 这些检测易受临床主观性影响, 而且血管造影有可能产生一些并发症。血肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 为心肌损伤坏死标记物<sup>[2]</sup>, 常被用于 ACS 的检测, 但是 cTnI 在早期阶段丰度较低、特异性差。因此, 急需寻找新的生物标志物来诊断 ACS。

微小 RNAs(miRNAs) 是一种小的 (18~24 个核苷酸) 非编码 RNA 分子, 在机体内调控相关基因表达, 参与各种生理过程的发展<sup>[3]</sup>。miRNAs 存在于多种生物液体中, 如血清、尿液和唾液等, 检测手段简单, 并能够显示出器官特异性 (如肝脏中的 miR-122 和心脏中的 miR-499)<sup>[4]</sup>。目前已有多项研究证实 miRNAs 在 ACS 诊断中具有重要作用<sup>[5]</sup>。比如, miR-186-5p 在诊断 ACS 方面具有良好的性能<sup>[6]</sup>; miR-23b 是 ST 段抬高型心肌梗死 (STEMI) 早期的生物标志物<sup>[7]</sup>; miR-652 的 ACS 预后价值优于左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和氨基脑钠肽前体 (N-terminal-pro brain natriuretic peptide, NT-proBNP)<sup>[8]</sup>。基于这些发现, 本文评估了 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 联合使用在 ACS 患者中的诊断价值。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取 2016~2018 年在延安大学附属医院收治并确诊为 ACS 的患者 68 例, 另外选取同期做冠脉造影符合冠心病诊断, 但排除 ACS 的患者 68 例作为对照组。所有 ACS 患者均首次接受经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI)。纳入标准: 符合欧洲心脏病协会 (ESC) 和美国心脏病学会 (ACC) 制定的诊断标准, 并经冠状动脉造影检查确诊。排除标准: 有冠状动脉旁路移植术史、心源性休克、卒中、恶性疾病及各种急慢性感染性疾病的患者。根据上述诊断将 ACS 分为 2 个亚组: 急性心肌梗死 (AMI) 组 ( $n=52$ ) 和不稳定性心绞痛 (UAP) 组 ( $n=16$ ); 平均年龄  $59.25 \pm 11.22$  岁; 男性 38 例, 女性 30 例。对照组平均年龄为  $58.34 \pm 9.32$  岁;

男性 35 例, 女性 33 例。两组性别、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。本研究得到延安大学附属医院伦理委员会的批准 (批准文号: 2015-YAFVD-017), 患者及家属均知情同意。

**1.2 仪器与试剂** ADVIA CENTAUR XP 全自动化学发光免疫分析仪检测 cTnI 水平; RNA 提取和 qRT-PCR 试剂盒用于检测 miRNAs 水平。

## 1.3 方法

**1.3.1 检测外周血中的 cTnI 水平:** 收集 ACS 患者入院时 (PCI 术前) 及 PCI 术后 7 天时的外周静脉血 5 ml。同时外收集对照组血样, 所有样品立即以 3 000 r/min 离心 5 min; 取上清置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存待测。实验步骤按照说明书进行。

**1.3.2 PCI 治疗:** 由两名或两名以上经验丰富的医生根据标准指南进行 PCI 介入治疗。当梗死相关动脉狭窄度  $\geq 70\%$  时置入支架, 同时由手术人员对病变动脉的类型、数量和狭窄程度进行视觉采集。经皮冠状动脉介入治疗后, 残余狭窄  $\leq 20\%$ , 心肌梗死相关动脉中至少有两处出现溶栓血流分级。在进行导管插入术前, 患者口服 300 mg 阿司匹林 (拜阿司匹林)、600 mg 氯吡格雷 (波立维)、20 mg 阿托伐他汀钙片, 并在 PCI 过程中静脉注射 50~100 IU/kg 肝素。

**1.3.3 RNA 提取和 qRT-PCR:** 采用 miRNA 提取试剂盒提取总 RNA, 然后利用 Nanodrop 评估 RNA 的质量。取 5 ng 总 RNA, 采用 TaqMan microRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA, 采用 miRNA-specific TaqMan MiRNA 检测试剂盒用于测定 miRNAs 的含量, 以 U6 作为内参。反应条件: 预变性  $95^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 变性  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 退火  $58^{\circ}\text{C}$ , 20 s, 延伸  $72^{\circ}\text{C}$ , 20s, 30 个循环。每个样本设置三个复孔。每组实验独立重复三次。miR-186-5p, miR-23b, miR-652 相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法表示, 其中  $\Delta Ct = (Ct_{\text{目的 miRNA}} - Ct_{\text{内参 U6}})$ 。miR-186-5p 引物: CAAAGAATTCTCCTTT; miR-23b 引物: ATCACATTGCCAG; miR-652 引物: ATCACATTCAACCCTAGGAGAGGG。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。数据以  $M (P_{25}, P_{75})$  表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验, 三组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。采用 Spearman 分析 miRNA 水平与 cTnI 之间的相关性。采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 评估诊断价值。曲线下面积 (area under curve, AUC) 比较采用  $Z$  检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 见表1。AMI 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b 水平均显著高于对照组 ( $Z=6.451, 5.087$ , 均  $P=0.000$ ) ; UAP 患者血清中 miR-23b 水平显著高于对照组 ( $Z=4.995$ ,

$P=0.000$ )。AMI 患者血清中 miR-652 水平显著高于对照组 ( $Z=5.436, P=0.000$ ) ; UAP 患者血清中 miR-652 水平显著高于对照组 ( $Z=3.312, P=0.001$ ) , 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表1 血清 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 [M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>)]

指标	对照组 (n=68)	ACS (n=68)	
		AMI (n=52)	UAP (n=16)
miR-186-5p	0.029 (0.016, 0.046)	0.315 (0.071, 0.465)	0.088 (0.008, 0.209)
miR-23b	0.025 (0.014, 0.078)	0.253 (0.132, 0.388)	0.230 (0.143, 0.434)
miR-652	0.036 (0.043, 0.09)	0.294 (0.072, 0.506)	0.235 (0.032, 0.507)

2.2 不同病变支数患者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 见表2。不同病变支数的 ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较不全相同, 差异有统计学意义 (均

$P<0.05$ )。进一步两两比较, 三支、双支病变数的 ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平均高于单支, 差异有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。

表2 不同病变支数患者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 [M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>)]

指标	病变支数			F	P
	三支 (n=28)	双支 (n=23)	单支 (n=17)		
miR-186-5p	0.315 (0.144, 0.485)* <sup>△</sup>	0.156 (0.017, 0.451)*	0.079 (0.033, 0.240)	7.061	0.029
miR-23b	0.299 (0.157, 0.434)*	0.225 (0.017, 0.382)*	0.08 (0.020, 0.298)	6.017	0.049
miR-652	0.387 (0.173, 0.631)*	0.309 (0.031, 0.476)*	0.139 (0.036, 0.273)	8.151	0.017

注: \*表示与单支病变数组比较,  $P<0.05$ ; <sup>△</sup>表示与双支病变数组比较,  $P<0.05$ 。

2.3 PCI 术前及术后 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 见表3。与术前比较, 术后 ACS 患

者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平均显著下降, 差异有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。

表3 PCI 术前及术后 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平比较 [M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>)]

指标	手术前	手术后7天	Z	P
miR-186-5p	0.253 (0.037, 0.438)	0.093 (0.031, 0.188)	2.090	0.037
miR-23b	0.230 (0.057, 0.416)	0.084 (0.027, 0.234)	2.823	0.005
miR-652	0.277 (0.061, 0.506)	0.079 (0.034, 0.255)	3.036	0.002

2.4 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平与 cTnI 的相关性 见表4。进一步通过 Spearman 分析 ACS 患者血清中 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 水平分别与 cTnI 水平的相关性, 结果显示 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 与 cTnI 呈显著正相关 ( $r=0.689, 0.779, 0.746$ , 均  $P=0.000$ )。

表4 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 与 cTnI 相关性

指标	r	95%CI	P
miR-186-5p	0.689	0.536~0.795	0.000
miR-23b	0.779	0.664~0.858	0.000
miR-652	0.746	0.617~0.836	0.000

2.5 miR-186-5p, miR-23b, miR-652 对 ACS 患者的诊断价值 见表5。绘制 ROC 受试者工作曲线, 并计算 AUC。通过计算最大 Youden 指数确定最佳诊断临界值。miR-186-5p 临界值为 0.110 时, AUC 为 0.775, 灵敏度为 61.8%, 特异度为 91.2%; miR-23b 临界值为 0.133, AUC 为 0.799, 灵敏度为 69.1%, 特异度为 88.2%; miR-652 临界值为 0.164, AUC 为 0.789, 灵敏度为 67.6%, 特异度为 91.2%。三者联用 AUC 为 0.941, 灵敏度为 91.2%, 特异度为 83.8%。cTnI 的 AUC 为 0.857, 灵敏度为 76.5%, 特异度为 79.4%。miRNAs 联合 AUC 显著高于 cTnI ( $Z=2.243, P<0.05$ )。见图1。

表5 各项指标单独及联合使用对ACS患者的诊断价值

指标	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC值	P	95%CI
miR-186-5p	0.110	61.8	91.2	0.775	0.000	0.691~0.859
miR-23b	0.133	69.1	88.2	0.799	0.000	0.721~0.878
miR-652	0.164	67.6	91.2	0.789	0.000	0.709~0.869
miR-186-5p+miR-23b+miR-652	--	91.2	83.8	0.941	0.000	0.901~0.981
cTnI (ng/ml)	1.02	76.5	79.4	0.857	0.000	0.797~0.917

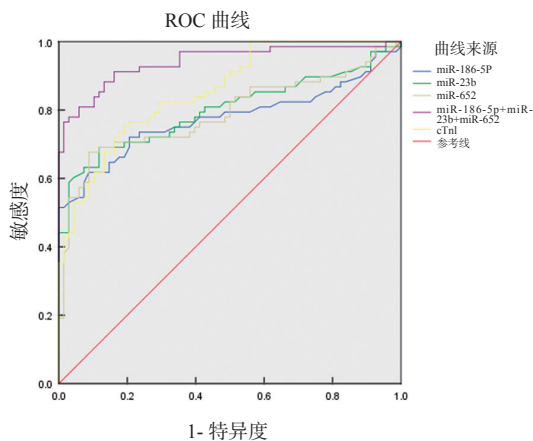


图1 血清中miR-186-5p, miR-23b, miR-652及cTnI对ACS的诊断价值

### 3 讨论

ACS是一种由动脉阻塞引起的心血管疾病,死亡率高、预后差<sup>[9]</sup>。目前ACS的诊断主要取决于临床表现和cTnI的变化,但cTnI在ACS早期敏感度低且特异度差<sup>[10-12]</sup>,因此寻找更高灵敏度和特异度的标记物对ACS诊断具有重要意义。

ACS发生过程中会出现多种生理和病理变化,包括内皮功能障碍、斑块破裂、血小板聚集、冠状动脉血栓形成、心肌缺血、再灌注损伤等<sup>[13]</sup>。miRNAs因其独特的表达模式、较高的稳定性,正被开发用于心血管疾病的诊断或预后<sup>[14]</sup>。miR-186-5p作为其中之一,已被证实在ACS患者中呈高表达,其高表达后能促进动脉粥样硬化脂质的积累,增加巨噬细胞中促炎细胞因子分泌,从而加速动脉粥样硬化病变,最终导致ACS的发生<sup>[15-16]</sup>。另一项研究发现miR-23b在心力衰竭细胞中呈过表达,通过抑制缺氧下细胞的生长速度来促进心肌细胞凋亡<sup>[17]</sup>。当发生急性心肌组织损伤时,miR-652在巨噬细胞中呈现高表达,会诱导产生大量炎症因子,而炎症因子会进一步促进巨噬细胞的增殖、分化,从而加速斑块损伤,导致ACS发生<sup>[18-19]</sup>。基于此,本文检测了非ACS患者和ACS患者血清中miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平,发现ACS患者血清中miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平显著升高,这与之前的研究结果一致<sup>[6-8]</sup>。进一步发现

三支、双支病变患者血清中miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平均高于单支。表明miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平与ACS患者病情严重程度密切相关。分析对比PCI术前、术后ACS患者血清中miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平变化,结果显示术后miRNAs水平显著降低。因此,miRNAs水平变化可以用于观察ACS患者再灌注治疗后的病情进展情况。

早期研究发现miR-186-5p联合脂质参数与炎症指数在ACS诊断中具有优良的性能(AUC为0.94)<sup>[6]</sup>。miR-23b(AUC为0.809)在AMI的诊断上能力优于传统CK-MB(AUC为0.753)和cTnI(AUC为0.783)<sup>[7]</sup>。miR-652水平在ACS急性期显著升高,与ACS的预后相关<sup>[8]</sup>。本文分析发现,miR-186-5p, miR-23b, miR-652水平与cTnI呈显著正相关,推测miR-186-5p, miR-23b, miR-652可能与cTnI具有相似的ACS诊断能力。进一步绘制ROC曲线,结果表明miR-186-5p, miR-23b联合miR-652(AUC为0.941)诊断能力优于cTnI(AUC为0.857),且灵敏度(91.2% vs 83.8%)和特异度(76.5% vs 79.4%)高于cTnI。

总之,本文证实了miR-186-5p, miR-23b, miR-652联合使用诊断ACS优于cTnI,为ACS的诊断提供临床参考价值。

### 参考文献:

- [1] LUAN Luan, HU Hao, LI Shuchuen. A review of studies of quality of life for Chinese-Speaking patients with ischemic heart disease[J]. Value in Health Regional Issues, 2018, 15(4): 82-90.
- [2] 张维贞, 向丽, 黄山, 等. NT-ProBNP和cTnI联合检测对心律失常不同类型的鉴别诊断价值探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1):102-105.  
ZHANG Weizhen, XIANG Li, HUANG Shan, et al. Differential diagnosis value of combined detection NT-ProBNP and cTnI for different types of arrhythmia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1):102-105.
- [3] 李艳, 李新宇. 妊娠糖尿病患者外周血miRNA-21检测的临床应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2):35-38.  
LI Yan, LI Xinyu. Clinical application value of detection of miRNA-21 in peripheral blood of patients with gestational diabetes [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2):35-38.

(下转第124页)



# 动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 和 WBC 水平与慢性失眠症 PSQI 的相关性研究

邹慧莉<sup>1</sup>, 杨伟毅<sup>1</sup>, 刘燕<sup>2</sup>

(1. 西安大兴医院, 西安 710016; 2. 渭南市中心医院神经内科, 陕西渭南 714000)

**摘要:**目的 分析动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者外周血肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8) 和白细胞 (WBC) 水平与慢性失眠症匹兹堡睡眠质量指数 (PSQI) 的相关性。方法 将 103 例动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者 (2019 年 1~12 月收治) 分为不伴失眠症组 (PSQI 评分  $\leq 10$  分, 共 66 例) 和伴失眠症组 (PSQI 评分  $>10$  分, 共 37 例)。不伴失眠症组和伴失眠症组均未经治疗行外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 和 WBC 检测, 分析两组的外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 和 PSQI 评分差异, 采用 Pearson 秩相关法分析外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 和 WBC 与 PSQI 评分之间的相关性。结果 伴失眠症组的 TNF- $\alpha$  ( $26.49 \pm 4.82$  nmol/L), IL-6 ( $16.92 \pm 3.44$  pg/ml), IL-8 ( $21.45 \pm 3.87$  pg/ml) 和 PSQI ( $16.74 \pm 2.25$  分) 高于不伴失眠症组 ( $22.19 \pm 4.64$  nmol/L,  $13.62 \pm 3.03$  pg/ml,  $17.91 \pm 3.14$  pg/ml 和  $6.91 \pm 1.93$  分), 伴失眠症组的 WBC [ $(6.41 \pm 1.28) \times 10^9/L$ ] 低于不伴失眠症组 [ $(8.76 \pm 1.46) \times 10^9/L$ ], 经  $t$  检验分析差异均具有统计学意义 ( $t=4.450\sim 9.098$ , 均  $P<0.05$ )。外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-8 水平均与 PSQI 呈正相关, 经 Pearson 秩相关法分析 ( $r=0.874\sim 0.933$ ,  $P<0.05$ ); 外周血 WBC 水平与 PSQI 呈负相关, 经 Pearson 秩相关法分析 ( $r=-0.843$ ,  $P=0.000$ )。结论 动脉粥样硬化性缺血性脑血管病并发慢性失眠症患者具有明显的炎症反应和白细胞浸润, 且炎症反应、白细胞浸润的程度越高, 并发慢性失眠症的程度越严重。

**关键词:** 动脉粥样硬化性缺血性脑血管病; 慢性失眠症; 匹兹堡睡眠质量指数; 炎症反应

中图分类号: R743.1; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-068-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.017

## Correlation between Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and WBC in Peripheral Blood of Patients with Atherosclerotic Ischemic Cerebrovascular Disease and PSQI in Chronic Insomnia

ZOU Hui-li<sup>1</sup>, YANG Wei-yi<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>

(1. Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China; 2. Department of Neurology, Weinan Central Hospital, Shaanxi Weinan 714000, China)

**Abstract: Objective** To analyze the correlation between the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and WBC in peripheral blood of patients with atherosclerotic ischemic cerebrovascular disease and chronic insomnia pittsburgh sleep quality index (PSQI). **Methods** A total of 103 patients with arteriosclerosis ischemic cerebrovascular disease (admitted from January to December 2019) were divided into two groups: no insomnia group (PSQI  $\leq 10$ , 66 cases) and insomnia group (PSQI  $>10$ , 37 cases). Peripheral blood TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and WBC were detected in both the non-insomnia group and the insomnia group without treatment, and differences in peripheral blood TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC and PSQI scores were analyzed. Pearson rank correlation method was used to analyze the correlation between peripheral blood TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC and PSQI scores. **Results** The levels of TNF- $\alpha$  ( $26.49 \pm 4.82$  nmol/ml), IL-6 ( $16.92 \pm 3.44$  pg/ml), IL-8 ( $21.45 \pm 3.87$  pg/ml) and PSQI ( $16.74 \pm 2.25$  point) in the insomnia group were higher than those in the insomnia group ( $22.19 \pm 4.64$  nmol/ml,  $13.62 \pm 3.03$  pg/ml,  $17.91 \pm 3.14$  pg/ml and  $6.91 \pm 1.93$  point). The WBC of the insomnia group ( $6.41 \pm 1.28 \times 10^9/L$ ) was lower than that of the insomnia group ( $8.76 \pm 1.46 \times 10^9/L$ ), and the difference was statistically significant after  $t$ -test analysis ( $t=4.450\sim 9.098$ , all  $P<0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in peripheral blood were positively correlated with PSQI, and were analyzed by Pearson rank correlation method ( $r=0.874\sim 0.933$ , all  $P<0.05$ ). WBC level in peripheral blood was negatively correlated with PSQI, which was analyzed by Pearson rank correlation method ( $r=-0.843$ ,  $P=0.000$ ). **Conclusion** Patients with atherosclerotic ischemic

作者简介: 邹慧莉 (1981-), 女, 硕士, 副主任医师, 专业: 神经内科, E-mail: 1489647081@qq.com。

通讯作者: 杨伟毅 (1983-), 男, 主治医师, 专业: 神经内科。

cerebrovascular disease complicated with chronic insomnia had obvious inflammatory reaction and leukocyte infiltration, and the higher the intensity of inflammatory reaction and leukocyte infiltration, the more serious the degree of chronic insomnia.

**Keywords:** atherosclerotic ischemic cerebrovascular disease; chronic insomnia; pittsburgh sleep quality index (PSQI); inflammatory response

动脉粥样硬化性缺血性脑血管病是一种侧支血管代偿性疾病,除频繁脑缺血引起卒中外,认知功能障碍、慢性失眠症均是其常见功能损伤症状,给患者生活质量带来影响和生命安全带来威胁<sup>[1]</sup>。由于动脉粥样硬化可导致脑组织坏死,会使患者不同程度出现神经功能异常,这是动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者慢性失眠症发生的主要原因<sup>[2]</sup>,目前临床研究显示,慢性失眠症不仅与动脉粥样硬化和脑血管缺血所导致的神经功能损伤有关,同时也可能与炎症反应、白细胞浸润异常有关。由于局部炎症反应、白细胞浸润异常会导致血液循环障碍,导致脑神经组织长期处于缺血、缺氧状态,给睡眠质量带来影响,形成慢性失眠症,但是慢性失眠症患者血清炎症因子改变很多尚没有确切的定论,肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)是目前已经确定与失眠症相关的炎症因子<sup>[3-4]</sup>,这使从血清分子学找寻防治动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者慢性失眠症成为可选择方向,查阅文献发现,对动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者睡眠与相关因子研究的报道极少。鉴于此,本研究以血清炎症因子、白细胞计数与动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病病例为研究对象,通过分析患者慢性失眠症与外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平与慢性失眠症匹兹堡睡眠质量指数 (pittsburghn sleep

quality index, PSQI) 的相关性,以期对动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病后并发慢性失眠症的防治提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 获得医院伦理委员会批准,以2019年1~12月期间收治的103例动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病病例为研究对象。病例纳入标准:①符合动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病临床诊断标准<sup>[5]</sup>;②入院未昏迷,在未经治疗情况下可完成PSQI<sup>[6]</sup>的失眠情况测评;③患者知情同意且签署知情同意书。病例排除标准:①排除严重肝肾功能不全、动静脉畸形、恶性肿瘤、蛛网膜下腔出血、免疫系统疾病、认知功能障碍疾病的病例;②排除如倒班、睡前饮浓茶、喝咖啡、服用安茶碱、甲状腺素、利他林等的病例;③排除具有胸闷、心悸、瘙痒、咳嗽、夜尿、喘息、尿频、头痛等躯体疾病导致失眠者;④排除由精神因素,社会、家庭和工作等矛盾引起的失眠病例;根据PSQI测评得分分为不伴失眠组 (PSQI评分 $\leq 10$ 分,共66例)和伴失眠组 (PSQI评分 $>10$ 分,共37例)<sup>[7]</sup>。不伴失眠组和伴失眠组病例在基线资料(年龄、性别、体脂比、学历水平)上比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表1。

表1 伴失眠组与不伴慢性失眠组患者的一般资料比较 [ $\bar{x} \pm s, n(\%)$ ]

类别	不伴失眠组 (n=66)	伴失眠组 (n=37)	t 或 $\chi^2$	P
年龄 (周岁)	54.43 $\pm$ 3.78	55.26 $\pm$ 3.83	1.064	0.290
性别				
男	35(53.03)	21(56.76)	0.133	0.715
女	31(46.97)	16(43.24)		
体脂比 (kg/m <sup>2</sup> )	27.79 $\pm$ 1.18	27.54 $\pm$ 1.09	1.060	0.292
学历				
高中以下	33(50.00)	17(45.95)	0.285	0.867
大专、本科	23(34.85)	13(35.14)		
硕士及以上	10(15.15)	7(18.92)		

## 1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器:全自动化学发光免疫分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子公司生产,型号CL-2200i,国食药监械字2013第3401028号);全自动血细胞分析仪(吉林省维尔医疗器械生产,型号WD-5000,吉食药监械字2011第2400109号)。

1.2.2 主要试剂:人肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )检测试剂盒,人白介素-6(interleukin-6, IL-6)检测试剂盒,人白介素-8(Interleukin-8,

IL-8)检测试剂盒均购自子科生物 ZIKER,包装规格96T/48T,货号ZK-H064。

## 1.3 方法

1.3.1 外周血指标:入选病例均未经治疗行外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 和白细胞计数 (white blood count, WBC) 检测。取静脉血 3ml 送检,采用全自动化学发光免疫分析仪及配套试剂行血清 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 表达水平测定,采用全血细胞分析仪进行 WBC 测定。

1.3.2 PSQI 失眠情况测评: 主要包括睡眠质量测评因子、入睡时间测评因子、睡眠时间测评因子、睡眠效率测评因子、睡眠障碍测评因子、催眠药物测评因子、日间功能测评因子等 7 个方面, 每项分值 0~3 分, 得分越高失眠情况越严重。

1.4 统计学分析 采用 SPSS21.0(中文版) 和 Graphpad Prism(英文版) 软件。数据对比: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC, PSQI 评分以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 组间以  $t$  检验分析; 性别占比、学历水平等以  $[n(\%)]$  描述, 组间以  $\chi^2$  检验分析。采用 Pearson 秩相关法分析 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平与

PSQI 评分之间的相关性, Graphpad Prism 软件绘制 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平与 PSQI 评分分布散点图,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 伴失眠组与不伴慢性失眠组患者 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平比较 见表 2。通过与不伴失眠组比较, 伴失眠组的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 高于不伴失眠组, WBC 低于不伴失眠组, 经  $t$  检验分析差异具有统计学意义 ( $t=4.450 \sim 8.182$ , 均  $P=0.000$ )。

表 2 伴或不伴慢性失眠症病例的血清炎症因子、白细胞计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	不伴失眠组 ( $n=66$ )	伴失眠组 ( $n=37$ )	$t$	$P$
TNF- $\alpha$ (nmol/L)	22.19 $\pm$ 4.64	26.49 $\pm$ 4.82	4.450	0.000
IL-6 (pg/ml)	13.62 $\pm$ 3.03	16.92 $\pm$ 3.44	5.049	0.000
IL-8 (pg/ml)	17.91 $\pm$ 3.14	21.45 $\pm$ 3.87	5.043	0.000
WBC ( $\times 10^9/L$ )	11.76 $\pm$ 1.46	8.41 $\pm$ 1.28	8.182	0.000

2.2 伴失眠组与不伴慢性失眠组患者 PSQI 评分比较 见表 3。通过与不伴失眠组比较, 伴失

眠组的 PSQI 高于不伴失眠组, 经  $t$  检验分析差异具有统计学意义 ( $t=9.098 \sim 15.631$ , 均  $P=0.000$ )。

表 3 伴或不伴慢性失眠症病例的 PSQI 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

项目	不伴失眠组 ( $n=66$ )	伴失眠组 ( $n=37$ )	$t$	$P$
睡眠质量评分	1.03 $\pm$ 0.16	2.34 $\pm$ 0.48	12.812	0.000
入睡时间评分	0.95 $\pm$ 0.15	2.28 $\pm$ 0.36	13.016	0.000
睡眠时间评分	1.10 $\pm$ 0.18	2.19 $\pm$ 0.39	11.914	0.000
睡眠效率评分	1.04 $\pm$ 0.17	2.51 $\pm$ 0.44	12.615	0.000
睡眠障碍评分	0.91 $\pm$ 0.18	2.39 $\pm$ 0.40	14.682	0.000
催眠药物评分	1.24 $\pm$ 0.22	1.97 $\pm$ 0.53	10.031	0.000
日间功能评分	0.90 $\pm$ 0.20	2.41 $\pm$ 0.43	15.631	0.000
PSQI 总评分	6.91 $\pm$ 1.93	16.74 $\pm$ 2.25	9.098	0.000

2.3 伴失眠组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平与 PSQI 评分的相关性 见图 1。通过对伴失眠组 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, WBC 水平与 PSQI 评分进行相关性分析发现, 外周血 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 水平均与 PSQI 呈正相关, 经 Pearson 秩相关法分析  $r=0.874\ 3, 0.894\ 0, 0.933\ 9, P=0.014, 0.018, 0.031$ 。外周血 WBC 水平与 PSQI 呈负相关, 经 Pearson 秩相关法分析 ( $r=-0.843\ 0, P=0.000$ )。

## 3 讨论

动脉粥样硬化性缺血性脑血管病作为缺血性脑血管病的一个重要类型, 属于动脉粥样硬化发展的晚期, 是成人脑神经功能损伤的最常见病因<sup>[8]</sup>。全球动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者年均新发病例可高达 800 万以上, 发病率呈上升趋势, 而年

均累计致死人数可达 100 万以上, 即使存活病例也存在一定程度的神经功能损伤<sup>[9-10]</sup>。动脉粥样硬化性缺血性脑血管病患者神经功能损伤可导致认知功能障碍、慢性失眠症等并发症, 对患者生活质量带来严重影响。由于动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病并发慢性失眠症的原因比较复杂, 并且作用机制尚未完全明确, 相关文献报道显示, 慢性失眠症患者存在白细胞的非特异性激活, 并且机体处于低水平的系统性感染状态, 是炎症反应的主要诱导因素, 且动脉粥样硬化或脑动脉缺血伴随患者血供不足及低氧, 导致神经元坏死及炎症产生, 进而使神经退行性变是并发性慢性失眠症的因素之一<sup>[11]</sup>。故临床治疗中除失眠症常规用药外, 及早予溶栓术是国内外指南推荐的首选治疗方案。也有文献显示缺血



性脑血管疾病伴失眠患者会涉及多种神经递质的表达失调、神经激素分泌异常,同时人体免疫调节物质会作用于中枢神经系统影响睡眠<sup>[12-13]</sup>。因此,动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病患者神经功能不可恢复性和手术引起严重并发症(如再灌注损伤和再灌注闭塞)等均容易进一步加重神经功能缺损<sup>[14-15]</sup>,也可导致失眠症的进一步加重。

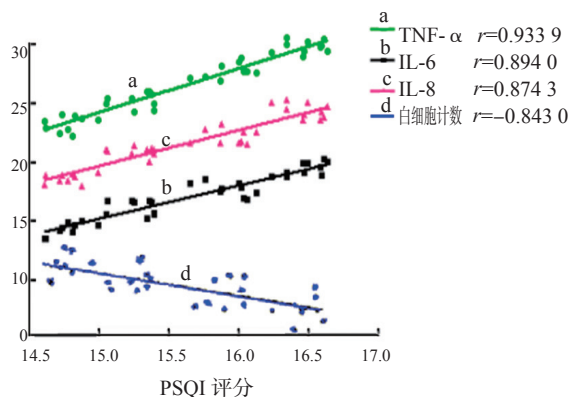


图1 伴失眠症组病例的血清炎症因子表达水平与PSQI评分的分布散点图

在目前脑血管性疾病医学领域,炎症因子与慢性失眠症之间的相关性研究较少。研究显示,IL-6, IL-8高表达可促进慢性失眠症的进展<sup>[16-17]</sup>。也有研究显示, TNF- $\alpha$ 是动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病患者慢性失眠症病情发展中的关键细胞因子, TNF- $\alpha$ 可与患者神经功能损伤形成一个互相作用的网络,促进神经功能损伤,加重并发性失眠症的病情<sup>[18-19]</sup>。白细胞减少症是指周围白细胞计数持续下降所引起的一组症状,轻症者可表现为头晕、乏力、肢体酸软、食欲减退、精神萎靡、低热等,重症者可导致慢性失眠、认知功能障碍等症<sup>[20-21]</sup>。本研究显示,动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病并发性失眠症患者的炎症反应、白细胞浸润均存在明显的异常,且炎症反应、白细胞浸润程度与动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病并发性失眠症患者失眠症状评分存在明显的相关性。在国外动物实验中有所提示。如 THIMGAN 等<sup>[22]</sup>在缺血性脑血管疾病模型大鼠实验研究中发现,缺血性脑血管疾病模型大鼠炎症反应、白细胞浸润程度与大鼠睡眠质量密切相关,其推测炎症反应、白细胞浸润是促进缺血性脑血管疾病模型大鼠模型大鼠睡眠质量降低的可能原因。

综上所述,动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病并发性失眠症患者存在明显的炎症反应和白细胞浸润,且炎症反应、白细胞浸润的强度越高,并发性失眠症的程度越严重。炎症反应和白细胞浸润可能是动脉粥样硬化性缺血性脑血管疾病并发性失眠症的一个重要原因,这在动脉粥样硬化性缺血

性脑血管疾病并发性慢性失眠症的防治中具有一定参考意义。然而本研究样本量较小,故仍需后续大样本研究进一步分析。

#### 参考文献:

- [1] 曹光宇, 罗勇. 单纯静脉溶栓与静脉溶栓联合血管内介入治疗对急性缺血性脑血管病的临床疗效比较[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(4): 402-405. CAO Guangyu, LUO Yong. Effect of intravenous thrombolysis and its combination with intravenous intervention on acute ischemic cerebrovascular diseases[J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2020, 22(4): 402-405.
- [2] 薛恒, 张为良, 闫丽, 等. 青年缺血性脑血管病患者危险因素分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2008, 13(11): 562-564. XUE Heng, ZHANG Weiliang, YAN Li, et al. Risk factor analysis of young patients with ischemic cerebrovascular disease[J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2008, 13(11): 562-564.
- [3] 吴伟, 林传行, 陈书丽. 慢性失眠伴焦虑抑郁患者血清炎症相关标志物研究进展[J]. 医学与哲学, 2017, 38(5B): 18-21. WU Wei, LIN Chuanhang, CHEN Shuli, et al. Research progress of serum inflammatory biomarkers in chronic insomnia patients with anxiety or/and depression[J]. Medicine & Philosophy, 2017, 38(5B): 18-21.
- [4] 夏兰, 刘帅, 陈贵海, 等. 慢性失眠障碍患者血清细胞因子及淀粉样蛋白A水平改变[C]. 哈尔滨: 中国睡眠研究会第十届全国学术年会汇编, 2018: 659-660. XIA Lan, LIU Shuai, CHEN Guihai, et al. Changes in serum cytokine and amyloid A levels in patients with chronic insomnia [C]. Haerbin: Compilation of the tenth National Academic Annual Meeting of Chinese Sleep Research Association, 2018: 659-660.
- [5] RAMIREZ L, KIM-TENSER M, SANOSSIAN N, et al. Trends in acute ischemic stroke hospitalizations in the United States[J]. Journal of the American Heart Association, 2016, 5(5): e003233.
- [6] 路桃影, 李艳, 夏萍, 等. 匹兹堡睡眠质量指数的信度及效度分析[J]. 重庆医学, 2014, 43(3): 260-263. LU Taoying, LI Yan, XIA Ping, et al. Analysis on reliability and validity of the pittsburgh sleep quality index[J]. Chongqing Medicine, 2008, 43(3): 260-263.
- [7] 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(7): 534-540. Chinese Society of Neurology, Sleep Disorder Society, Chinese Medical Association. Guideline for the evaluation and treatment of insomnia in Chinese adults[J]. Chinese Journal of Neurology, 2015, 48(7): 534-540.
- [8] 芦晓宏. 通窍活血汤对缺血性脑血管病患者神经功能恢复、血液流变学的影响研究[J]. 四川中医, 2020, 38(3): 102-105. LU Xiaohong. Effect of Tongqiao Huoxue decoction on nerve function recovery and hemorheology for patients with ischemic cerebrovascular disease[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2020, 38(3): 102-105.
- [9] TIBÆK M, DEHLENDORFF C, JØRGENSEN H S, et al. Increasing incidence of hospitalization for stroke and transient ischemic attack in (下转第 162 页)

# 儿童哮喘患者外周血 ILC2 细胞和 Th2 型细胞相关因子水平变化及与临床相关性研究

李晓刚<sup>1a</sup>, 邓巧妮<sup>1a</sup>, 王军焕<sup>1a</sup>, 葛君俐<sup>1b</sup>, 康茹<sup>2</sup>

(1. 宝鸡高新人民医院 a. 儿科; b. 检验科, 陕西宝鸡 721000; 2. 西北妇女儿童医院检验科, 西安 710061)

**摘要:** **目的** 探讨支气管哮喘患儿外周血中 2 型固有免疫细胞 (type2 innate lymphoid cells ILC2) 和 Th2 型细胞相关因子水平变化及其临床意义。**方法** 选取 2019 年 1 月~2020 年 5 月在宝鸡高新人民医院确诊的 67 例急性发作期支气管哮喘患儿作为研究对象, 根据发病严重程度分为重度-危重组 23 例和轻-中度组 44 例; 并选取同期健康体检的 45 例儿童作为对照组。检测两组血清 ILC2 细胞比例和 IL-4, IL-5, IL-10 和 IL-13 水平, 记录两组肺功能指标: 第一秒用力呼气量 (FEV1)、用力肺活量 (FVC) 及最大呼气峰流速 (PEF); 并分析 ILC2 细胞比例和 IL-4, IL-5, IL-10 和 IL-13 水平与肺功能指标的相关性。**结果** 支气管哮喘组患儿外周血 ILC2 细胞比例及 IL-4, IL-5 和 IL-13 水平明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $F=24.419\sim209.627$ , 均  $P<0.001$ ); IL-10 水平及肺功能指标 FVC, FEV1 和 PEF 明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ( $F=80.826\sim298.942$ , 均  $P<0.001$ )。重度-危重组支气管哮喘患儿外周血 ILC2 细胞比例和 IL-4, IL-5, IL-10 和 IL-13 水平及肺功能指标变化较轻-中度组更为显著, 差异均有统计学意义 ( $t=1.990\sim7.848$ ,  $P$  均  $<0.05$ )。支气管哮喘患儿外周血 ILC2 细胞比例及 IL-4, IL-5 和 IL-13 水平与 FVC, FEV1 和 PEF 值呈显著负相关, 差异均有统计学意义 ( $r=0.564\sim0.712$ , 均  $P<0.01$ ); IL-10 水平与 FVC, FEV1 和 PEF 值呈显著正相关, 差异均有统计学意义 ( $r=0.537\sim0.603$ , 均  $P<0.01$ )。**结论** 急性发作期支气管哮喘患儿外周血 ILC2 细胞比例及 Th2 型细胞相关因子水平明显升高或降低, 与哮喘患儿肺功能及病情严重程度显著相关, 对其进行检测有助于评估支气管哮喘患儿病情程度, 为临床提供理论指导。

**关键词:** 儿童; 支气管哮喘; 2 型固有免疫细胞; Th2 型细胞因子

中图分类号: R725.6; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-072-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.018

## Changes of ILC2 Cells and Th2 Cell Related Factors in Peripheral Blood of Children with Asthma and Their Clinical Relevance

LI Xiao-gang<sup>1a</sup>, DENG Qiao-ni<sup>1a</sup>, WANG Jun-huan<sup>1a</sup>, GE Jun-li<sup>1b</sup>, KANG Ru<sup>2</sup>

(1a. Department of Pediatrics; 1b. Department of Clinical Laboratory, Baoji Gaoxin People's Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710061, China)

**Abstract: Objective** To investigate the changes and clinical significance of ILC2 cells and Th2 cell related factors in peripheral blood of children with bronchial asthma. **Methods** A total of 67 children with acute onset bronchial asthma diagnosed in Baoji Gaoxin People's Hospital from January 2019 to May 2020 were selected as the research objects. According to the severity of the disease, they were divided into the severe-critical group (23 cases) and the mild-moderate group (44 cases). A total of 45 children who underwent physical examination during the same period were selected as controls. Serum ILC2 cell ratio and IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 levels were detected in the two groups. Lung function indexes of the two groups were recorded: forced expiratory volume in the first second (FEV1), forced vital capacity (FVC) and maximum expiratory peak velocity (PEF). The correlation between ILC2 cell proportion and IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 levels and lung function was analyzed. **Results** The proportion of ILC2 cells and levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in peripheral blood of children with bronchial asthma were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ( $F=24.419\sim209.627$ , all  $P<0.001$ ). The levels of IL-10 and lung function indexes of FVC, FEV1, PEF were significantly lower than those of the control group, and the differences were statistically significant ( $F=80.826\sim298.942$ , all  $P<0.001$ ). The ILC2 cell proportion, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 levels and pulmonary function indicators in the peripheral blood of children with bronchial asthma in the severe - critical group were more significant than those in the mild-moderate group, with statistically significant

作者简介: 李晓刚 (1977-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 呼吸、哮喘, E-mail: tuyingcuo2020@163.com。

通讯作者: 邓巧妮 (1983-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 儿童哮喘。

differences ( $t=1.990\sim7.848$ , all  $P<0.05$ ). The percentages of ILC2 cells and IL-4, IL-5 and IL-13 levels in peripheral blood of children with bronchial asthma were negatively correlated with the values of FVC, FEV1 and PEF, with statistically significant differences ( $r=0.564\sim0.712$ , all  $P<0.01$ ). IL-10 level was positively correlated with FVC, FEV1 and PEF values, and the difference was statistically significant ( $r=0.537\sim0.603$ , all  $P<0.01$ ). **Conclusion** The proportion of ILC2 cells and the level of Th2 cell related factors in peripheral blood of children with bronchial asthma during acute attack were significantly increased or decreased, which were significantly correlated with the pulmonary function and severity of the disease in children with asthma. The detection of ILC2 cells was helpful to assess the severity of the disease in children with bronchial asthma, and could provide theoretical guidance for clinical practice.

**Keywords:** children; bronchial asthma; type 2 innate lymphoid cells; Th2 cytokines

支气管哮喘是由多种炎性细胞及细胞因子参与的气道慢性炎症性疾病,伴有气道高反应性、黏液分泌增多及可逆性气流受限,晚期还可能出现气道重塑<sup>[1]</sup>。目前,哮喘发病机制尚未完全明确,但既往众多研究表明哮喘的发生发展与免疫炎症反应形成相关<sup>[2]</sup>。经典的免疫学说认为,哮喘是以Th2型免疫反应为主的气道炎症疾病,Th1/Th2免疫失衡是哮喘发病的重要免疫学机制,正常机体内Th0按一定比例向Th1和Th2分化,两者维持相对平衡<sup>[3]</sup>。哮喘发生时,多因素作用使Th0趋向于Th2分化,并分泌大量2型细胞炎性因子(如IL-4, IL-5, IL-13),启动一系列炎症反应过程,诱发哮喘的发生<sup>[4]</sup>。近年研究发现<sup>[5]</sup>,固有免疫细胞(innate lymphoid cells, ILCs)在机体炎症应答、抗感染免疫及组织重塑和修复中发挥重要作用,其不同分类中ILC2细胞能够分泌Th2型细胞因子,与嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及自然杀伤细胞等共同参与哮喘的发生。并发现过敏性哮喘小鼠模型中,ILC2与嗜酸性粒细胞介导的炎症反应相关<sup>[6]</sup>。过敏性哮喘患者外周血、痰及肺泡灌洗液中ILC2数量有所升高<sup>[7]</sup>。ILC2细胞具有独立分泌Th2型细胞因子的能力,提示ILC2细胞可能通过产生Th2型细胞因子进而参与了哮喘的发生发展<sup>[8]</sup>。为揭示ILC2与哮喘病情的关系,为临床诊疗提供理论参考,本研究对我院67例急性发作期支气管哮喘患儿外周血中ILC2细胞及Th2型细胞因子水平进行检测分析,探究了其哮喘患儿病情的相关性,现总结如下:

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2019年1月~2020年5月在宝鸡高新人民医院确诊的67例急性发作期支气管哮喘患儿作为研究对象,根据发病严重程度分为重度-危重组23例和轻-中度组44例;另选取同期健康体检的45例儿童作为对照组。哮喘组儿童年龄6~12岁,平均年龄 $7.3\pm4.3$ 岁,男性38例,女性29例;对照组儿童年龄6~14岁,平均年龄 $8.6\pm3.7$ 岁,男性25例,女性20例;两组年龄、性别差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**纳入标准:**支气管哮喘的诊断符合《儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)》中诊断标准<sup>[9]</sup>;年龄6~14岁;无呼吸道感染病史;无全身免疫缺陷性疾病及先天性严重疾病;对照组为我院接受体检的健康儿童;本研究经我院医学伦理委员会批准,家属均知情同意。

**排除标准:**存在严重肝肾功能障碍;并发血液系统疾病及恶性肿瘤;支气管发育畸形或支气管异物;肺部感染者;入组前近期内应用激素等药物史、既往有哮喘家族病史、肺功能异常等。

**1.2 仪器及试剂** 流式抗体: Lineage, Anti-human CD45 APC, Anti-human CD127 PE-Cyanine7, Anti-Human CRTH2 PE 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; ELISA 试剂盒购自江苏科特生物科技有限公司; DG5033A 酶标仪购自北京普朗医用设备有限公司; Master Screen 肺功能仪购自德国 JAEGER 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 血清样本采集:**于入院后次日清晨采集两组儿童空腹外周静脉血5 ml,其中3 ml置入EDTA抗凝管,采用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单核细胞PBMC,转移至EP管,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存;另外2 ml静脉血  $2\,000\text{ r/min}$ 离心10 min,留取血清,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待检。

**1.3.2 外周血 ILC2 细胞检测:**分离的外周血PBMC细胞, PBS洗涤,  $2\,000\text{ r/min}$ 离心5 min,弃上清,加入PBS调整细胞浓度至  $1\times10^3$  个/ml,加入FCR阻断剂孵育20 min,加入流式抗体,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, PBS洗涤,离心弃上清, PBS重悬细胞沉淀,采用流式细胞术检测ILC2,以外周血标本中出现Lin-CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup>淋巴细胞群定义为ILC2细胞。

**1.3.3 外周血 Th2 型细胞因子水平检测:**取静脉血离心后上层血清,采用ELISA法按检测试剂盒说明书行血清Th2型相关细胞因子IL-4, IL-5, IL-10, IL-13水平检测,使用DG5033A酶标仪于波长450 nm处检测A值,取其平均值作为相对含量。

**1.3.4 肺功能指标检测:**采用Master Screen肺功能仪检测入组支气管哮喘患儿及正常儿童第一秒用力



呼气量 (forced expiratory volume in 1s, FEV1)、用力肺活量 (forced vital capacity, FVC) 及最大呼气峰流速 (peak expiratory flow, PEF), 评估其肺功能。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析, 计数资料采用  $n(\%)$  表示, 组间采用  $\chi^2$  检验。计量资料符合正态分布的采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 LSD- $t$  检验; 不服从正态分布以中位数和四分位数表示, 采用 Mann-Whitney  $U$  检验。相关性分析采用 Pearson 线

性相关分析法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组外周血 ILC2 细胞比例及 Th2 型细胞因子水平比较 见表 1。与对照组相比, 支气管哮喘组患儿外周血 ILC2 细胞比例及 IL-4, IL-5, IL-13 水平明显升高, IL-10 水平明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 重度 - 危重组支气管哮喘患儿以上指标变化较轻 - 中度组更为显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 外周血 ILC2 细胞比例及 Th2 型细胞因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	支气管哮喘组 ( $n=67$ )				对照组 ( $n=45$ )	$F$	$P$
	重度 - 危重组 ( $n=23$ )	轻 - 中度组 ( $n=44$ )	$t$	$P$			
ILC2 (%)	0.08 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.03	3.650	0.000	0.02 $\pm$ 0.01	24.419	<0.001
IL-4 (ng/L)	54.7 $\pm$ 4.3	49.2 $\pm$ 5.1	4.413	0.000	25.7 $\pm$ 8.4	209.627	<0.001
IL-5 (ng/L)	76.6 $\pm$ 9.4	68.3 $\pm$ 8.5	3.659	0.000	42.8 $\pm$ 11.6	112.640	<0.001
IL-10 (ng/L)	9.7 $\pm$ 3.9	11.8 $\pm$ 4.2	1.990	0.025	22.3 $\pm$ 5.7	80.826	<0.001
IL-13 (ng/L)	42.4 $\pm$ 5.8	38.6 $\pm$ 4.5	3.076	0.002	24.6 $\pm$ 5.4	122.855	<0.001

2.2 两组肺功能指标比较 见表 2。与对照组相比, 支气管哮喘组患儿肺功能指标 FVC, FEV1, PEF 明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。重度 -

危重组支气管哮喘患儿肺功能指标降低较轻 - 中度组更显著, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

表 2 肺功能指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	支气管哮喘组 ( $n=67$ )				对照组 ( $n=45$ )	$F$	$P$
	重度 - 危重组 ( $n=23$ )	轻 - 中度组 ( $n=44$ )	$t$	$P$			
FVC (%)	65.4 $\pm$ 8.3	73.2 $\pm$ 7.4	3.929	0.000	92.4 $\pm$ 6.7	128.697	<0.001
FEV1 (%)	59.2 $\pm$ 4.9	69.5 $\pm$ 5.2	7.848	0.000	90.4 $\pm$ 5.9	298.942	<0.001
PEF (%)	66.1 $\pm$ 6.7	74.5 $\pm$ 7.9	4.343	0.000	99.7 $\pm$ 10.8	119.982	<0.001

2.3 支气管哮喘组患儿外周血 ILC2 及 Th2 型细胞因子水平与肺功能指标的相关性 见表 3。支气管哮喘患儿外周血 ILC2 细胞比例及 IL-4, IL-5, IL-13 水平与 FVC, FEV1, PEF 呈显著负相关关系,

差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); IL-10 水平与 FVC, FEV1, PEF 呈显著正相关关系, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 3 相关性分析结果

指标	FVC		FEV1		PEF	
	$r$	$P$	$r$	$P$	$r$	$P$
ILC2	-0.712	<0.01	-0.684	<0.01	-0.669	<0.01
IL-4	-0.564	<0.01	-0.587	<0.01	-0.612	<0.01
IL-5	-0.573	<0.01	-0.611	<0.01	-0.597	<0.01
IL-10	0.537	<0.01	0.564	<0.01	0.603	<0.01
IL-13	-0.681	<0.01	-0.593	<0.01	-0.620	<0.01

## 3 讨论

支气管哮喘主要由 T 淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞及上皮细胞等气道炎性细胞及结构细胞和细胞组分参与形成<sup>[1-2]</sup>。Th2 型免疫学说认为, 免疫功能紊乱和抗原特异性 Th2 细胞过度分化介导的适应性免疫应答是哮喘发病的主要

因素<sup>[3,10]</sup>。抗原进入机体被抗原提呈细胞识别并激活 T 细胞 (Th2 细胞), 使之活化分泌 IL-4, IL-5, IL-13 等细胞因子, 促使 B 细胞产生特异性 IgE 抗体; IgE 与肥大细胞、嗜酸性粒细胞表面受体结合将其激活, 促进组胺等多种活性炎性介质<sup>[11]</sup>; Th2 细胞分泌的细胞炎性因子选择性作用于肥大细

胞、嗜酸性粒细胞/嗜碱性粒细胞,引起哮喘相应病理改变,共同参与了哮喘的气道炎症反应及发病。近年发现<sup>[3,5]</sup>, ILC2细胞与哮喘慢性炎症密切相关,其不仅在固有免疫应答中发挥重要作用,且可在IL-33、胸腺基质淋巴生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)、脂质递质半胱氨酰白三烯(cysteinyl leukotrienes, CYSLT)等因子的刺激下分泌Th2细胞因子,参与Th2型免疫炎症反应,为哮喘发病机制的研究提供了新的思路。

ILCs是新发现的一类具有淋巴细胞特征,但缺乏特异性抗原识别受体的非T、非B细胞,主要存在于黏膜组织,其通过释放相关细胞因子或介质进而调节免疫反应,在多种过敏性与非过敏性炎症疾病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。ILCs根据其产生的效应细胞因子不同分为ILC1, ILC2, ILC3三类<sup>[3]</sup>。研究表明,上皮细胞源性细胞因子IL-25和IL-33可激活ILC2使其快速分泌IL-5, IL-9, IL-13等Th2型细胞因子,参与过敏性炎症、抗蠕虫感染及组织修复<sup>[13]</sup>。ILC2与Th2细胞在表型及功能上相似,被认为是Th2型细胞的主要来源<sup>[6]</sup>。研究表明<sup>[14]</sup>,不同致敏原刺激下, ILC2可产生大量Th2型细胞因子,引起嗜酸性粒细胞聚集、浸润及气道高反应性和气道炎症。过敏源刺激下气道壁细胞分泌IL-33引起ILC2激活分泌IL-5, IL-13,参与哮喘免疫应答过程<sup>[15]</sup>。哮喘患者外周血中ILC2比例及数量与嗜酸性粒细胞计数及IgE呈正相关;过敏性哮喘患者外周血中ILC2比例及数量高于非过敏性哮喘患者<sup>[16]</sup>。且发现给予IL-33刺激时人外周血中ILC2可生成IL-13,同时在成人肺组织中也发现ILC2,证实IL-33可激活ILC2引起肺组织Th2型免疫应答<sup>[17]</sup>。大量研究已证实, ILC2在以嗜酸性粒细胞浸润为特征的过敏性哮喘发病中具有重要作用。

本研究检测显示,支气管哮喘患儿外周血中ILC2细胞比例及Th2型细胞因子水平较正常儿童表达异常,与哮喘严重程度密切相关( $P<0.05$ )。这是由于损伤的气道上皮细胞分泌的IL-33等内源性炎性介质,诱导ILC2细胞大量增殖,引起IL-4, IL-5, IL-13等大量分泌。此外,嗜酸性粒细胞在气道壁聚集分泌大量炎性因子是支气管哮喘的重要标准,其介导的Th2细胞活化及炎症浸润是支气管哮喘气道高反应性及气道炎症的病理基础<sup>[18]</sup>。IL-4与其受体表达可促进抗原激发造成嗜酸性粒细胞聚集,形成气道高反应性,引起气道黏液过度分泌;IL-5通过调节嗜酸性粒细胞的生长、分化及活性,趋化其向气道转移,参与哮喘气道炎症反应;IL-13则通过诱导多种细胞因子表达促进肺部大量嗜酸性粒细胞浸润,且能与炎性因子协同作用,引

起哮喘气道炎症的发生及肺气肿和肺上皮细胞的黏液化生,加重支气管哮喘病理过程<sup>[19-20]</sup>。同时IL-10作为多功能抑制性细胞因子,其表达下降,导致T淋巴细胞应答水平显著上升,促使呼吸道高气道反应性发生改变<sup>[21]</sup>。经对比两组肺功能发现,支气管哮喘患儿肺功能指标较正常儿童显著降低,重度-危重组患儿肺功能指标降低更显著( $P<0.05$ )。相关分析显示,支气管哮喘患儿外周血ILC2细胞比例及Th2型细胞因子水平与其肺功能指标具有显著相关性( $P<0.01$ ),进一步提示ILC2细胞及Th2型细胞因子表达与哮喘患儿病情严重程度及肺功能显著相关,可能由于ILC2细胞分泌的Th2型细胞因子的异常改变影响了炎症反应、呼吸道重塑及平滑肌的增殖,进而影响肺功能发生变化,提示外周血ILC2细胞及Th2型细胞因子参与哮喘发病过程且扮演重要角色。目前针对ILC2的研究提示其参与哮喘气道炎症调控,有望成为哮喘治疗的新靶点,而靶向ILC2活化前后进行的一系列新的治疗方法的尝试为哮喘治疗提供了新的希望<sup>[22]</sup>。然而ILC2调控哮喘的具体作用机制尚未完全明了,其在不同表型哮喘中的作用差异也尚不明确,还需更深入的研究以完善其在哮喘中的作用机制。此外,国内外开展的有关ILCs的一系列相关研究使人们更好更全面地认识了免疫反应在哮喘发病中的重要作用,为研究哮喘发病机制及临床治疗提供了新的方向及路径<sup>[23]</sup>。但目前基于ILCs在哮喘发病中的机制研究有限,其各种亚型在哮喘发病中是否存在相互抑制或协同活化作用,其在机体内具体发挥怎样的作用还有待进一步探索。因此,深入探究ILC2在哮喘中的作用机制,进一步探究其与适应性免疫细胞间的相互关系,明确ILCs的作用,开发更多ILCs通路相关分子抑制药物或拮抗剂,阻断ILCs的活化作用,可为哮喘临床治疗提供新的策略。

综上所述,急性发作期支气管哮喘患儿外周血清中ILC2细胞比例及其相关的Th2型细胞因子水平明显增高或降低,且与哮喘患儿肺功能具有显著线性相关性,对其进行检测有助于评估支气管哮喘患儿病情程度,可为临床治疗提供理论参考。

#### 参考文献:

- [1] 李昌崇,朱丽丽. 儿童支气管哮喘急性发作期治疗进展: 各国支气管哮喘防治指南比较[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(16): 1209-1214.  
LI Changchong, ZHU Lili. Progress in the treatment of childhood bronchial asthma exacerbations: comparison of guidelines for bronchial asthma in different countries[J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2017, 32(16): 1209-1214.

- [2] GRAYSON M H, FELDMAN S, PRINCE B T, et al. 2017年哮喘研究进展:发病机制、生物制剂和遗传学[J]. 杨玲, 刘婷, 译. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2018, 12(6): 75-87.  
GRAYSON M H, FELDMAN S, PRINCE B T, et al. Progress in asthma research in 2017: pathogenesis, biologics and genetics [J]. YANG Ling, LIU Ting, Translation. Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2018, 12 ( 6 ) : 673-685.
- [3] CAMINATI M, PHAM D L, BAGNASCO D, et al. Type 2 immunity in asthma [J]. The World Allergy Organization Journal, 2018, 11(1): 13.
- [4] 高阳, 杨帆. 支气管哮喘患者外周血 Th1, Th2 与 Th17 细胞表达水平及临床意义 [J]. 解放军医药杂志, 2017, 29 ( 1 ) : 76-79.  
GAO Yang, YANG Fan. Expression levels and clinical significances of Th1, Th2 and Th17 in peripheral blood of patients with bronchial asthma[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2017, 29 ( 1 ) : 76-79.
- [5] 渠源, 王硕, 范祖森. ILC 细胞的生物学功能与免疫调节作用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45 ( 9 ) : 897-914.  
QU Yuan, WANG Shuo, FAN Zusen. Research progress on the biological functions and immunoregulatory effects of innate lymphoid cells[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2018, 45(9): 897-914
- [6] 刁渔汉, 李艳, 杨义然, 等. Th2 与 ILC2 细胞在哮喘模型中的数量及产生细胞因子的比较研究 [J]. 微生物学免疫学进展, 2019, 47 ( 1 ) : 26-35.  
DIAO Yuhan, LI Yan, YANG Yiran, et al. Comparison of quantity and cytokine production of Th2 and ILC2 cells in murine models for asthma[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2019, 47 ( 1 ) : 26-35.
- [7] 蒋芹, 张建华. ILC2 参与哮喘发病机制的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2017, 35 ( 2 ) : 148-152.  
JIANG Qin, ZHANG Jianhua. Progress on roles of type 2 innate lymphoid cells in the pathogenesis of asthma[J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2017, 35(2): 148-152.
- [8] 杨丹, 刘碧翠, 刘春涛. II 型固有淋巴细胞及其在支气管哮喘中的作用 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2018, 12 ( 1 ) : 74-80.  
YANG Dan, LIU Bicui, LIU Chuntao. Type II innate lymphoid cells and its role in the pathogenesis of asthma [J]. Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2018, 12 ( 1 ) : 74-80.
- [9] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南 (2016 年版) [J]. 中华儿科杂志, 2016, 54 ( 3 ) : 167-181.  
The Subspecialty Group of Respiratory Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, Chinese Journal of Pediatrics Editorial Board. Guidelines for the diagnosis and prevention of bronchial asthma in children (2016 edition)[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54 ( 3 ) : 167-181.
- [10] 魏勇. 小儿支气管哮喘细胞免疫失衡的研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2019, 34 ( 14 ) : 3375-3378.  
WEI Yong. Research progress of cellular immune imbalance in children with bronchial asthma [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2019, 34 ( 14 ) : 3375-3378.
- [11] 苗青, 王燕, 任亦欣, 等. 支气管哮喘患儿外周血不同 T 淋巴细胞亚群的表达及其临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32 ( 18 ) : 4438-4441.  
MIAO Qing, WANG Yan, REN Yixin, et al. Expressions of different T-cell subsets in peripheral blood of children with bronchial asthma and the clinical significance[J]. Maternal & Child Health Care of China, 2017, 32 ( 18 ) : 4438-4441.
- [12] MEUNIER I, MAROIS I, RICHTER M, et al. SAT0002 innate lymphoid cells(ILCS) are differentially distributed in inflammatory and non-inflammatory joint diseases[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2017, 76(2): 769.
- [13] SMITH S G, CHEN Ruchong, KJARSGAARD M, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016, 137(1): 75.
- [14] GALLE-TREGER L, SUZUKI Y, PATEL N, et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates ILC2-dependent airway hyperreactivity[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13202.
- [15] 王忠平, 胡翠萍, 陆鸣, 等. 血清 IL-35, IL-17 表达水平及 25-羟维生素 D3 水平与哮喘相互关系的临床研究 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35 ( 12 ) : 2231-2234.  
WANG Zhongping, HU Cuiping, LU Ming, et al. Clinical study on the relationship between serum IL-35 and IL-17 expression levels and 25-hydroxyvitamin D3 levels and asthma [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2020, 35 ( 12 ) : 2231-2234.
- [16] 曾智敏, 谭卫平, 黄鑫炎, 等. 2 型固有免疫细胞在过敏性及非过敏性哮喘中的临床意义 [J]. 中山大学学报 (医学版), 2018, 39 ( 4 ) : 532-539.  
ZENG Zhimin, TAN Weiping, HUANG Xinyan, et al. Clinical significance of type 2 innate lymphoid cells in allergic and non-allergic asthma[J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2018, 39 ( 4 ) : 532-539.
- [17] 张鑫, 王伟, 孙英. 上皮源性细胞因子 IL-33, IL-25 和 TSLP 在哮喘发病机制中的作用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2017, 45 ( 5 ) : 53-58.  
ZHANG Xin, WANG Wei, SUN Ying. Roles of epithelial-derived cytokines IL-33, IL-25 and TSLP in the pathogenesis of asthma[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2017, 45 ( 5 ) : 53-58.
- [18] LEE E, LEE S H, KIM Y H, et al. Association of atopy phenotypes with new development of asthma and bronchial hyperresponsiveness in school-aged children[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2017, 118(5): 542-550, e1.
- [19] 范广来, 徐妍, 马希贵, 等. 哮喘患儿血清 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 水平及与肺功能的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30 ( 7 ) : 48-52.  
FAN Guanglai, XU Yan, MA Xigui, et al. Significance



- of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in serum of children with asthma[J]. China Journal of Modern Medicine, 2020,30(7):48-52.
- [20] 曹华, 屠强. 支气管哮喘患者血清 IL-4, IL-10, IL-17 和 IFN- $\gamma$  水平测定及其临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(12):1506-1508.
- CAO Hua, TU Qiang. Determination of serum IL-4, IL-10, IL-17 and IFN- levels in patients with bronchial asthma and its clinical significance [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2018,39(12):1506-1508.
- [21] 战海涛, 范志强, 陈新卫, 等. 血清 IL-6, IL-10 及 TNF- $\alpha$  的水平变化在支气管哮喘患者中的临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2019,23(10):1741-1743.
- ZHAN Haitao, FAN Zhiqiang, CHEN Xinwei, et al. Clinical significance of serum IL-6, IL-10 and TNF- levels in patients with bronchial asthma [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2019,23(10):1741-1743.
- [22] 王丹丹, 柴若楠, 戚菲菲, 等. II 型固有淋巴细胞在支气管哮喘发病机制中作用的研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016,36(8):634-638.
- WANG Dandan, CHAI Ruonan, QI Feifei, et al. Roles of type 2 innate lymphoid cells in the pathogenesis of bronchial asthma[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2016,36(08):634-638.
- [23] 郭旭雪, 聂汉祥, 陈千慧, 等. 固有免疫细胞在支气管哮喘发病中的作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018,34(9):850-855.
- GUO Xuxue, NIE Hanxiang, CHEN Qianhui, et al. Role of innate immune cells in the pathogenesis of bronchial asthma [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2018, 34(9):850-855.
- 收稿日期: 2020-08-05  
修回日期: 2020-08-23

(上接第 11 页) 菌感染治疗后、结核性脑膜炎、真菌感染和颅脑术后等, 需结合病史、患者临床症状及体征和实验室相关检查结果综合考虑。

9.2.7 混合细胞反应型: 有核细胞数中度至显著升高, 镜下可见中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等多种细胞同时存在, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主, 也可伴少量浆细胞、嗜酸性粒细胞的出现。临床意义: 提示炎症反应, 与淋巴-中性粒细胞反应型临床意义基本一致。多见于中枢神经系统细菌感染治疗后、结核性脑膜炎、真菌感染和颅脑术后等, 需结合病史、患者临床症状及体征和实验室相关检查结果综合考虑。部分结核性脑膜炎患者抗结核治疗后, 在相当长一段时间内细胞学可表现为混合细胞反应型, 这一特点对诊断结核性脑膜炎具有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 栗秀初, 孔繁元. 神经系统临床脑脊液细胞学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.
- SU Xiuchu, KONG Fanyuan. Neurologic clinical CSF cytology[M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2001.
- [2] 何俊瑛, 孔繁元, 郭力. 临床脑脊液细胞学 [S]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2007.
- HE Junying, KONG Fanyuan, GUO Li. Clinical cerebrospinal fluid cytology[M]. Shijiazhuang: Hebei Science and Technology Publishing House, 2007.
- [3] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [S]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- SHANG Hong, WANG Yusan, SHEN Ziyu. National guide to clinical laboratory procedures[S]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.
- [4] 张国军. 脑脊液临床实验室检查策略 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- ZHANG Guojun. Strategies for clinical laboratory examination of cerebrospinal fluid[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 662-2020: 临床体液检验技术要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- National Health Commission of the People's Republic of China. WS/T 662-2020: Technical requirements for clinical fluid examination[S]. Beijing: China Standards Press, 2020.
- [6] 龚道元, 张时民, 黄道连. 临床基础检验形态学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- GONG Daoyuan, ZHANG Shimin, HUANG Daolian. Morphology of basic clinical laboratory[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.
- [7] 吴茅. 浆膜积液细胞图谱新解及病例分析 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- WU Mao. New interpretation for atlas of serous effusion and case analysis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
- [8] 张纪云, 龚道元. 临床检验基础 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- ZHANG Jiyun, GONG Daoyuan. Fundamentals of clinical laboratory [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.
- [9] 王建中, 张时民, 刘贵建. 临床检验诊断学图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- WANG Jianzhong, ZHANG Shimin, LIU Guijian. Atlas of clinical laboratory diagnostics[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012.
- [10] 彭明婷. 临床血液与体液检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- PENG Mingting. Clinical laboratory hematology and body fluid analysis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017.
- 收稿日期: 2020-09-20  
修回日期: 2020-10-14

# 陕西省延安地区汉族与国内其他地区育龄妇女 MTHFR 基因 C677T 位点基因型和等位基因分布研究

师文涛, 白蓉, 黄剑林, 雷杰喻

(延安大学附属医院, 陕西延安 716000)

**摘要:**目的 调查并分析延安地区汉族育龄妇女亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) C677T 基因多态性的频率特征, 指导育龄女性合理补充叶酸。方法 选取延安地区延安大学附属医院 12 557 例汉族育龄妇女进行 MTHFR C677T 基因分型检测, 并和国内多地区相关报道进行比较分析。结果 延安地区 MTHFR C677T 位点基因的 CC, CT 和 TT 基因频率分别为 25.5%, 50.4% 和 24.0%, 与尚志、长春、辽源、延边、张家口、怀来、北京、廊坊、涿水、烟台、淄博、潍坊、新乡、济源、郑州、镇江、麻城、德阳、郫县、南充、武汉、遂宁、英山、荆州、松滋、眉山、绍兴、九江、长沙、湘潭、昆明、河源、广州、惠州、南宁、珠海和琼海比较差异均有统计学意义 ( $\chi^2=8.01\sim 1\ 167.916$ ,  $P < 0.05$ ), 与乌鲁木齐比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=4.602$ ,  $0.640$ ,  $P > 0.05$ ); MTHFR C677T 等位基因分布与基因型分布情况类似。结论 延安地区汉族育龄妇女 MTHFR C677T 基因多态性分布特征与其他地区相比, 存在差异, 且具有地域特异性。

**关键词:** 叶酸; 基因多态性; 亚甲基四氢叶酸还原酶; 出生缺陷

中图分类号: R446.112; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-078-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.019

## Comparative Study on MTHFR Gene C677T Locus Genotype and Allele Distribution between Han Nationality and Women of Childbearing Age in Yan'an Area of Shaanxi Province

SHI Wen-tao, BAI Rong, HUANG Jian-lin, LEI Jie-yu

(the Affiliated Hospital of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

**Abstract: Objective** To investigate and analyze the frequency characteristics of MTHFR C677T gene polymorphism in women of childbearing age in Han nationality in Yan'an area, and guide women of childbearing age to reasonably supplement folic acid. **Methods** A total of 12 557 Han women of childbearing age in the Affiliated Hospital of Yan'an University in Yan'an were selected for MTHFR C677T genotyping, and the results were compared with the related reports in many regions in China. **Results** The frequencies of CC, CT, and TT genes of MTHFR C677T loci in Yan'an area were 25.5%, 50.4% and 24.0%, respectively, with Shangzhi, Changchun, Liaoyuan, Yanbian, Zhangjiakou, Huailai, Beijing, Langfang, Laishui, Yantai, Zibo, Weifang, Xinxiang, Jiyuan, Zhengzhou, Zhenjiang, Macheng, Deyang, Pixian, Nanchong, Wuhan, Suining, Yingshan, Jingzhou, Songzi, Meishan, Shaoxing, Jiujiang, Changsha, Xiangtan, Kunming, Heyuan, Guangzhou and Huizhou. The differences between Nanning, Zhuhai and Qionghai were statistically significant ( $\chi^2=8.01\sim 1\ 167.916$ , all  $P < 0.05$ ), but no significant difference compared with Urumqi ( $\chi^2=4.602$ ,  $0.640$ ,  $P > 0.05$ ). The distribution of MTHFR C677T alleles was similar to the distribution of genotypes. **Conclusion** Compared with other regions, the distribution characteristics of MTHFR C677T gene polymorphism in women of childbearing age in Yan'an area were different, and they were geographically specific.

**Keywords:** folic acid; gene polymorphism; MTHFR; birth defects

叶酸是一种水溶性维生素, 其分子小, 又称为维生素 B<sub>9</sub>, 其主要以离子形式参与人体的细胞增殖、基因活性调节、红细胞和白细胞的产生、皮肤和肠系膜代谢, 是调节大脑功能化学物质的合成等多种重要生化过程的必须化合物; 叶酸既可以化学合成也可以天然获得<sup>[1]</sup>; 育龄妇女适当的补充叶酸可有效预防出生缺陷的发生<sup>[2]</sup>。

5,10- 亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 是叶酸代谢通路中的关键酶。MTHFR C677T 是目前发现 MTHFR 最常见的突变位点, 存在 CC, CT 和 TT 三种基因型, 基因位点多态性影响着其编码的酶活性、血清和红细胞叶酸浓度以及血浆 Hcy 浓度的变化<sup>[3-4]</sup>。2017 年《围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南》中提

作者简介: 师文涛 (1989-), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为细胞分子生物学, E-mail: 2446595166@qq.com。

通讯作者: 雷杰喻 (1987-), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为分子诊断学, E-mail: 381961574@qq.com。

出,育龄妇女每日服用叶酸降低新生儿出生缺陷率,并建议 MTHFR C677T 位点 TT 基因型患者应当酌情增加叶酸补充剂量或延长孕前补充时间<sup>[5]</sup>。相关研究表明,MTHFR 基因突变导致新生儿发生出生缺陷概率为 13.4%,并有逐年上升的趋势<sup>[6]</sup>。MTHFR C677T 基因在不同国家、地区、民族的分布具有明显差异,亚洲居中且占 2.5%~36%。目前国内其他地区关于育龄妇女 MTHFR C677T 基因多态性的地域分布报道很多,但延安地区还未见有大数据的相关研究。本研究以陕西省延安地区汉族女性为研究对象,通过探讨 12 557 例延安地区育龄妇女 MTHFR C677T 基因分布特征,旨在为本地区育龄妇女预防 MTHFR C677T 基因突变引起的新生儿出生缺陷及其相关疾病提供参考依据,指导育龄妇女科学补服叶酸。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取对象为 2015 年 1 月~2020 年 6 月期间,到延安大学附属医院进行孕检的 12 557 例汉族女性,全部来自于陕西省延安市,年龄 15~49 岁,平均年龄  $29.02 \pm 5.21$  岁。本研究已通过医院伦理委员会批准同意,患者具有知情权并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 核酸提取及纯化试剂、免疫显色试剂、MTHFR C677T 基因检测试剂盒均由上海百傲科技股份有限公司提供,严格按照检验试剂盒说明书操作。

1.3 方法 采集研究对象乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血,提取 DNA,完全按照 MTHFR 基因检测标准操作规程进行操作。采用 DNA 微阵列芯片法进行 PCR 扩增,反应体系 22  $\mu$ l,反应条件:50℃ 5min; 94℃ 5min; 94℃ 25s, 56℃ 25s, 72℃ 25s, 35 个循环; 72℃ 5min。反应完成后,利用 PCR-芯片杂交法检测,并应用分析软件识读芯片的基因分型,确定其结果。

1.4 统计学分析 采用 Excel 2019, SPSS18.0 软件进行数据整理和统计学分析。计数资料采用率(%)表示,卡方检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 延安地区育龄妇女 MTHFR C677T 基因 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析 见表 1。MTHFR C677T 有 CC, CT, TT 三种基因型。研究群体 MTHFR C677T 基因多态性分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,说明数据来自同一孟德尔群体。

2.2 延安地区与国内其他地区育龄妇女 MTHFR 基因 C677T 位点基因型和等位基因分布 见表 2。延安地区女性 MTHFR C677T 各基因型分布和基因

频率分布情况与尚志、长春、辽源、延边、张家口、怀来、北京、廊坊、涿水、烟台、淄博、潍坊、新乡、济源、郑州、镇江、麻城、德阳、郫县、南充、武汉、遂宁、英山、荆州、松滋、眉山、绍兴、九江、长沙、湘潭、昆明、河源、广州、惠州、南宁、珠海、琼海<sup>[7-8,10-43]</sup>的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),与乌鲁木齐<sup>[9]</sup>比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。从各地区 MTHFR C677T 基因型分布整体来看,纯合突变型 TT 呈现北高南低的趋势(见图 1);并且各个地区 T 等位基因频率呈现随着纬度下降而下降的趋势(见图 2)。

表 1 研究群体 MTHFR C677T 位点遗传平衡分析

类别	基因型			$\chi^2$	P
	CC	CT	TT		
实际频数	3208	6331	3018		
理论频数	3 239.706	6 278.500	3 038.794	0.446	> 0.05
基因频率	0.255	0.504	0.240		

## 3 讨论

出生缺陷在我国较为常见,每年新增出生缺陷人数约 90 万。我国常见的出生缺陷包括神经管缺陷、唇腭裂、先天性心脏病、唐氏综合征等。导致出生缺陷发生的因素非常复杂,一般认为出生缺陷的发生受环境、营养摄入情况、遗传等因素共同影响<sup>[45-46]</sup>。近年来,遗传因素影响越来越受人们重视。随着基因测序技术的发展,针对出生缺陷的病因学从分子层面进行的研究逐渐深入,补充叶酸预防出生缺陷已达成共识。如能孕前补充适宜剂量叶酸可降低出生缺陷的发生,减轻因患儿出生缺陷所致家庭、社会负担及降低大量医疗费用支出<sup>[5]</sup>。

本研究通过开展 MTHFR C677T 基因多态性的地区特征研究,发现延安地区 MTHFR C677T 基因型 CC, CT, TT 的频率分别为 25.5%, 50.4% 和 24.0%。叶酸代谢关键酶 MTHFR C677T 基因多态性会影响酶的活性,可介导同型半胱氨酸在人体内清除,促进 DNA 甲基化反应。有临床研究表明,MTHFR C677T TT 型较 CC 型酶活性降低 60%~70%;在摄入等剂量叶酸情况下,TT 型相比 CT, CC 型个体血清叶酸水平降低 20% 左右<sup>[47]</sup>;在血清叶酸浓度低时,TT 型相比 CT, CC 型个体同型半胱氨酸高 30% 左右<sup>[48]</sup>。MTHFR C677T 等位基因的突变与其他各地区存在差异,具有地域特异性。根据数据分析得出,北方城市 T 等位基因频率高于南方城市,该研究结果与向长港等<sup>[33]</sup>人研究结果一致。MTHFR C677T 基因多态性可能受地形地貌、气候、生活习惯、饮食等因素影响,经过较长时间的基因突变形成的结果。然而,基因多态性



的发生是由于哪些主要因素决定, 需要今后更精细 的调查研究。

表2 不同地区 MTHFR 等位基因型频数和基因频率分布特征 [n(%)]

城市	MTHFR C677T 基因型频率			$\chi^2$	MTHFR C677T 基因频率		$\chi^2$
	CC	CT	TT		C	T	
延安	3 208(25.5)	6 331(50.4)	3 018(24.0)		12 747(50.8)	12 367(49.2)	
尚志 <sup>[7]</sup>	78(17.1)	240(52.7)	137(30.1)	19.438 <sup>a</sup>	396(43.5)	514(56.5)	18.415 <sup>a</sup>
长春 <sup>[8]</sup>	648(19)	1 676(49.2)	1 081(31.7)	109.908 <sup>a</sup>	2 972(43.6)	3 838(56.4)	108.502 <sup>a</sup>
乌鲁木齐 <sup>[9]</sup>	39(32.8)	49(41.2)	31(26.1)	4.602	127(53.4)	111(46.6)	0.640
辽源 <sup>[10]</sup>	57(18.6)	161(52.6)	88(28.8)	8.682 <sup>a</sup>	275(44.9)	337(55.1)	8.101 <sup>a</sup>
延边 <sup>[11]</sup>	551(21)	1 253(47.8)	816(31.1)	64.161 <sup>a</sup>	2 355(44.9)	2 885(55.1)	58.617 <sup>a</sup>
张家口 <sup>[12]</sup>	158(18.4)	429(49.9)	273(31.7)	36.069 <sup>a</sup>	745(43.3)	975(56.7)	35.668 <sup>a</sup>
怀来 <sup>[13]</sup>	109(20.7)	255(48.4)	163(30.9)	15.026 <sup>a</sup>	473(44.9)	581(55.1)	13.990 <sup>a</sup>
北京 <sup>[14]</sup>	912(23.1)	1 976(50.1)	1 057(26.8)	16.416 <sup>a</sup>	3 800(48.2)	4 090(51.8)	16.164 <sup>a</sup>
廊坊 <sup>[15]</sup>	220(17.4)	617(48.7)	430(33.9)	77.021 <sup>a</sup>	1 057(41.7)	1 477(58.3)	75.305 <sup>a</sup>
涿水 <sup>[16]</sup>	100(12.9)	380(48.8)	298(38.3)	107.933 <sup>a</sup>	580(37.3)	976(62.7)	106.522 <sup>a</sup>
烟台 <sup>[17]</sup>	497(29.8)	313(18.7)	860(51.5)	734.556 <sup>a</sup>	1 307(39.1)	2 033(60.9)	159.373 <sup>a</sup>
淄博 <sup>[18]</sup>	130(12.5)	457(43.9)	454(43.6)	219.272 <sup>a</sup>	717(34.4)	1 365(65.6)	204.812 <sup>a</sup>
潍坊 <sup>[19]</sup>	442(15.1)	1 354(46.1)	1 138(38.8)	312.581 <sup>a</sup>	2 238(38.1)	3 630(61.9)	303.226 <sup>a</sup>
新乡 <sup>[20]</sup>	201(14.9)	625(46.2)	526(38.9)	167.032 <sup>a</sup>	1 027(38.0)	1 677(62.0)	159.394 <sup>a</sup>
济源 <sup>[21]</sup>	82(14.5)	271(48.0)	211(37.4)	65.936 <sup>a</sup>	435(38.6)	693(61.4)	64.195 <sup>a</sup>
郑州 <sup>[22]</sup>	198(18.1)	493(45.1)	402(36.8)	93.124 <sup>a</sup>	889(40.7)	1 297(59.3)	81.871 <sup>a</sup>
镇江 <sup>[23]</sup>	877(30.4)	1 378(47.8)	630(21.8)	28.974 <sup>a</sup>	3 132(54.3)	2 638(45.7)	23.329 <sup>a</sup>
麻城 <sup>[24]</sup>	148(41.7)	164(46.2)	43(12.1)	56.534 <sup>a</sup>	460(64.8)	250(35.2)	54.411 <sup>a</sup>
德阳 <sup>[25]</sup>	1 047(40.7)	1 171(45.5)	355(13.8)	284.908 <sup>a</sup>	3 265(63.4)	1 881(36.6)	276.078 <sup>a</sup>
郫县 <sup>[26]</sup>	1 887(38.8)	2 243(46.1)	735(15.1)	353.136 <sup>a</sup>	6 017(61.8)	3 713(38.2)	346.633 <sup>a</sup>
南充 <sup>[27]</sup>	1 626(40.9)	1 798(45.2)	556(14.0)	400.772 <sup>a</sup>	5 050(63.4)	2 910(36.6)	391.342 <sup>a</sup>
武汉 <sup>[28]</sup>	1 069(56.3)	367(19.3)	463(24.4)	871.269 <sup>a</sup>	2 505(66.0)	1 293(34.0)	305.783 <sup>a</sup>
遂宁 <sup>[29]</sup>	928(43.1)	968(45.0)	255(11.9)	335.448 <sup>a</sup>	2 824(65.6)	1 478(34.4)	326.734 <sup>a</sup>
英山 <sup>[30]</sup>	136(42.6)	145(45.50)	38(11.9)	55.754 <sup>a</sup>	417(65.4)	221(34.6)	53.106 <sup>a</sup>
荆州 <sup>[31]</sup>	804(38.8)	974(47.0)	296(14.3)	192.570 <sup>a</sup>	2 582(62.2)	1 566(37.8)	188.436 <sup>a</sup>
松滋 <sup>[32]</sup>	429(39.8)	482(44.8)	166(15.4)	113.820 <sup>a</sup>	1 340(62.2)	814(37.8)	104.210 <sup>a</sup>
眉山 <sup>[33]</sup>	238(36.3)	302(46.0)	116(17.7)	40.524 <sup>a</sup>	778(59.3)	534(40.7)	36.414 <sup>a</sup>
绍兴 <sup>[34]</sup>	480(40.5)	531(44.8)	173(14.6)	138.712 <sup>a</sup>	1 491(63.0)	877(37.0)	129.171 <sup>a</sup>
九江 <sup>[35]</sup>	765(41.6)	835(45.4)	239(13.0)	244.234 <sup>a</sup>	2 365(64.3)	1 313(35.7)	236.01 <sup>a</sup>
长沙 <sup>[36]</sup>	418(40.9)	467(45.7)	136(13.3)	134.566 <sup>a</sup>	1 303(63.8)	739(36.2)	128.867 <sup>a</sup>
湘潭 <sup>[37]</sup>	725(42.6)	762(44.8)	214(12.6)	254.54 <sup>a</sup>	2 212(65.0)	1 190(35.0)	244.431 <sup>a</sup>
昆明 <sup>[38]</sup>	116(39.1)	139(46.8)	42(14.1)	33.16 <sup>a</sup>	371(62.5)	223(37.5)	31.794 <sup>a</sup>
河源 <sup>[39]</sup>	821(57.7)	496(34.9)	106(7.4)	679.064 <sup>a</sup>	2 138(75.1)	708(24.9)	609.651 <sup>a</sup>
广州 <sup>[40]</sup>	578(51.4)	463(41.2)	83(7.4)	393.472 <sup>a</sup>	1 619(72.0)	629(28.0)	374.08 <sup>a</sup>
惠州 <sup>[41]</sup>	186(51.8)	134(37.3)	39(10.9)	129.146 <sup>a</sup>	506(70.5)	212(29.5)	108.622 <sup>a</sup>
南宁 <sup>[42]</sup>	293(59.4)	162(32.9)	38(7.7)	286.412 <sup>a</sup>	748(75.9)	238(24.1)	239.473 <sup>a</sup>
珠海 <sup>[43]</sup>	1 288(60.2)	728(34.1)	122(5.7)	1 107.916 <sup>a</sup>	3 304(77.3)	972(22.7)	1 036.121 <sup>a</sup>
琼海 <sup>[44]</sup>	756(61.9)	390(31.9)	75(6.1)	748.165 <sup>a</sup>	1 902(77.9)	540(22.1)	657.897 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup>  $P < 0.05$ 。

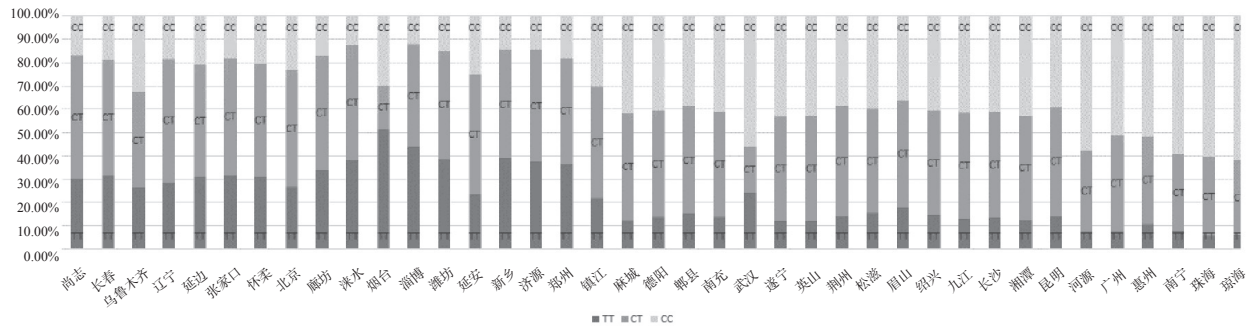


图1 各地区人群中 MTHFR 基因 C677T 位点多态性分布

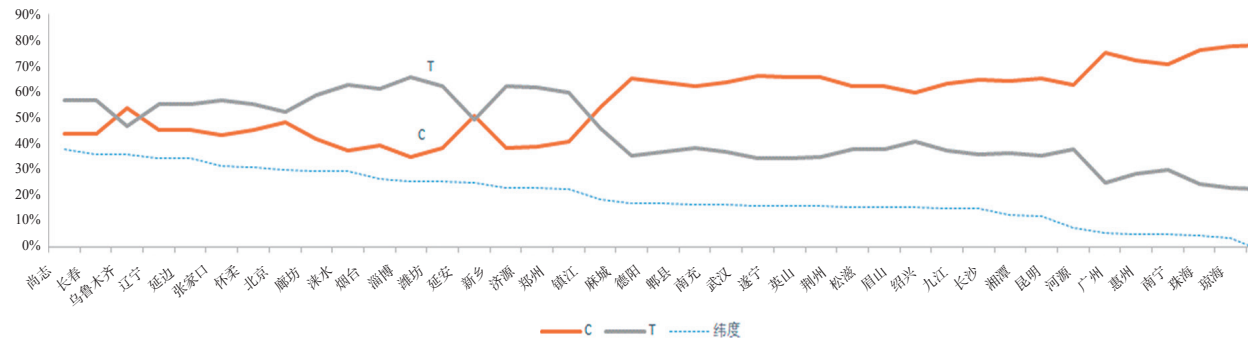


图2 各个地区 MTHFR C677T 位点等位基因 (C,T) 随纬度变化趋势

叶酸主要存在于植物的叶绿体中,高温会导致大量失活,我国饮食主要以烹饪为主,所以实际能被人体吸收、利用的叶酸有限。孕期妇女对叶酸需求量大,甚至需要翻倍补充,一部分人由于 MTHFR C677T 基因位点突变导致叶酸利用转化能力下降,这样极易出现叶酸缺乏。

国外有研究发现,将叶酸加入面粉中,提高公众叶酸的摄入量,可以有效预防新生儿出生缺陷的发生<sup>[49]</sup>。速存梅等<sup>[50]</sup>人证实农村妇女血清叶酸及红细胞叶酸水平明显低于城市育龄妇女,神经管畸形患儿出生率农村高于城市;有研究专门针对农村妇女进行随机对照实验,结果表明,每次服用 0.4mg 叶酸,1 次/天,服用至少 3 个月,或者每次服用 4mg 叶酸,1 次/天,服用 1 个月以上时,红细胞叶酸浓度才能达到预防神经管畸形的有效水平<sup>[51]</sup>。

综上所述,针对育龄妇女 MTHFR C677T 不同基因型并结合患者孕产史、家族史等因素综合评估风险,并按照个体化原则参考血液同型半胱氨酸水平和红细胞叶酸浓度,酌情增加补充叶酸剂量或延长孕前增补时间。同时,建议育龄妇女多食用含叶酸的食物,养成健康规律的生活方式。因此,基于该地区研究结果,了解 MTHFR C677T 与叶酸利用代谢的关系,为临床医生指导地区人群补充叶酸提供基础理论依据;也为降低本地区出生缺陷及制定公共卫生政策提供遗传学数据。

#### 参考文献:

- [1] MARCHETTI C, PALAIA I, GIORGINI M, et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent

- ovarian cancer: a review[J]. *Onco Targets and therapy*, 2014, 2014 (7): 1223-1236.
- [2] CRIDER K S, QI Yanping, DEVINE O, et al. Modeling the impact of folic acid fortification and supplementation on red blood cell folate concentrations and predicted neural tube defect risk in the United States: have we reached optimal prevention[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2018, 107(6): 1027-1034.
- [3] 张燕, 王伟红, 郝万鹏. 乌鲁木齐汉族妇女亚甲基四氢叶酸还原酶基因变异与血清叶酸和同型半胱氨酸水平的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(5): 98-100, 105.
- [4] ZHANG Yan, WANG Weihong, HAO Wanpeng. Study on the correlation between the variation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and folate and homocysteine in Urumqi han women[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(5): 98-100, 105.
- [5] 李雅静, 张瑞, 吴欣, 等. H 型高血压并发缺血性脑卒中患者 MTHFR C677T 基因多态性及血清 Hcy 水平的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(2): 9-13.
- LI Yajing, ZHANG Rui, WU Xin, et al. Relationship between MTHFR C677T gene polymorphisms and serum Hcy level in H type hypertension with ischemic stroke[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(2): 9-13.
- [5] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南(2017)[J]. *中国生育健康杂志*, 2017, 28(5): 401-410.
- The Folic Acid Supplementation Working Group, Birth Defects Prevention and Molecular Genetics Branch, China Maternal and Child Health Association. Guideline for the prevention of neural tube defects by periconceptional folic acid supplementation (2017) [J].

- Chinese Journal of Reproductive Health, 2017, 28 (5): 401-410.
- [6] 卓倩, 洪安澜, 马彩玲. 胚胎停育相关危险因素的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25 (2): 5-7. ZHUO Qian, HONG Anlan, MA Cailin. Research progress of related risk factors of embryo damage [J]. Chinese Journal of Eugenics and Genetics. 2017, 25 (2): 5-7.
- [7] 马路密, 鲁衍强, 李瑛, 等. 尚志市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性调查 [J]. 实用预防医学, 2015, 22 (3): 289-291. MA Lumi, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Genetic polymorphisms of MTHFR and MTRR among the Han women in Shangzhi City [J]. Practical Preventive Medicine, 2015, 22 (3): 289-291.
- [8] 田红雨, 鲁衍强, 付敏, 等. 长春市汉族妇女 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32 (9): 1962-1965. TIAN Hongyu, LU Yanqiang, FU Min, et al. Study on the distributions of MTHFR and MTRR gene polymorphisms in Han women in Changchun city [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2017, 32 (9): 1962-1965.
- [9] 郝友瑛, 鲁衍强, 李瑛, 等. 乌鲁木齐市汉族人群叶酸代谢通路关键酶基因 MTHFR, MTRR 单核苷酸多态性分布特征调查 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31 (18): 3772-3775. HAO Youying, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Investigation on distribution characteristics of single nucleotide polymorphisms of folic acid pathway key enzymes-MTHFR and MTRR genes among Han population in Urumqi [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2016, 31 (18): 3772-3775.
- [10] 李桂华, 鲁衍强, 李瑛, 等. 辽源市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 的遗传多态性分析 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31 (10): 2130-2132. LI Guihua, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Analysis on genetic polymorphisms of MTHFR and MTRR among Han women in Liaoyuan city [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2016, 31 (10): 2130-2132.
- [11] 于延辉, 鲁衍强, 李瑛, 等. 延边朝鲜族自治州汉族女性和朝鲜族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (5): 7-9. YU Yanhui, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Study on the polymorphism distribution of MTHFR and MTRR genes in Han women and Korean women in Yanbian Korean Autonomous prefecture [J]. Journal of Practical Medicine, 2014, 30 (5): 7-9.
- [12] 高峡, 鲁衍强, 马少杰, 等. 张家口地区汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22 (11): 35-37. GAO Xia, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms among the Han gestational age women in Zhangjiakou city [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2014, 22 (11): 35-37.
- [13] 付效霞, 詹书情, 付敏, 等. 怀来地区汉族育龄女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27 (8): 904-907. FU Xiaoxia, ZHAN Shuqing, FU Min, et al. Study on the genetic polymorphism of the Han nationality in Huailai county [J]. Chinese Journal of Eugenics and Genetics, 2019, 27 (8): 904-907.
- [14] 李丹丹, 叶阿里, 甘勇, 等. 北京地区汉族人群 MTHFR C677 T 基因多态性分析 [J]. 临床检验杂志, 2019, 37 (2): 156-160. LI Dandan, YE Ali, GAN Yong, et al. Analysis for polymorphism of MTHFR C677T gene in Han population in Beijing [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2019, 37 (2): 156-160.
- [15] 李俊华, 鲁衍强, 马少杰, 等. 廊坊市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分析 [J]. 基础医学与临床, 2014, 34 (11): 1564-1565. LI Junhua, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Polymorphism analysis of MTHFR and MTRR genes in Han women in Langfang [J]. Basic & Clinical Medicine, 2014, 34 (11): 1564-1565.
- [16] 靳慧云, 鲁衍强, 付敏, 等. 保定市涞水县汉族女性 MTHFR、MTRR 基因型与等位基因频率分布和其他地区汉族女性的比较 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31 (21): 4500-4503. JIN Huiyun, LU Yanqiang, FU Min, et al. Comparison of distributions of MTHFR and MTRR genotypes and alleles frequencies between Han women in Laishui county of Baoding city and Han women in other areas [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2016, 31 (21): 4500-4503.
- [17] 严倩, 鲁衍强, 李瑛, 等. 烟台市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性的分布特征 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2014, 52 (1): 79-84. YAN Qian, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTRR in women of Chinese Han population in Yantai city [J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2014, 52 (1): 79-84.
- [18] 从玉英, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 淄博市汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究 [J]. 现代妇产科进展, 2012, 21 (10): 779-781. CONG Yuying, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Study on the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase polymorphism among the Han women in Zibo City [J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2012, 21 (10): 779-781.
- [19] 贺宪民, 张群, 杨琦, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性研究 [J]. 中国计划生育学杂志, 2010, 18 (1): 13-18. He Xianmin, Zhang Qun, Yang Qi, et al. Study on the gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2010, 18 (1): 13-18.
- [20] 卢光荣, 鲁衍强, 马少杰, 等. 新乡市汉族孕龄女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性研究 [J]. 河南医学研究, 2014, 23 (7): 7-10. LU Guangrong, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTRR gene among the Han gestational age women in Xinxiang city [J]. Henan



- Medical Research, 2014, 23(7): 7-10.
- [21] 陈小利, 鲁衍强, 马少杰, 等. 山东省济南市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 中国妇幼卫生杂志, 2014, 5(4): 17-20.  
CHEN Xiaoli, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Study on the distribution of gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase among Han women in Jiyuan city [J]. Chinese Journal of Women and Children Health, 2014, 5(4): 17-20.
- [22] 顾利, 鲁衍强, 薛琰, 等. 郑州市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(4): 786-788.  
GU Li, LU Yanqiang, XUE Yan, et al. Study on the polymorphisms of MTHFR gene and MTRR gene in the women of Han nationality in Zhengzhou city [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2017, 32(4): 786-788.
- [23] 杨彦, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 镇江市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2012, 32(9): 1250-1253.  
YANG Yan, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Study on the MTHFR and MTRR polymorphism among the Han women in Zhenjiang city [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science), 2012, 32(9): 1250-1253.
- [24] 李宏魁, 雷明星, 熊文涛, 等. 麻城地区汉族育龄女性 MTHFR, MTRR 基因多态性分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(10): 1174-1176, 1188.  
LI Hongkui, LEI Mingxing, XIONG Wentao, et al. Analysis of MTHFR and MTRR gene polymorphisms in reproductive age han nationality women of macheng [J]. Chinese Journal of Eugenics and Genetics, 2019, 27(10): 1174-1176, 1188.
- [25] 张勇, 朱正英, 王玮, 等. 四川德阳地区汉族女性人群 MTHFR 和 MTRR 基因多态性研究 [J]. 中国循证医学杂志, 2012, 12(6): 631-634.  
ZHANG Yong, ZHU Zhengying, WANG Wei, et al. Polymorphism of MTHFR and MTRR among Han women in Sichuan [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2012, 12(6): 631-634.
- [26] 贾小平, 鲁衍强, 马少杰, 等. 成都市郫县汉族女性 MTHFR, MTRR 基因多态性分布研究 [J]. 皖南医学院学报, 2015, 34(4): 317-321.  
JIA Xiaoping, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase in Han ethnic women in Pixian county of Chengdu city [J]. Acta Academiae Medicinae Wannan, 2015, 34(4): 317-321.
- [27] 邢晏, 冯长焕, 杜利君. 南充地区女性亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析 [J]. 邵阳学院学报 (自然科学版), 2019, 16(5): 49-55.  
XING Yan, FENG Changhuan, DU Lijun. Polymorphism analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene female in Nanchong area [J]. Journal of Shaoyang University (Natural Science Edition), 2019, 16(5): 49-55.
- [28] 蒋捷, 王富乾, 马浩然, 等. 武汉地区汉族人群 MTHFR 基因多态性的分布研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(1): 57-60.  
JIANG Jie, WANG Fuqian, MA Haoran, et al. MTHFR polymorphism among the Hans in Wuhan [J]. Central South Pharmacy, 2017, 15(1): 57-60.
- [29] 向玉, 赵琪林, 刘玉林, 等. 遂宁地区育龄妇女亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性研究 [J]. 现代医药卫生, 2019, 35(14): 2108-2109, 2112.  
XIANG Yu, ZHAO Qilin, LIU Yulin, et al. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene in women of childbearing age in Suining region [J]. Modern Medicine and Health, 2019, 35(14): 2108-2109, 2112.
- [30] 徐小惠, 鲁衍强, 李瑛, 等. 湖北省英山县汉族女性 MTHFR 和 MTRR 的遗传多态性分析 [J]. 中国妇幼保健研究, 2016, 27(2): 252-255.  
XU Xiaohui, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Analysis of genetic polymorphism of MTHFR and MTRR of Han nationality females in Yingshan County, Hubei Province [J]. Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2016, 27(2): 252-255.
- [31] 田宇, 鲁衍强, 马少杰, 等. 荆州市汉族孕龄女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布 [J]. 重庆医学, 2014, 43(8): 128-130.  
TIAN Yu, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Distribution of polymorphisms of MTHFR and MTRR genes in pregnant women of Han nationality in Jingzhou city [J]. Chongqing Medicine, 2014, 43(8): 128-130.
- [32] 罗秀莉, 鲁衍强, 郭文竹, 等. 湖北松滋市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分布 [J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(2): 29-32.  
LUO Xiuli, LU Yanqiang, GUO Wenzhu, et al. Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms among the han gestational age women in Songzi city [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2014, 25(2): 29-32.
- [33] 向长港, 鲁衍强, 马少杰, 等. 眉山市 656 例汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分析 [J]. 山东医药, 2015, 55(14): 22-25.  
XIANG Changgang, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Analysis of MTHFR and MTRR gene polymorphisms of Han women in 656 cases [J]. Shandong Medical Journal, 2015, 55(14): 22-25.
- [34] 陈宝娟, 陈瑜, 谢明聪, 等. 绍兴地区育龄女性叶酸利用能力基因多态性研究 [J]. 现代妇产科进展, 2019, 28(6): 428-430.  
CHEN Baowei, CHEN Yu, XIE Mingcong, et al. Genetic polymorphism of folate utilization ability of reproductive age women in Shaoxing [J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2019, 28(6): 428-430.
- [35] 方园, 鲁衍强, 薛琰, 等. 九江市汉族女性 MTHFR, MTRR 基因型和等位基因频率分布与其他地区汉族女性的比较 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(11): 1732-1735.  
FANG Yuan, LU Yanqiang, XUE Yan, et al. Comparison of distributions of MTHFR and MTRR genotypes and alleles frequencies between Han women in Jiujiang city and Han women in the other areas [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2015, 30(11): 1732-1735.
- [36] 吴丹, 鲁衍强, 薛琰, 等. 长沙县汉族女性

- MTHFR, MTRR 基因型及其等位基因频率分布与其他地区汉族女性的比较[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(9): 1907-1910.
- WU Dan, LU Yanqiang, XUE Yan, et al. Comparison of distributions of MTHFR and MTRR genotypes and alleles between Han women in Changsha County and Han women in other areas[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(9): 1907-1910.
- [37] 王淑媛, 鲁衍强, 马少杰, 等. 湘潭市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布及其与血浆 Hcy 水平的关系[J]. 天津医药, 2014, 42(12): 1205-1209.
- WANG Shuyuan, LU Yanqiang, MA Shaojie, et al. Relationship of Plasma Homocysteine with Gene Polymorphisms of MTHFR and MTRR among Han women in Xiangtan City[J]. Tianjin Medical Journal, 2014, 42(12): 1205-1209.
- [38] 万莉娟, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 云南省汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(5): 46-50.
- WAN Lijuan, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Study on Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase polymorphisms among the Han women in Yunnan province[J]. China Journal of Modern Medicine, 2013, 23(5): 46-50.
- [39] 熊爱群, 付敏, 徐州栋, 等. 河源地区汉族女性 MTHFR 基因多态性调查及其与血清 HCY 水平相关性的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(7): 774-776, 810.
- XIONG Aiqun, FU Min, XU Zhoudong, et al. Relationship of homocysteine with gene polymorphisms of MTHFR among Han women in Heyuan area[J]. Chinese Journal of Eugenics and Genetics, 2019, 27(7): 774-776, 810.
- [40] 尹爱华, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 广东省女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(增刊): 44-46.
- YIN Aihua, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Study on the polymorphism distribution of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase genes in females from Guangdong province[J]. China Public Health, 2012, 28 (Supplement): 44-46.
- [41] 高利洁, 鲁衍强, 芮欣忆, 等. 惠州汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶的基因多态性分布[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2013, 34(1): 140-143.
- GAO Lijie, LU Yanqiang, RUI Xinyi, et al. Polymorphism distribution of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase among the Han women in Huizhou[J]. Journal of Sun Yat-sen University(Medical Sciences), 2013, 34(1): 140-143.
- [42] 蒋武, 鲁衍强, 李瑛, 等. 南宁市壮族和汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因单核苷酸多态性比较[J]. 广西医学, 2014, 36(11): 1517-1519.
- JIANG Wu, LU Yanqiang, LI Ying, et al. A comparison of single nucleotide polymorphisms of MTHFR and MTRR in women between Chinese Zhuang and Han population in Nanning city[J]. Guangxi Medical Journal, 2014, 36(11): 1517-1519.
- [43] 尹保民, 鲁衍强, 汤萍, 等. 珠海市汉族女性 MTHFR, MTRR 基因多态性调查[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(11): 2348-2351.
- YIN Baomin, LU Yanqiang, TANG Ping, et al. Survey on MTHFR and MTRR gene polymorphisms among Han women in Zhuhai city[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(11): 2348-2351.
- [44] 颜珠苗, 鲁衍强, 李瑛, 等. 琼海市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布研究[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(1): 18-20, 24.
- YAN Zhumiao, LU Yanqiang, LI Ying, et al. Polymorphisms of MTHFR and MTRR among the Han nationality women in Qionghai city[J]. Journal of Hainan Medical College, 2013, 19(1): 18-20, 24.
- [45] NAUMAN N, JALALI S, SHAMI S, et al. Low maternal folate concentrations and maternal MTHFR C677T polymorphism are associated with an increased risk for neural tube defects in offspring: a case-control study among Pakistani case and control mothers[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2018, 27(1): 253-260.
- [46] 黄娟娟, 岳红云, 张娟. MTHFR(C677T, A1298C 和 G1793A) 基因多态性对死胎的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 72-76.
- HUANG Juanjuan, YUE Hongyun, ZHANG Juan. Effect of MTHFR (C677T, A1298C and G1793A) gene polymorphism on stillbirth[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 72-76.
- [47] NISHIO K, GOTO Y, KONDO T, et al. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake[J]. Journal of Epidemiology, 2008, 18(3): 125-131.
- [48] DE BREE A, VERSCHUREN WM, BJRKE MONSEN A L, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677CT mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(3): 687-693.
- [49] BAR-OZ B, KOREN G, NGUYEN P, et al. Folate fortification and supplementation-are we there yet[J]. Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.), 2008, 25(4): 408-412.
- [50] 速存梅, 叶汉凤, 王珏, 等. 育龄妇女血清叶酸及红细胞叶酸水平检测分析[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2012, 8(6): 700-703.
- SU Cunmei, YE Hanfeng, WANG Yu, et al. Detection and analysis of serum folate and erythrocyte folate levels in women of childbearing age[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine of Women and Children (Electronic Version), 2012, 8(6): 700-703.
- [51] HAO Ling, YANG Quanhe, LI Zhu, et al. Folate status and homocysteine response to folic acid doses and withdrawal among young Chinese women in a large-scale randomized double-blind trial[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 88(2): 448-457.

# 血清中 microRNA-106b 对宫颈癌患者的 早期诊断及预后预测价值

高红敏<sup>1</sup>, 杨红英<sup>2</sup>, 刘鑫<sup>3</sup>

(1. 西安市第四医院妇产科, 西安 710004; 2. 西安市第九医院妇产科, 西安 710000;

3. 西安大兴医院妇产科, 西安 710014)

**摘要:** 目的 探究宫颈癌(cervical cancer, CC)组织中 microRNA-106b 的表达与患者临床病理特征及总体生存率(overall survival, OS)的关系。方法 选取2017年9月~2019年11月西安市第四医院妇产科收治的经病理学确诊的CC患者150例为研究对象, 比较 microRNA-106b 在CC组织和癌旁正常组织中的相对表达量, 并分析不同水平 microRNA-106b 与CC患者临床病理特征和OS之间的关系。结果 microRNA-106b 在CC组织中的相对表达量为0.075, 显著高于癌旁正常组织中的相对表达量0.003 ( $P=0.0186$ )。不同水平 microRNA-106b 与CC患者的年龄、肿瘤直径、FIGO分期无关 ( $P>0.05$ ), 与淋巴结转移和分化程度有密切关系, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=13.95, 7.21, P<0.05$ )。microRNA-106b 高表达组患者的OS显著低于 microRNA-106b 低表达组, 其差异具有统计学意义 ( $P=0.036$ )。结论 microRNA-106b 与CC的发生、发展有密切关系, 其对CC的诊治及预后有关键作用。

**关键词:** 宫颈癌; microRNA-106b; 临床病理特征; 总体生存率

**中图分类号:** R737.33; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-085-03

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.020

## Value Analysis of Serum microRNA-106b in Early Diagnosis of Cervical Cancer

GAO Hong-min<sup>1</sup>, YANG Hong-ying<sup>2</sup>, LIU Xin<sup>3</sup>

(1. *Obstetrics and Gynecology Department, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710004, China*; 2. *Obstetrics and Gynecology Department, Xi'an Ninth Hospital, Xi'an 710004, China*; 3. *Department of Obstetrics and Gynecology, Daxing Hospital, Xi'an 710014, China*)

**Abstract: Objective** To explore the correlation between the expression of microRNA-106b in cervical cancer (CC) tissue and the clinicopathological features and overall survival (OS) of the patients. **Methods** A total of 150 pathologically confirmed CC patients admitted to the department of Obstetrics and Gynecology of Xi'an Fourth Hospital from September 2017 to November 2019 were selected as study subjects. The relative expression levels of microRNA-106b in CC tissues and adjacent normal tissues were compared, and the relationship between different levels of microRNA-106b and the clinicopathological characteristics and OS of CC patients was analyzed. **Results** The relative expression level of microRNA-106b in CC tissues was 0.075, which was significantly higher than 0.003 in adjacent normal tissues ( $P=0.0186$ ). MicroRNA-106b of different levels was not related to age, tumor diameter and FIGO stage of CC patients ( $P>0.05$ ), but was closely related to lymph node metastasis and differentiation degree ( $\chi^2=13.95, 7.21, P<0.05$ ). The OS of patients with high microRNA-106b expression group was significantly lower than that of patients with low microRNA-106b expression group, and the difference was statistically significant ( $P=0.036$ ). **Conclusion** MicroRNA-106b is closely related to the occurrence and development of CC, and plays a key role in the diagnosis, treatment and prognosis of CC.

**Keywords:** cervical cancer; microRNA-106b; clinicopathological features; overall survival

宫颈癌(cervical cancer, CC)是发病率和死亡率均较高的妇科恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来, 年轻女性罹患CC的人数呈逐年攀升趋势, 临床上早期CC主要以手术为主, 放化疗为辅, 晚期CC以放疗为

主<sup>[2-3]</sup>。microRNA是一类长约19~25 nt的内源小分子非编码RNA, microRNA-106b在甲状腺癌<sup>[4]</sup>、视网膜母细胞瘤<sup>[5]</sup>、胃癌<sup>[6]</sup>和肾细胞癌<sup>[7]</sup>等组织中存在异常表达, 目前关于microRNA-106b与CC的

**作者简介:** 高红敏(1975-), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 妇产科, E-mail: xigaohongm@163.com。

**通讯作者:** 刘鑫(1981-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 妇产科, E-mail: 397083371@qq.com。



关联报道鲜有,本研究拟分析 microRNA-106b 在 CC 早期诊断中的价值,旨在为 CC 患者的临床诊治提供参考依据,现具体报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 9 月~2019 年 11 月西安市第四医院妇产科收治的经病理学确诊的 CC 患者 150 例为研究对象,患者均为女性,年龄 23~62 岁,平均年龄  $41.5 \pm 3.2$  岁;病理类型均为浸润型鳞状细胞癌。手术治疗中留取 CC 组织和癌旁正常组织(距病灶 2 cm)。本研究经由我院伦理委员会批准。

纳入标准:(1)根据国际癌症协会推荐的 TBS 系统及病理学诊断为宫颈鳞状细胞癌者;(2)患者知情且自愿参加本研究。排除标准:(1)伴有其他恶性肿瘤者;(2)妊娠期及哺乳期女性。

1.2 仪器与试剂 TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司,PCR 引物的合成和设计由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,PCR 仪为 ABI Prism 7900HT 型,Ambion mirVanaTM miRNA 标记试剂盒购自 Scien Cell Research Laboratories。

1.3 方法 将组织放入 1.5 ml Eppendorf 管中用液氮保存,从液氮中取出 Eppendorf 管,使用 BioPluvisizerTM 冰冻粉碎组织,加入 1 ml Trizol 混匀后,使用 MiniBead-Beater-16 匀浆后提取 MicroRNA,用 1 ml 75ml/dl 乙醇(以焦碳酸二乙酯水配制)洗涤 RNA 1 次,4℃下离心 5 min,移去乙醇,室温下干燥 5 min,55℃~60℃条件下溶于焦碳酸二乙酯处理过的无菌水中,取总 RNA 2  $\mu$ l,紫外分光光度计测定 microRNA 纯度( $A_{260nm}/A_{280nm} > 1.8$ ),并计算其含量。其余总 RNA 添加多聚腺苷酸后,再通过 Ambion mirVanaTM miRNA 标记试剂盒进行荧光 PCR 检测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,计量资料采用均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,行  $t$  检验,计数资料采用  $n(\%)$  表示,行  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 microRNA-106b 在 CC 组织和癌旁正常组织中的相对表达量 探究 microRNA-106b 在 CC 组织和癌旁正常组织中的相对表达量,结果表明 microRNA-106b 在 CC 组织中的相对表达量为 0.075,显著高于癌旁正常组织中的相对表达量 0.003( $P=0.0186$ )。

2.2 不同水平 microRNA-106b 与 CC 患者临床病理特征间的关系 见表 1。根据 2.1 的结果, microRNA-106b 高表达 79 例, microRNA-106b 低表达 71 例。不同水平 microRNA-106b 与 CC 患者

的年龄、肿瘤直径、FIGO 分期无关,与淋巴结转移和分化程度有密切关系( $P < 0.05$ )。

表 1 microRNA-106b 与 CC 患者临床病理特征间的关系 [ $n(\%)$ ]

临床病理特征	高表达 ( $n=79$ )	低表达 ( $n=71$ )	$\chi^2$	$P$
年龄(岁)				
$\leq 40$	43(54.43)	38(53.52)	0.39	0.54
$> 40$	36(45.57)	33(46.48)		
肿瘤直径(cm)				
$< 4$	39(49.37)	31(43.66)	0.01	0.91
$\geq 4$	40(50.63)	40(56.34)		
FIGO 分期				
I b	38(48.10)	36(50.70)	1.02	0.30
II a	41(51.90)	35(49.30)		
淋巴结转移				
-	30(37.97)	23(32.39)	3.95	0.04
+	49(62.03)	48(67.61)		
分化程度				
中分化或高分化	28(35.44)	20(28.17)	7.21	0.01
低分化	51(64.56)	51(71.83)		

2.3 不同水平 microRNA-106b 对 CC 患者总体生存率的影响 探究不同水平 microRNA-106b 对 CC 患者总体生存率(overall survival, OS)的影响,结果见图 1。microRNA-106b 低表达组患者的中位生存时间为 70 个月,而 microRNA-106b 高表达组患者的中位生存时间为 54 个月。microRNA-106b 高表达组患者的 OS 显著低于 microRNA-106b 低表达组,其差异具有统计学意义( $P=0.036$ )。

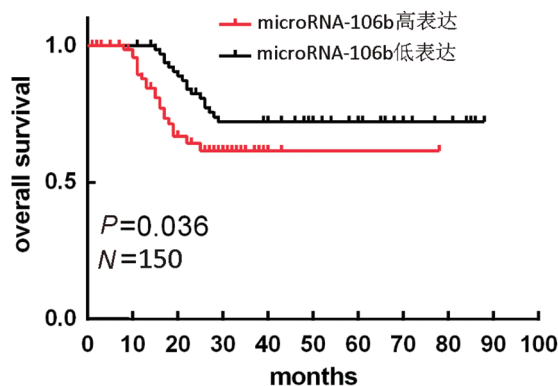


图 1 不同水平 microRNA-106b 对 CC 患者总生存率的影响

## 3 讨论

近年来,伴随着我国社会经济的飞速发展,加之人们生活方式的改变,恶性肿瘤的发病率和死亡率不断攀升,严重威胁着人们的健康。CC 是一种病毒感染性疾病<sup>[8]</sup>,发病率仅次于乳腺癌,是第二大妇科恶性肿瘤。目前临床上治疗失败的原因主要是局部复发和远处转移,CC 的发生、发展是多基因参与、涉及多步骤的复杂生物学过程<sup>[9-10]</sup>。microRNA 是一类长约 19~25 nt 的内(下转第 182 页)

# 河北地区丙肝感染患者丙型肝炎病毒基因型分布特征

李雅静<sup>1</sup>, 王戌刚<sup>2</sup>, 董倩倩<sup>1</sup>, 秦永亮<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学第一医院心脏大血管外科, 石家庄 050000)

**摘要:** 目的 了解河北地区丙肝感染患者丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布情况、感染途径、基因亚型与性别、年龄的关系, 并与其他省份的HCV基因型分布模式进行比较。方法 收集284例HCV感染患者血清样本, 对其进行HCV-RNA定量检测和HCV基因分型检测。结果 在284例临床样本中共检测出4种基因型(1~3和6)和5种亚型, 分别是1b型( $n=191$ , 67.25%)、2a型( $n=90$ , 31.69%)、3a型( $n=1$ , 0.35%)、3b型( $n=1$ , 0.35%)和6a型( $n=1$ , 0.35%), 未发现亚型混合感染。结论 河北地区HCV感染基因型以1b型为主, 其次为2a型。HCV感染率随年龄的变化呈现不同的变化, 50~59岁年龄组的感染者人数最多, 且女性感染者的数量显著高于男性( $P<0.05$ )。经文献比较发现, 河北省虽然地处华北地区, 但其HCV基因型分布模式与中国东北地区相似。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 基因分型; 河北地区

中图分类号: R512.63; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-087-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.021

## HCV Genotype and Subtype Distribution of Patients with Chronic Hepatitis C in Hebei Area

LI Ya-jing<sup>1</sup>, WANG Xu-gang<sup>2</sup>, DONG Qian-qian<sup>1</sup>, QIN Yong-liang<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

2. Department of Cardiac Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the distribution of HCV prevalence and genotypes among different gender and age in Hebei area, and analyze the transmission routes of HCV. The genotype distribution pattern was compared with those of neighboring regions in China. **Methods** A total of 284 patients were analyzed by RT-PCR and DNA sequencing. **Results** In total, four HCV genotypes and five subtypes were identified among 284 patients: 1b( $n=191$ , 67.25%), 2a( $n=90$ , 31.69%), 3a( $n=1$ , 0.35%), 3b( $n=1$ , 0.35%) and 6a( $n=1$ , 0.35%) respectively. Mixed infections of the dominant subtypes were not found. **Conclusion** Hepatitis C virus infection in Hebei Area is dominated by type 1b, followed by type 2a. This article revealed the comprehensive distribution patterns of HCV genotypes in Hebei Area. The prevalence of HCV infection showed different variations with age, as the highest incidence was shown for the age group 50~59. Though Hebei Province was located in north China, its HCV distribution pattern was more similar to those of the regions in northeast China.

**Keywords:** hepatitis C virus; genotyping; Hebei area

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是全球主要的死亡和发病原因之一, 据估计, 全球约有3%的人口长期感染该病毒<sup>[1]</sup>。HCV具有高度的遗传多样性, 其特征是基因型的区域变异。HCV基因型和亚型是抗病毒治疗反应的重要指标, 中华医学会肝病学分会和感染病学分会建议在开始抗病毒治疗前应进行HCV基因分型<sup>[2]</sup>。即使在不含干扰素的直接抗病毒治疗(direct-acting antiviral-agents, DAA), 不同的HCV基因型或亚型对同一DAA药物的反应也不同, 导致不同的耐药现象, 因此明确HCV基因型和亚型是十分必要的。

资料显示, 迄今为止, 河北地区丙型肝炎病毒基因型分布的文献资料很少, 尤其是不同年龄、性别的流行病学和丙型肝炎病毒基因型分布特征。因此, 本研究提供了河北地区HCV基因型分布情况、感染途径、基因亚型与性别、年龄关系的信息, 可为进一步研究本地区HCV流行情况提供依据, 也为丙型肝炎的个体化治疗提供指导。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 选择2016年7月~2017年10月在我院首次确诊为HCV感染的284例患者, 纳入患者均符合《丙型肝炎防治指南》诊断标准, 血清

基金项目: 2016年度河北省医学科学研究重点课题计划(20160536)。

作者简介: 李雅静(1982-), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向: 病原微生物的分子诊断, E-mail: liyajing11272003@163.com。

通讯作者: 王鑫(1970-), 女, 主任技师, 研究方向: 病原微生物的分子诊断, E-mail: 13673166960@163.com。

HCV-RNA, HCV 抗体均为阳性。通过询问病史, 收集患者的基本信息, 如感染途径、手术史、潜在疾病或曾经滥用药物等。

**1.2 仪器与试剂** 本研究所涉及的主要仪器有 COBAS AmpliPrep 核酸提取仪; COBAS TaqMan48 实时荧光定量 PCR 仪; ABI 3500DX 基因测序仪。使用的主要试剂有 COBAS AmpliPrep/ COBAS Taqman HCV Quantitative Test, v2.0; 丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒。

### 1.3 方法

**1.3.1 HCV-RNA 定量测定:** 按照 COBAS AmpliPrep/ COBAS Taqman HCV Quantitative Test 说明书进行 HCV-RNA 定量测定。

**1.3.2 HCV 基因分型:** 按照丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒说明书进行核酸提取、PCR 扩增、产物纯化、测序 PCR, 测序产物纯化, 将纯化后的测序产物应用 ABI 3500DX 基因测序仪进行测序及数据分析。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS25.0 统计软件对数据进行处理, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。HCV 基因亚型和病毒载量高低之间的关系比较采

用  $\chi^2$  检验; HCV 基因亚型和肝病严重程度之间关系的比较采用秩和检验。我国不同地区 HCV 基因型分布比较采用 Fisher 确切概率法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HCV 基因型分布情况** 见图 1。图 1 显示了河北地区 HCV 基因型构成比。本研究共发现了 4 种基因型 (1~3 和 6) 和 5 种亚型, 未发现混合基因型感染。最常见的亚型是 1b 型 ( $n=191$ , 67.25%), 其次是 2a 型 ( $n=90$ , 31.69%), 少数检测到的基因型包括 3a 型 ( $n=1$ , 0.35%), 3b 型 ( $n=1$ , 0.35%) 型和 6a 型 ( $n=1$ , 0.35%)。通过询问病史, 本研究共收集了 3 种感染途径, 包括输血 ( $n=38$ , 13.4%)、献血 ( $n=32$ , 11.3%)、手术 ( $n=1$ , 0.4%)。

**2.2 HCV 感染者的年龄分布** 根据年龄, HCV 感染者分为 7 个年龄组。图 2 所示 HCV 感染率随年龄的变化呈现不同的变化, 无论是男性还是女性, 在 50~59 岁年龄组的感染者人数最多 ( $n=108$ , 38.0%), 其次是 60~69 岁年龄组 ( $n=81$ , 28.5%)。在这两个年龄组中, 女性感染者的数量均显著高于男性感染者 ( $P < 0.05$ )。

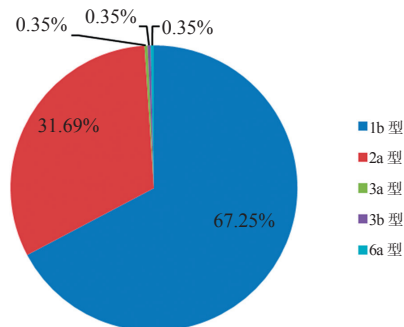


图1 河北地区 HCV 基因型构成比

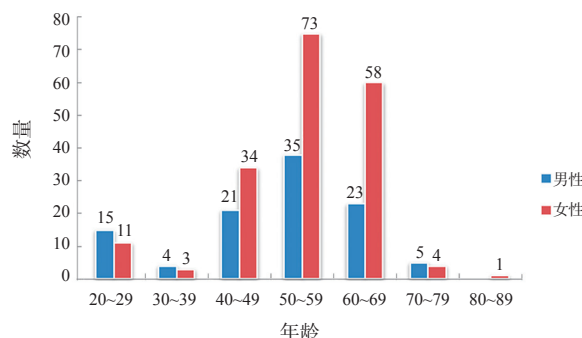
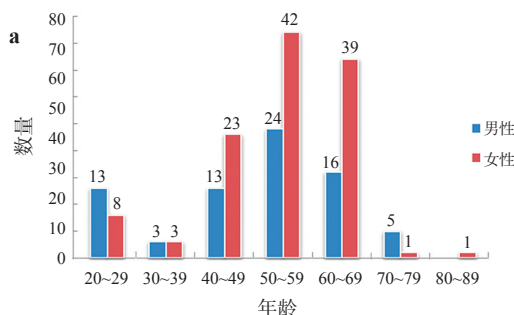


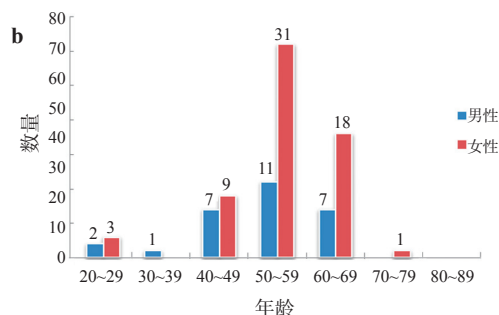
图2 不同年龄组和性别的 HCV 感染率

**2.3 HCV 基因亚型与年龄、性别的关系** 见图 3。1b 亚型最常见于 50~69 岁年龄组的女性患者, 占 1b 型总数的 42.4% (79/191)。1b 亚型在 20~29 岁年龄组和 70~79 岁年龄组的男性患者多于女性, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 且 70~79 岁年龄组病例

数较少, 只有 6 例患者。2a 亚型也最常见于 50~69 岁年龄组的女性患者, 占 2a 型总数的 54.4% (49/90), 且在 50~69 岁年龄组中, 女性患者数量多于男性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而在 20~29 岁年龄组和 40~49 岁年龄组男女患者数量相似。



a. 不同年龄、性别人群 HCV-1b 亚型分型结果



b. 不同年龄、性别人群 HCV-2a 亚型分型结果

图3 不同年龄、性别人群 HCV 基因分型分布



2.4 HCV 基因亚型与病毒载量、疾病严重程度关系 对 284 例样本进行了 HCV 基因分型和 HCV 病毒载量测定。分析病毒载量、疾病严重程度与 HCV 亚型的关系, 见表 1。HCV-1b, HCV-2a 优势

亚型平均病毒载量分别为  $1.09\text{E}+07$ ,  $1.40\text{E}+07\text{IU/ml}$ , 两者之间差异无统计学意义 ( $t=-0.566$ ,  $P=0.572$ )。HCV-1b, HCV-2a 亚型患者肝病严重程度之间差异无统计学意义 ( $Z=-0.039$ ,  $P=0.967$ )。

表 1 HCV 基因亚型与病毒载量、疾病严重程度

项目		HCV 亚型		统计量	P
		1b (n=191)	2a (n=90)		
HCV-RNA 载量	$< 10^6$	43	25	$\chi^2=0.924$	0.336
	$\geq 10^6$	148	65		
平均病毒载量 (IU/ml)		$1.09\text{E}+07$	$1.40\text{E}+07$	$t=-0.566$	0.572
肝病程度	慢性肝炎	138	65	$Z=-0.039$	0.967
	肝硬化	47	23		
	肝癌	6	2		

2.5 河北省与其他地区 HCV 基因型分布模式比较 见表 2。HCV 1 型是我国丙型肝炎病毒最主要的毒株, 没有发现 HCV 4 型和 HCV 5 型。在我国的不

同地区, HCV 2, 3, 6 所占比例存在明显差异。河北省 HCV 基因型分布与已报道的我国东北地区变化趋势相似 ( $\chi^2=1.417$ ,  $P=0.743$ )。

表 2 中国不同地区 HCV 基因型分布 (n)

地区	HCV 基因型				$\chi^2$	P
	1	2	3	6		
河北	191	90	2	1	266.163 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
湖南 <sup>[3]</sup>	665	25	80	181		
湖北 <sup>[4]</sup>	147	23	5	2	24.549 <sup>b</sup>	<0.001 <sup>b</sup>
中国东北 <sup>[5]</sup>	71	37	1	1	1.417 <sup>c</sup>	0.743 <sup>c</sup>
中国北部 <sup>[5]</sup>	271	90	20	3	15.965 <sup>d</sup>	0.001 <sup>d</sup>
中国东部 <sup>[5]</sup>	215	23	16	11	63.078 <sup>e</sup>	<0.001 <sup>e</sup>
中国西部 <sup>[5]</sup>	78	26	8	1	14.225 <sup>f</sup>	0.001 <sup>f</sup>

注: a, b, c, d, e, f 分别表示湖南、湖北、中国东北、中国北部、中国东部、中国西部和河北地区 HCV 基因型进行比较, Fisher 确切概率法。

### 3 讨论

HCV 基因型的当代全球地理分布是复杂的, MESSINA 等<sup>[6]</sup>对 HCV 基因型流行的全球趋势进行调查, 发现 HCV-1 型是世界上最流行的, 包括 8 340 万例 (46.2%); 基因型 3 是全球第二流行的基因型 (5 430 万, 30.1%); 基因型 2, 4 和 6 占有所有病例的 22.8%; 其余为基因型 5 (占比 <1%)。由于传播途径的改变和全球旅行的增加, HCV 在我国的地理和遗传多样性也在不断变化<sup>[7]</sup>。CHEN 等<sup>[8]</sup>对全国 28 个省份的 HCV 基因型进行调查, 结果发现我国南方省份 HCV 基因型分布的多样性高于北方省份, 在所有北方省份中, HCV 1b 和 2a 是两个主要亚型, 占总数的 86%, 而在南方省份中, HCV 3b 和 6a 占 HCV 的大部分, 这些结果可以用独特的地理位置和人口多样化来解释。值得关注的是, HCV 在我国的流行模式正在发生演变。例如, RONG 等<sup>[9]</sup>跟踪了 2004~2007 年和 2008~2011 年中国丙型肝炎病毒基因型流行率的变化, 2008~2011 年广东省外献血者中 6a 亚型的频率从 11% 显著增

加到 26.5%, 表明 HCV 6a 亚型在过去 10 年中迅速从广东传播到中国其它地区。这一结果在本研究中得到证实, 在石家庄地区也发现了 3a, 3b 和 6a 亚型。病毒基因型有利于控制和预防 HCV 感染的流行, 具有重要的现实意义。河北省位于我国华北地区, 交通便利、人口众多、人员迁徙频繁。我们的研究发现, 1b 和 2a 亚型是河北地区的优势亚型, 这与中国不同地区和人群的先前研究一致<sup>[10-11]</sup>, 但是也出现了 3a, 3b 和 6a 亚型。

HCV 基因型 / 亚型以及治疗期间病毒载量的变化对于指导临床用药十分重要。一般来说, 病毒载量越高, 肝脏损伤也越严重, 临床表现越明显。慢性 HCV 感染者的病毒载量与 HCV 基因型有关, HCV-1 型患者的 HCV RNA 水平高于非 1 型患者<sup>[12]</sup>。然而, 其他一些研究发现 HCV 基因型与病毒载量之间没有显著相关性<sup>[13]</sup>。彭雪彬等<sup>[14]</sup>的研究发现, 在中国高病毒载量的患者中, HCV 2a 型比其他亚型更为常见。

而我们的数据表明, HCV-1b, HCV-2a 优

势亚型平均病毒载量之间差异无统计学意义 ( $t=-0.566$ ,  $P=0.572$ )。这些不同的研究结论可能是区域性基因型分布差异所致。

此外,本研究共收集了3种感染途径,包括输血( $n=38$ , 13.4%)、献血( $n=32$ , 11.3%)、手术( $n=1$ , 0.4%)。在可收集到的感染途径中,输血和献血占绝大部分,从这部分患者的年龄分析,这些病例大多可归因于90年代的献血污染和血液制品缺少筛查。有偿献血是20世纪90年代初以前血液传播HCV感染的重要途径,GAO等<sup>[15]</sup>对中国大陆献血员HCV感染情况进行了荟萃分析,结果发现中国大陆献血者HCV感染的总患病率为8.68%,华北、华中地区HCV感染更为严重,尤其是河南、河北。HCV感染占输血后肝炎的70%以上,是慢性肝病的主要病因之一,通常在感染后20~30年内导致肝硬化、肝衰竭和肝细胞癌<sup>[16]</sup>。

本研究描述了河北地区丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布情况、感染途径、基因亚型与性别、年龄关系,并与其他省份的HCV基因型分布模式进行比较,反映了丙型肝炎病毒感染的变化趋势,可为进一步研究本地区丙型肝炎病毒流行情况和制定有针对性的防治策略提供依据。然而,此项研究也存在一定的局限性,如样本量不够大。综上所述,HCV 1型是河北省HCV最主要的基因型,其次是HCV 2型,HCV 3和6型占比很少,未发现HCV 4和5型及亚型混合感染的情况。

#### 参考文献:

- [1] MOHD HANAFIAH K, GROEGER J, FLAXMAN A D, et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence[J]. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 2013, 57(4): 1333-1342.
- [2] 中华医学会肝病学会. 中华医学会感染病学会. 丙型肝炎防治指南(2015年更新版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(12): 1961-1979.  
Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infection Diseases, Chinese Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a 2015 update [J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2015, 31(12):1961-1979.
- [3] LEI Jianhua, GONG Xing, XIAO Xinqiang, et al. Genotype distribution of hepatitis C virus in 952 cases from 2014 to 2016 in Hunan Province, China[J]. *Archives of Medical Science : AMS*, 2018, 14(5): 1055-1060.
- [4] PENG Jing, LU Yanjun, LIU Weiyong, et al. Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in Hubei, central China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137059.
- [5] JU Wei, YANG Song, FENG Shenghu, et al. Hepatitis C virus genotype and subtype distribution in Chinese chronic hepatitis C patients: nationwide spread of HCV genotypes 3 and 6[J]. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 109.
- [6] MESSINA J P, HUMPHREYS I, FLAXMAN A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 2015, 61(1): 77-87.
- [7] 吴泽刚,李艳,郑红云. 湖北地区慢性丙型肝炎患者HCV基因分型结果分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1):38-40.  
WU Zegang, LI Yan, ZHENG Hongyun. Analysis on HCV genotype of patients with chronic hepatitis C in Hubei[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(1):38-40.
- [8] CHEN Ying, YU Changshun, YIN Xueru, et al. Hepatitis C virus genotypes and subtypes circulating in Mainland China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(11): e95.
- [9] RONG Xia, XU Ru, XIONG Huaping, et al. Increased prevalence of hepatitis C virus subtype 6a in China: a comparison between 2004-2007 and 2008-2011[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(12): 3231-3237.
- [10] RAO Huiying, WEI Lai, LOPEZ-TALAVERA J C, et al. Distribution and clinical correlates of viral and host genotypes in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2014, 29(3): 545-553.
- [11] MAO Xiaorong, ZHANG Liting, JIANG Ni, et al. Distribution of HCV genotypes in Chinese Han population with chronic hepatitis C[J]. *Journal of University Medical Sciences*, 2015, 44(4): 417-422.
- [12] RIAZ S, BASHIR M F, HAIDER S, et al. Association of genotypes with viral load and biochemical markers in HCV-infected Sindhi patients[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(4): 980-986.
- [13] 史昌河,黄艳秋,唐艳. 青岛地区丙型肝炎基因分型的研究[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2014, 50(3):230-232.  
SHI Changhe, HUANG Yanqiu, TANG Yan. Genotyping study on hepatitis C in Qingdao area[J]. *Journal of Qingdao University(Medical Sciences)*, 2014,50(3):230-232.
- [14] 彭雪彬,毛小荣,陈红. 甘肃地区汉族HCV基因分型相关分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2013, 29(11):828-831.  
PENG Xuebin, MAO Xiaorong, CHEN Hong. Genotypes of HCV in hepatitis C patients of Han nationality in Gansu, China[J]. *Journal of Clinical Hepatology*, 2013,29(11):828-831.
- [15] GAO Xiaofei, CUI Qian, SHI Xiang, et al. Prevalence and trend of hepatitis C virus infection among blood donors in Chinese mainland: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2011, 11(1): 88.
- [16] ZHANG Yu, CHEN Limin, HE Miao. Hepatitis C virus in mainland China with an emphasis on genotype and subtype distribution[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 41.

收稿日期: 2020-05-26 修回日期: 2020-06-11

# 湖北宜昌市育龄妇女和母婴巨细胞病毒感染现状调查及感染风险评估

左江成<sup>a</sup>, 邓琛琛<sup>a</sup>, 杨洁<sup>a</sup>, 谭艳蓉<sup>a</sup>, 李子豪<sup>a</sup>, 杨金华<sup>b</sup>

(宜昌市夷陵区妇幼保健院 a. 检验科; b. 孕产保健科, 湖北宜昌 443100)

**摘要:** **目的** 调查宜昌市育龄妇女和母婴巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染现状, 并评估孕产妇及婴儿的感染风险。**方法** 2015年7月至2018年12月, 应用ELISA检测4 802例非妊娠妇女、6 102例孕妇、1 342例婴儿血清CMV-IgG/IgM抗体和部分样本的IgG抗体亲和力; 荧光定量PCR(FQ-PCR)检测1 671例婴儿尿液和/或母乳中CMV-DNA。**结果** 育龄妇女CMV-IgG阳性率为96.8%, CMV-IgG和IgM双抗体阳性率为0.4%, 妊娠与非妊娠妇女CMV抗体阳性率比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.001$ ,  $P=0.979$ )。CMV先天感染和围生期感染率分别为0.1%和9.0%, 围生期CMV感染率高于先天性感染( $\chi^2=85.138$ ,  $P=0.00$ )。CMV-IgG和IgM双抗体阳性的18例经CMV-IgG亲和力和CMV-DNA检测, 结合年龄推测CMV原发感染6例, 复发感染10例, IgM假阳性2例; 核酸检测婴儿CMV感染率为33.3%, 新生儿, 1~3月龄和 $\geq 4$ 月龄组CMV感染率分别为9.9%, 51.2%和71.3%。在母乳CMV-DNA阳性组中, 新生儿和婴儿CMV感染率分别为20.2%和74.6%, 均高于母乳CMV-DNA阴性组新生儿0.5%和婴儿42.9%的感染率( $\chi^2=33.592$ ,  $P=0.000$ ;  $\chi^2=10.559$ ,  $P=0.001$ )。**结论** 宜昌市育龄妇女CMV感染率为96.8%, 妊娠没有增加CMV的感染风险。婴儿CMV感染率为33.3%, 感染随年龄的增加而增高。含CMV母乳是婴儿感染CMV的重要途径, 出生一个月内进行适当干预是减少婴儿CMV感染的最佳时期。

**关键词:** 育龄妇女; 婴儿; 人巨细胞病毒; 感染; 风险评估

**中图分类号:** R373.1; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)06-091-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.022

## Investigation on Status and Risk Assessment of Cytomegalovirus Infection in Women of Childbearing Age and Maternals and Infants in Yichang, Hubei

ZUO Jiang-cheng<sup>a</sup>, DENG Chen-chen<sup>a</sup>, YANG Jie<sup>a</sup>, TAN Yan-rong<sup>a</sup>, LI Zi-hao<sup>a</sup>, YANG Jin-hua<sup>b</sup>

(a. Department of Medical Laboratory; b. Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Child Health Hospital of Yiling District, Hubei Yichang 443100, China)

**Abstract: Objective** To investigate the status of cytomegalovirus (CMV) infection in women of childbearing age and maternal and infants in Yichang City, and assess the risk of maternal and infant infection. **Methods** From July 2015 to December 2018, the serum CMV-IgG/IgM antibodies of 4 802 non-pregnant women, 6 102 pregnant women, 1 342 infants and some serum samples were detected by ELISA and FQ-PCR method was used to detect CMV-DNA in urine and/or breast milk of 1 671 infants. **Results** The positive rate of CMV-IgG in women of childbearing age was 96.8%, and the positive rate of CMV-IgG and IgM double antibodies was 0.4%, and there was no statistically significant difference in the positive rate of CMV antibodies between pregnant and non-pregnant women ( $\chi^2 = 0.001$ ,  $P = 0.979$ ). CMV congenital infection and perinatal infection rate were 0.1% and 9.0%, respectively, and perinatal CMV infection rate was higher than congenital infection ( $\chi^2 = 85.138$ ,  $P = 0.00$ ). 18 CMV-IgG and IgM double antibody positive cases were tested by CMV-IgG affinity and CMV-DNA, combined with age speculation, 6 cases of CMV primary infection, 10 cases of recurrent infection, 2 cases of IgM false positive. The CMV infection rate of infants with nucleic acid detection was 33.3%, and the CMV infection rates of neonates, 1~3 months old and  $\geq 4$  months old were 9.9%, 51.2% and 71.3%, respectively. In the breast milk CMV-DNA positive group, the neonatal and infant CMV infection rates were 20.2% and 74.6%, which were higher than the breast milk CMV-DNA negative group neonatal infection rates of 0.5% and infant 42.9% ( $\chi^2 = 33.592$ ,  $P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 10.559$ ,  $P = 0.001$ ). **Conclusion** The CMV infection rate of women of childbearing age in Yichang was 96.8%, and pregnancy did not increase the risk of CMV infection. The CMV infection rate of infants was 33.3% and the infection increases with age. Breast milk with CMV was an important way for infants to get CMV infection and intervention

**作者简介:** 左江成(1975-), 男, 研究生, 主任技师, 研究方向为免疫与分子生物学检验。

**通讯作者:** 杨金华, E-mail: 519618577@qq.com。



within one month after the baby born is the best time to reduce CMV infection.

**Keywords:** women of childbearing age; infants; human cytomegalovirus; infection; risk assessment

人巨细胞病毒 (*human cytomegalovirus*, CMV) 在全球感染非常普遍, 各地感染率约为 45~100%<sup>[1]</sup>, 其感染率高低与经济条件和人种相关<sup>[2]</sup>。CMV 感染的致病机制尚不明确, 其诊断主要依靠典型的临床表现及实验室检查, 目前并无有效的治疗和预防方法。CMV 在孕妇中的原发感染风险为 0.5~4%<sup>[3]</sup>, 尤其在妊娠前 1 周内及妊娠早期原发感染导致的胎儿先天感染可引起严重后果, 如运动和智力迟钝、小头、视网膜缺陷和进行性听力丧失等严重疾病<sup>[4]</sup>。婴儿 CMV 感染也能引起肝炎或呼吸系统等多种疾病, 严重危害儿童健康。因此, 了解本地区母婴 CMV 感染现状及婴儿感染风险评估, 对婴儿 CMV 感染的预防及早期准确诊断具有重要的临床意义, 对促进人口健康, 提高人口素质有重要指导价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 非妊娠组: 2016 年 9 月~2018 年 12 月在本院进行孕前优生健康体检, 年龄在 20~45 岁之间女性 4 802 例, 中位数年龄 29.5 岁;

1.1.2 妊娠组: 2015 年 7 月~2018 年 12 月在本院进行产前检查, 年龄在 17~52 岁之间孕妇 6 102 例, 中位数年龄 27.6 岁, 其中孕早期 4 011 例, 孕中期 2 027 例, 孕晚期 64 例;

1.1.3 婴儿组: 2016 年 12 月~2018 年 12 月就诊的 1 671 例婴儿 (其中抗体检测阳性 1 342 例, 尿 CMV-DNA 检测 634 例, 母乳 CMV-DNA 检测 522 例, 尿液和母乳 CMV-DNA 配对检测 385 对) 年龄在 1 天~1 岁之间, 中位数年龄 3 月。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器: 低速离心机 (北京白洋公司), 冷冻高速离心机 (德国艾本德公司), 全自动酶免仪 (深圳爱康公司), 生物安全柜 (上海力康公司), ABI7300plus 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ThermoFisher 公司)。

1.2.2 主要试剂: CMV 核酸检测试剂盒 (湖南圣湘生物科技公司), CMV IgG 和 IgM 抗体检测试剂盒 (郑州安图公司), CMV-IgG 抗体亲和力检测试剂盒 (郑州安图公司)。

### 1.3 检测方法

1.3.1 标本收集与处理: ①血清标本: 对进行 CMV 抗体检测的个体在无菌操作下采集静脉血 3 ml, 分离血清。不能当天检测的标本置于 2~8℃ 保存。对于检测后需确诊或复查的血清标本则在 -80℃ 保存。②乳汁和尿液标本: 各收集 5 ml 于

无菌试管中, 对于不能立即检测的标本置于 -20℃ 保存。

1.3.2 CMV 血清抗体和核酸检测: 严格按说明书操作执行。

1.4 统计学分析 运用 SPSS17.0 统计分析软件处理数据, 计数资料用率表示, 率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 育龄妇女 CMV-IgG 和 IgM 抗体检测情况 见表 1。10 904 例育龄妇女 CMV-IgG 抗体总阳性率为 96.8%, IgG+IgM 抗体同时阳性率为 0.4%。妊娠与非妊娠妇女组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 育龄妇女 CMV-IgG 和 IgM 抗体检测结果 [n(%)]

项目	非妊娠组 (n=4 802)	妊娠组 (n=6 102)	总计 (n=10 904)	$\chi^2$	P
IgG	4 648/(96.8)	5 907/(96.8)	10 555/(96.8)	0.001	0.979
IgG+IgM	19/(0.4)	20/(0.3)	39/(0.4)	0.345	0.557

2.2 妊娠期不同阶段 CMV-IgG 和 IgM 抗体检测情况 妊娠 0~12 周、13~28 周及 28 周以后分别定义为孕早期 (T1,  $n=4 011$ )、孕中期 (T2,  $n=2 027$ ) 和孕晚期 (T3,  $n=64$ )。孕早、中和晚期 CMV-IgG 抗体的阳性率分别为 96.8%(3 881/4 011)、96.8%(1 963/2 027) 和 98.5%(63/64), 组间差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.615$ ,  $P=0.753$ )。孕早、中和晚期 CMV-IgG+IgM 同时阳性的阳性率分别为 0.4% (14/4 011)、0.3%(6/2 027) 和 0.0%(0/64), 组间差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.240$ ,  $P=0.887$ )。

2.3 婴儿 CMV-IgG 和 IgM 抗体检测情况 本研究对抗体检测阳性的 1 342 例婴儿按照新生儿期 ( $n=1 079$ )、1~3 月龄 ( $n=194$ ) 和  $\geq 4$  月龄 ( $n=69$ ) 进行分组, 以调查婴儿在不同发育阶段 CMV 的感染情况。婴儿期 IgG 抗体、IgG+IgM 抗体阳性率分别为 96.6%(129/1 342) 和 2.5%(32/1 342); 新生儿期 IgG 阳性率为 97.7%(1 054/1 079)、1~3 月龄为 96.4%(187/194),  $\geq 4$  月龄为 81.2%(56/69), 各组间差异有统计学意义 ( $\chi^2=54.683$ ,  $P=0.000$ ); 新生儿期 IgG+IgM 阳性率 (0.4%, 4/1 079) 明显低于 1~3 月龄组 (11.9%, 23/194) 和  $\geq 4$  月龄组 (10.1%, 7/69), 差异有统计学意义 ( $\chi^2=104.901$ ,  $P=0.000$ )。1~3 月龄组与  $\geq 4$  月龄组 IgG/IgM 阳性率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4 婴儿 CMV 先天感染和围生期感染情况分析 先天感染定义为出生后 14 天内 (含 14 天) 证实有 CMV 的感染。围生期感染是生后 14 天内证实无感染,

而于生后第3~12周内感染证据,通常经产道、母乳或输血等途径获得感染。该部分婴儿CMV-IgG和IgM抗体阳性检测结果见表2。27例CMV-IgG和IgM同时阳性患儿14例进行了尿液CMV-DNA检测确诊,证实1例先天感染,该患儿尿液和母乳中CMV-DNA均为阳性,9例围生期婴儿尿液CMV-DNA阳性,4例阴性。

2.5 CMV-IgG抗体亲和力检测结果分析 见表3。IgG抗体亲和力检测是为了鉴别CMV-IgG和IgM同时阳性患者是原发感染(或新毒株的感染)还是

复发感染。本研究共回顾分析18例CMV-IgG和IgM同时阳性样本。结果3例抗体低亲和力,15例抗体高亲和力,结合CMV-DNA检测结果和年龄推测原发感染6例,复发感染10例,IgM抗体结果假阳性可能2例。

表2 婴儿新生儿期和15天~3月龄CMV抗体检测结果[n(%)]

项目	1~14天(n=984)	3~12周(n=289)	$\chi^2$	P
IgG	960(97.6)	281(97.2)	0.099	0.753
IgG+IgM	1(0.1)	26(9.0)	85.138	0.000

表3 CMV-IgG+/IgM+ 双阳性病例IgG抗体亲和力检测结果

病例	性别	年龄	CMV-IgG亲和力 <sup>*</sup>	尿HMCV-DNA	临床诊断	可能感染性质
1	女	1月	34.3%	阳性	肺炎	原发感染
2	女	23岁	31.4%	未检测	孕前	原发感染
3	女	22岁	16.2%	未检测	孕前	原发感染
4	女	27天	73.1%	阴性	肺炎	IgM阳性可疑
5	女	29天	97.1%	阳性	肺炎	原发感染
6	男	26天	72.1%	阳性	肺炎	原发感染
7	女	1月	101.2%	阴性	支气管炎	IgM阳性可疑
8	女	2月	83.5%	阳性	肝炎	原发感染
9	女	7岁	63.1%	阴性	肺炎	病毒再激活
10	女	1岁	96.9%	未检测	肺炎	病毒再激活
11	女	23岁	95.4%	未检测	孕前	病毒再激活
12	女	28岁	97%	未检测	中孕	病毒再激活
13	女	25岁	99.7%	未检测	孕前	病毒再激活
14	女	27岁	63.3%	未检测	孕前	病毒再激活
15	女	31岁	94.7%	未检测	孕前	病毒再激活
16	女	28岁	50.3%	未检测	孕前	病毒再激活
17	女	33岁	99%	未检测	产后	病毒再激活
18	女	27岁	102.7%	未检测	孕前	病毒再激活

注:1~3号病例为低亲和力<45%,4~8号病例为高亲和力>50%,灰区:45%<亲和力<50%。

2.6 婴儿尿液和母乳CMV-DNA检测结果分析 见表4。婴儿尿液CMV-DNA阳性率为33.3%,各年龄组间差异有统计学意义( $\chi^2=97.054$ , $P=0.000$ )。年龄越大,CMV感染率越高( $P<0.001$ )。母乳

CMV-DNA阳性率为38.9%,组间总体差异有统计学意义( $\chi^2=15.007$ , $P=0.001$ ),1~3月龄组高于新生儿组( $P<0.001$ )。

表4 不同年龄婴儿尿和母乳中CMV-DNA检测结果比较[阳性数/总数(%)]

项目	n	新生儿期	1~3月	≥4月	总计	$\chi^2$	P
尿CMV-DNA	634	35/353(9.9)	62/121(51.2)	114/160(71.3)	268/634(33.3)	97.054	0.000
母乳CMV-DNA	522	119/354(33.6)	56/103(54.4)	28/65(43.1)	203/522(38.9)	15.007	0.001

2.7 不同性别婴儿CMV感染情况分析 见表5。婴儿CMV核酸和抗体检测结果性别比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。检测结果提示,婴儿

CMV感染与性别无关,而CMV感染的病原学诊断采用核酸检测的敏感度高于抗体检测。

表5 不同性别患儿尿液和血清抗CMV-IgG, IgM检测结果[阳性数/总数(%)]

项目	男性	女性	总计	$\chi^2$	P
尿CMV-DNA	118/348 (33.9)	93/286 (32.5)	211/634 (33.3)	0.137	0.712
IgG	698/722 (96.7)	598/620 (96.5)	1296/1342 (96.6)	0.005	0.943
IgG+IgM	17/722 (2.3)	17/620 (2.7)	34/1342 (2.5)	0.075	0.785

2.8 母乳CMV-DNA阳性和阴性对婴儿CMV活动感染的影响 见表6。该组为母乳与尿液配对检测病例,主要探讨母亲CMV感染对患儿CMV感染的影响,结果母乳CMV-DNA阳性组中新生儿和婴儿的CMV阳性率均高于母乳CMV-DNA阴性组( $\chi^2=33.592$ ,  $P=0.000$ ;  $\chi^2=10.559$ ,  $P=0.001$ ),提示母乳CMV-DNA阳性是新生儿和婴儿CMV感染增加的风险之一。在母乳CMV-DNA阴性组和阳性组中婴儿CMV感染率均高于新生儿( $P<0.01$ ),提示随着年龄增长,CMV感染的风险增加。

表6 母乳CMV-DNA阳性和阴性组新生儿和婴儿的尿CMV-DNA检测结果[阳性数/总数(%)]

组别	新生儿	婴儿	$\chi^2$	P
母乳阳性组	20/99 (20.2)	44/59 (74.6)	47.995	0.000
母乳阴性组	1/185 (0.5)	18/42 (42.9)	79.919	0.000

### 3 讨论

本研究发现宜昌市孕妇CMV-IgG抗体阳性率为96.8%,妊娠与非妊娠期、以及妊娠期三个不同阶段CMV的感染率均没有差异,提示妊娠期CMV的感染风险没有增加。有报道妊娠期CMV活动感染率为11%,而CMV的活动感染能导致不良的妊娠结局<sup>[5]</sup>。对于有不良妊娠史的孕妇,其活动感染率显著高于正常妊娠妇女,且与自然流产相关<sup>[6]</sup>。因此,尽管本研究没有发现妊娠期CMV感染风险的增加,但鉴于妊娠妇女内分泌和免疫功能改变,仍然需要重视CMV的原发感染和病毒再激活,从而导致新生儿的先天感染或产后感染,并可能导致婴儿严重的机体功能缺陷或损害而引起足够重视。

婴儿是CMV原发感染的高危人群,并可能引发多种疾病,如肝炎、肺炎等<sup>[7]</sup>。本研究发现,CMV感染率从新生儿期到婴儿期迅速增加,提示密切接触时间长短是影响CMV感染的重要因素之一。但本研究新生儿CMV感染率比刘振忠等<sup>[8]</sup>报道的0.88%低,可能由于病例数选取差异。其中婴儿先天CMV感染是引起宫内发育受限(intrauterine growth restriction, IUGR)原因之一,发生率可高达30%左右,神经系统受损达40~60%,并且有部分病例先天感染在出生后没有临床症状,而是在出生后几个月到几年后才有临床表现<sup>[9]</sup>。而围生期CMV感染则损害发生率相对较少<sup>[10]</sup>,因此,区分婴儿CMV感染是否为先天感染或围生期感染对预

后具有重要意义,建议对14天内新生儿进行CMV病毒普遍筛查,以便对先天感染者进行早期干预。

母乳喂养一直被大力提倡。然而,近年的研究发现母乳喂养是导致婴儿CMV感染流行病学的主要原因<sup>[11-12]</sup>。本研究发现母乳中CMV阳性率为38.9%,证实婴儿期母乳中CMV具有较高的激活率,但低于国外70.2%~82%阳性率<sup>[13-15]</sup>,与国内报道母乳CMV阳性率37.2%~64.15%接近<sup>[16-18]</sup>。同时,本研究通过对母乳CMV阴性和阳性分组研究婴儿CMV感染情况,不论母亲是否存在CMV活动感染,预防婴儿CMV感染的措施越早,阻断CMV感染的机会越大,重点强调出生后一个月内的预防。

对于CMV病原学筛查与诊断方法,抗体筛查通常为基层医院首选。但IgM阳性率较低,且受IgM假阳性和IgM长期持有影响实验诊断。研究报道,抗体检测CMV感染的灵敏度为20%~25%,假阳性率为15%~20%<sup>[19]</sup>。IgG和IgM阳性的孕妇,有必要进行IgG抗体亲和力检测,确定感染时间或是否原发感染,评估对胎儿可能造成的损害,但基层医院抗体亲和力检测开展不普遍,建议直接增加CMV核酸检测,以提高诊断的敏感度。

因此,加强母婴CMV筛查,推广CMV核酸和IgG抗体亲和力检测对预防和诊断CMV感染具有重要意义。虽然研究结果提示CMV感染的预防应在出生后1个月以内进行,但缺乏有效预防措施、结果评估和病例追踪等,这些都是今后研究的方向。

### 参考文献:

- [1] 曾庆贺,董加秀,孟艳,等.人巨细胞病毒感染的流行病学研究进展[J].山东医药,2017,57(12):110-112. ZENG Qinghe, DONG Jiaxiu, MENG Yan, et al. Advances in epidemiological research on human cytomegalovirus infection[J]. Shandong Medical Journal, 2017,57(12):110-112.
- [2] COLUGNATI F A, STEPHANIE A S, DOLLARD S C, et al. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States[J]. BMC Infectious Diseases, 2007, 7: 71.
- [3] BUXMANN H, HAMPRECHT K, MEYER-WITTKOPF M, et al. Primary human cytomegalovirus (HCMV) infection in pregnancy[J]. Deutsches Arzteblatt International, 2017, 114(4): 45-52.
- [4] TABATA T, PETITT M, FANG-HOOVER J, et al. Persistent cytomegalovirus infection in amniotic membranes of the human placenta[J]. The American Journal of Pathology, 2016, 186(11): 2970-2986.

(下转第148页)



# 唾液 $\alpha$ -突触核蛋白(SNCA)与嗅觉评估在帕金森病早期筛查中的应用研究

尚天明, 毕开湘(宝鸡市康复医院精神科, 陕西宝鸡 721000)

**摘要:** **目的** 研究唾液  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein, SNCA)与嗅觉评估在帕金森病(parkinson's disease, PD)早期筛查中的应用。**方法** 选取宝鸡市康复医院2018年2月~2020年2月45例PD患者为观察组,另选取同期45例体检健康者为对照组。比较两组的16种气味识别(SS-16)评分和唾液SNCA。参照改良H-Y临床分级量表,将观察组45例PD患者进一步分为早、中和晚期,分别比较不同分期患者的SS-16评分和唾液SNCA。探究PD病情发展程度与SS-16评分和唾液SNCA的关系,采用受试者工作曲线(ROC)分析SS-16评分与唾液SNCA在PD早筛中的价值。**结果** 观察组的SS-16评分为 $8.51 \pm 3.79$ 分,嗅觉障碍共34例,嗅觉障碍率为75.56%,唾液SNCA为 $1\,272.13 \pm 38.52$ pg/ml。对照组的SS-16评分为 $11.04 \pm 3.96$ 分,嗅觉障碍11例,嗅觉障碍率为24.44%,唾液SNCA为 $1\,235.16 \pm 23.46$ pg/ml。两组的SS-16评分( $t=3.096$ )、嗅觉障碍率( $\chi^2=23.511$ )和唾液SNCA( $t=5.499$ )差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。不同程度PD患者SS-16评分( $H=7.456$ )和唾液SNCA( $F=5.130$ )差异有统计学意义( $P<0.05$ )。经Spearman秩相关分析显示PD病情发展程度与SS-16评分呈显著负相关关系( $r=-0.351$ ,  $P=0.000$ ),其与唾液SNCA呈显著正相关关系( $r=0.426$ ,  $P=0.000$ )。ROC分析结果显示SS-16评分和唾液SNCA联合检测概率判断早期PD的AUC为0.807,显著高于SS-16评分( $P<0.05$ )和唾液SNCA( $P<0.05$ )单项检测。**结论** SS-16评分和唾液SNCA与PD发生发展密切相关,联合检测SS-16评分和唾液SNCA有助于PD的早期筛查。

**关键词:** 嗅觉评估; 唾液  $\alpha$ -突触核蛋白; 帕金森病; 早期筛查

中图分类号: R744.6; R446.112 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-095-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.023

## Application Research of Olfactory Assessment and Salivary SNCA in Early Screening of Parkinson's Disease

SHANG Tian-ming, BI Kai-xiang(Department of Psychiatry, Baoji Rehabilitation Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application of  $\alpha$ -synuclein (SNCA) and olfactory assessment in early screening for Parkinson's Disease (PD). **Methods** A total of 45 PD patients in Baoji Rehabilitation Hospital from February 2018 to February 2020 were selected as the observation group, and 45 healthy patients in the same period were selected as the control group. Sixteen odor recognition (SS-16) scores and salivary SNCA were compared between the two groups. Referring to the modified H-Y clinical scale, 45 PD patients in the observation group were further divided into early stage, middle stage and late stage, and SS-16 score and salivary SNCA of patients with different stages were compared respectively. Explore the relationship between PD disease progression and SS-16 score and salivary SNCA, and analyzed the value of SS-16 score and salivary SNCA in PD early screening using receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** The SS-16 score of the observation group was  $8.51 \pm 3.79$  points, 34 patients had olfaction disorder, the olfaction disorder rate was 75.56%, and the salivary SNCA was  $1\,272.13 \pm 38.52$  pg/ml. In the control group, the SS-16 score was  $11.04 \pm 3.96$  points, the smell disorder rate was 24.44% in 11 cases, and the salivary SNCA was  $1\,235.16 \pm 23.46$  pg/ml. There were statistically significant differences in SS-16 score ( $t=3.096$ ), olfactory disorder rate ( $\chi^2=23.511$ ) and salivary SNCA ( $t=5.499$ ) between the two groups (all  $P<0.05$ ). There were statistically significant differences between SS-16 ( $H=7.456$ ) score and salivary SNCA ( $F=5.130$ ) in PD patients of different degrees (all  $P<0.05$ ). Spearman rank correlation analysis showed that PD disease progression was negatively correlated with SS-16 score ( $r=-0.351$ ,  $P=0.000$ ), and positively correlated with salivary SNCA ( $r=0.426$ ,  $P=0.000$ ). The results of ROC analysis showed that the AUC of SS-16 score and saliva SNCA combined detection probability to judge early PD was 0.807, which was significantly higher than SS-16 score ( $P<0.05$ ) and saliva SNCA ( $P<0.05$ ). **Conclusion** SS-16 score and salivary SNCA were closely related to the occurrence and development of PD. Combined detection of SS-16 score and salivary SNCA is helpful for early screening of PD.

**Keywords:** olfactory assessment; salivary  $\alpha$ -SNCA; Parkinson's disease; early screening

作者简介: 尚天明(1981-),男,本科,主治医师,研究方向:精神病学, E-mail:baojishangtianm@163.com。

通讯作者: 毕开湘(1982-),男,本科,主治医师,研究方向:精神病学, E-mail:121131142@qq.com。

帕金森病 (parkinson's disease, PD) 是目前国内最常见的锥体外系疾病, 研究发现 PD 的患病率会随年龄的增长而升高<sup>[1]</sup>, 并且超过 90% 的 PD 患者病情进展较慢。临床上常用左旋多巴胺类药物进行治疗, 但近年来有报道指出长期应用左旋多巴胺类药物不仅副作用显著, 而且可发生药效衰减效应, 最终可使患者出现肌强直和全身僵硬的临床表现<sup>[2-3]</sup>。早期识别并进行单胺氧化酶抑制剂干预治疗可有效推迟左旋多巴胺的应用时间, 部分患者还可达到阻断病情进展的效果<sup>[4]</sup>。因此 PD 的早期识别对指导临床具有重要作用。 $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein, SNCA) 是路易氏小体的主要蛋白质成分, 既往有报道显示 SNCA 突变与 PD 关系密切<sup>[5-6]</sup>, 但较少以唾液为检测标本。另外, 嗅觉缺陷是 PD 早期非运动特征表现。因而, 本研究探讨嗅觉评估和唾液 SNCA 在 PD 早期筛查中的作用。现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取我院 2018 年 2 月~2020 年 2 月共 45 例 PD 患者作为观察组, 另选取同期 45 例体检健康者为对照组。其中观察组中男性 29 例, 女性 16 例; 平均年龄  $58.84 \pm 13.36$  岁; 体重指数  $22.78 \pm 1.65 \text{ kg/m}^2$ 。对照组中男性 32 例, 女性 13 例; 平均年龄  $58.22 \pm 14.09$  岁; 体重指数  $22.05 \pm 1.71 \text{ kg/m}^2$ 。根据改良 H-Y 临床分级量表<sup>[9]</sup>, 将观察组 45 例 PD 患者分为早期 (1, 2 级)、中期 (3 级) 和晚期 (4, 5 级)。两组的一般资料差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。本研究经我院伦理委员会批准通过, 所有受试者自愿参加且均签署知情同意书。

入选标准: ①参照国际运动障碍疾病协会帕金森病诊断新标准 (2015 年版) 诊断为 PD 者<sup>[7]</sup>; ②病例资料完整且自愿参加本研究; ③无严重心、肺等基础性疾病。

排除标准: ①精神障碍、重度抑郁、先天性智力发育不全者; ②视力、听力障碍、鼻和鼻窦病变者; ③近期急性上呼吸道感染者。

1.2 仪器与试剂 采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 SNCA 蛋白水平, 检测试剂盒由南京卡米洛生物工程有限公司提供。

1.3 方法 嗅觉评估方法: 采用嗅觉评估工具 Sniffin' Sticks 方法中的 16 种气味识别 (SS-16) 进行评估。具体如下: 选取酱油、鸡精、橙子、大蒜、米饭、香蕉、柠檬、绿茶、咖啡、巧克力、桂皮、玫瑰、草莓、黄油、香水及海藻 16 种常见气味。检测时让受试者充分闻嗅后记录识别结果, 每间隔 4 周进行 1 次检测, 共 3 次。计分 0~16 分, 以 16 种气味识别 (SS-16) 评分  $\leq 10$  分为有嗅觉障碍<sup>[8]</sup>。

唾液 SNCA 的检测方法: 检测前受试者禁食

2h, 清晨用生理盐水漱口, 刺激唾液分泌, 收集 3ml 唾液并置于离心管中, 将唾液标本离心除菌后冷冻保存。采用 ELISA 法检测 SNCA 的表达水平, 具体操作按试剂盒说明书严格进行。

1.4 统计学分析 选用 SPSS22.0 统计学软件处理和分析数据。对于符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 对于不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验。计数资料以 ( $n/\%$ ) 表示, 相关性分析采用 pearson 或 Spearman 秩相关分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组 SS-16 评分、嗅觉障碍率和唾液 SNCA 的比较 观察组嗅觉障碍共 34 例, 嗅觉障碍率为 75.56%。对照组嗅觉障碍 11 例, 嗅觉障碍率为 24.44%。两组嗅觉障碍率差异具有统计学意义 ( $\chi^2=23.511, P < 0.05$ )。两组唾液 SNCA ( $1272.13 \pm 38.52 \text{ pg/ml}$  vs  $1235.16 \pm 23.46 \text{ pg/ml}$ ) 和 SS-16 评分水平 ( $8.51 \pm 3.79$  分 vs  $11.04 \pm 3.96$  分) 差异均具有统计学意义 ( $t=5.499, 3.096, P < 0.05$ )。

2.2 不同程度 PD 患者 SS-16 评分和唾液 SNCA 的比较 见表 1。不同程度 PD 患者的 SS-16 评分和唾液 SNCA 差异具有统计学意义 ( $H=7.456, F=5.130, P < 0.05$ )。经 Spearman 秩相关分析, PD 病情发展程度与 SS-16 评分呈显著负相关关系 ( $r=-0.351, P=0.000$ ), 与唾液 SNCA 呈显著正相关关系 ( $r=0.426, P=0.000$ )。

表 1 不同程度 PD 患者 SS-16 评分和唾液 SNCA 的比较

指标	早期	中期	晚期
SS-16 评分 [ $M(P_{25}, P_{75})$ 分]	10 (7, 13)	9 (6, 13)	7 (4, 11)
唾液 SNCA ( $\bar{x} \pm s$ pg/ml)	$1260.22 \pm 20.17$	$1274.51 \pm 16.69$	$1281.36 \pm 18.03$

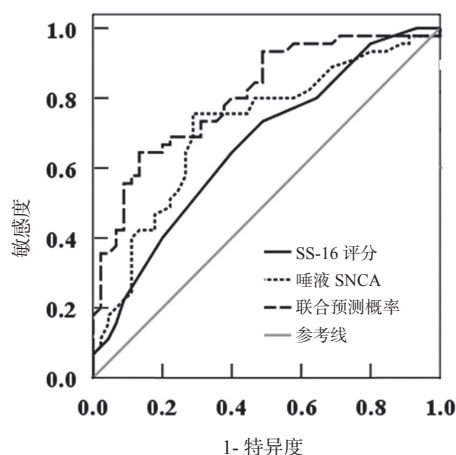


图 1 SS-16 评分和唾液 SNCA 判断早期 PD 的 ROC 分析

2.3 SS-16 评分与唾液 SNCA 在 PD 早筛中的价值以 SS-16 评分和唾液 SNCA 为检验变量,以是否为早期 PD 为状态变量绘制 ROC 曲线,见图 1。结果显示 SS-16 评分和唾液 SNCA 对 PD 的早期判断具有一定的应用价值 ( $P<0.05$ )。进一步对 SS-16 评分

和唾液 SNCA 进行二分类 Logistic 回归分析,见表 2。ROC 分析结果发现两者联合预测概率判断早期 PD 的 AUC 为 0.807,显著高于 SS-16 评分和唾液 SNCA 单项检测的 AUC 值。

表 2 SS-16 评分和唾液 SNCA 判断早期 PD 的 Logistic 回归分析

检验变量	AUC	SE	P	95%CI	敏感度	特异度	截断值
SS-16 评分	0.664	0.057	0.007	0.553-0.776	0.733	0.511	8.500
唾液 SNCA	0.716	0.055	0.000	0.608-0.824	0.800	0.533	1 267.500
联合预测概率	0.807	0.046	0.000	0.717-0.896	0.844	0.676	-

### 3 讨论

PD 是病程较长的神经退行性疾病,PD 的早期识别和防治对改善患者预后具有重要意义。已有研究证实 PD 存在较长的前驱阶段,此阶段因神经细胞变性逆行,导致鼻腔上皮和嗅球细胞功能异常<sup>[10]</sup>,患者临床表现为嗅觉障碍等非运动症状。罗懿等<sup>[11]</sup>报道嗅觉障碍可被认为是 PD 的早期预警筛查项目。另外,周立等<sup>[12]</sup>还提出嗅觉障碍不仅是 PD 的首发症状,其严重程度与 PD 病情呈显著相关性,此与本文结果一致。本文探讨了 SS-16 评分对 PD 诊断的临床价值,结果显示其判断 PD 风险的 AUC 为 0.664,提示 SS-16 可作为早期 PD 的辅助筛查项目,但单项检测的价值有限。PD 患者嗅觉障碍仅反映嗅脑病理改变,而与黑质多巴胺神经元功能损伤无关<sup>[13]</sup>,这是造成 SS-16 评分诊断早期 PD 特异度较低的重要原因。

对于处于非运动症状的 PD 患者,大多已伴有临床生物学标记物的异常,因而有学者认为联合检测非运动症状和生物标记物有助于提高 PD 阳性检出率<sup>[14]</sup>。由 SNCA 基因编码组成的路易小体是 PD 重要的病理标记物,SNCA 不仅可通过激活小胶质细胞,成为 PD 的始发因子,还可能成为 SNCA 基因变异和 PD 易感性的诱因<sup>[15]</sup>。既往有报道显示脑脊液 SNCA 与 Hoehn-Yahr 分级相关,对 PD 和阿尔茨海默病鉴别诊断也有辅助作用,但临床也有研究认为脑脊液 SNCA 在健康志愿者与 PD 患者间无显著差异<sup>[16-17]</sup>,且受标本取材限制,脑脊液 SNCA 检测在临床应用难以推广。而外周血作为目前临床实验室常用检测标本,因其易受红细胞污染,PD 患者外周血 SNCA 仍存在争议<sup>[18]</sup>。本研究选用唾液作为实验标本,不仅因唾液标本具有无创、简便易收集特点,且最近有研究证明分泌唾液的下颌下腺是 PD 早期的受累靶器官<sup>[19-20]</sup>。本研究采用 ELISA 法进行检测,结果发现唾液 SNCA 与 PD 病情程度呈显著相关性,且唾液 SNCA 诊断 PD 的 AUC 为 0.716,提示唾液 SNCA 有可能成为 PD 早期筛查的潜在生物标记物。

本研究联合应用 SS-16 评分和唾液 SNCA,结果显示其 AUC 达 0.807,显著高于 SS-16 评分与唾液 SNCA 单项检测的 AUC 值,说明生物标记物与非运动症状联合筛查模式有助于提高 PD 的敏感度和特异度。

### 参考文献:

- [1] 王姝,莫英绪,彭芳,等.广西北海地区帕金森病患病率与饮食因素的相关性研究[J].中华老年心脑血管病杂志,2018,20(4):417-418.  
WANG Shu, MO Yingxu, PENG Fang, et al. Correlation between the prevalence of Parkinson's disease and dietary factors in Beihai Guangxi[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Ves Dis, 2018,20(4):417-418.
- [2] CHEN Tongkai, LIU Wei, XIONG Sha, et al. Nanoparticles mediating the sustained puerarin release facilitate improved brain delivery to treat Parkinson's disease[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(48):45276-45289.
- [3] 李迎,刘婷婷,胡盼盼,等.多巴胺能药物对早期帕金森病患者决策认知功能的影响[J].临床神经病学杂志,2019,32(3):206-209.  
LI Ying, LIU Tingting, HU Panpan, et al. The effects of dopaminergic medication on cognitive function of decision-making in patients with early stage Parkinson's disease[J]. Journal of Clinical Neurology, 2019,32(3):206-209.
- [4] 杨丽娟,牛晓珊,何晓燕,等.多巴胺受体激动剂普拉克索和单胺氧化酶 B 抑制剂司来吉兰治疗早期帕金森综合征的疗效对比[J].中华脑科疾病与康复杂志(电子版),2017,7(1):5-9.  
YANG Lijuan, NIU Xiaoshan, HE Xiaoyan, et al. The therapeutic effects comparison of Parkinson's syndrome in the early stage treated by dopamine agonist pramipexole and monoamine oxidase B inhibitor selegiline[J]. Chinese Journal of Brain Diseases and Rehabilitation(Electronic Edition), 2017,7(1):5-9.
- [5] EUSEBI P, GIANNANDREA D, BISCETTI L, et al. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Movement Disorders, 2017, 32(10): 1389-1400.
- [6] 张照婷,伏兵,葛中林,等.连云港地区帕金森病患者非运动症状与 SNCA 基因多态性的相关性研究[J].神经损伤与功能重建,2019,14(10):529-530.

(下转第 110 页)



## 冠心病患者外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值与冠脉狭窄程度的相关性研究

陈青文, 李丹丹 (中国人民解放军东部战区总医院检验科, 南京 210002)

**摘要:** **目的** 分析冠心病 (coronary artery disease, CAD) 患者外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值 (neutrophil/lymphocyte ratio, NLR) 与冠脉狭窄程度的相关性, 探讨 NLR 的临床应用价值。 **方法** 收集 2016 年 7 月~2018 年 9 月东部战区总医院心血管内科收治的 278 例 CAD 患者和同期来院体检的 117 例健康对照者的临床资料、血细胞检测及血生化指标, 根据病情将 CAD 患者分为稳定型冠心病 (stable coronary artery disease, SCAD) 和急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 两组, 同时根据冠状动脉造影结果又将 CAD 患者分为观察组、单支病变组、双支病变组和三支病变组, 统计各组患者 Gensini 积分。比较各组间外周血 WBC, NLR 及 CRP 水平差异, 并分析 NLR 与心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 水平和 Gensini 积分的相关性, ROC 曲线分析 NLR 对 CAD 病情的辅助诊断价值。 **结果** 外周血 WBC, NLR 及 CRP 在各组中差异有统计学意义 ( $\chi^2=29.962, 31.045, F=17.656$ , 均  $P<0.05$ ), 且 NLR 与 CAD 患者 cTnI 水平和 Gensini 积分呈正相关 ( $r=0.381, P=0.000; r=0.217, P=0.000$ ); NLR 用于诊断 CAD, SCAD 及 ACS 患者的 ROC 曲线下面积分别为 0.720(95%CI: 0.671~0.770,  $P=0.000$ ), 0.643(95%CI: 0.582~0.704,  $P=0.000$ ), 0.835(95%CI: 0.787~0.884,  $P=0.000$ )。 **结论** NLR 水平可作为冠脉狭窄程度的辅助评估指标。

**关键词:** 冠心病; 中性粒细胞/淋巴细胞比值; 冠脉狭窄程度

中图分类号: R541.4; R446.111 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-098-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.024

## Correlation between the Degree of Coronary Stenosis and the Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Patients with Coronary Artery Disease

CHEN Qing-wen, LI Dan-dan

(Department of Clinical Laboratory, Eastern Theater General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

**Abstract: Objective** To analyze the correlation between the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and the degree of coronary stenosis, and explore the clinical application value of NLR. **Methods** The clinical and laboratory data of 278 patients with CAD admitted to the Department of Cardiology, Eastern Theater General Hospital of PLA from July 2016 to September 2018 were selected, and 117 healthy candidates as controls. CAD patients were divided into two groups including stable coronary artery disease (SCAD) and acute coronary syndrome (ACS) according to their conditions. Meanwhile, CAD patients were divided into observation group, single-vessel disease group, double-vessel disease group and triple-vessel disease group according to the results of coronary angiography, and Gensini scores of each group were counted. The differences of WBC, NLR and CRP in peripheral blood of each group were compared, and the correlation between NLR and cTnI level and Gensini scores were analyzed respectively. The diagnostic value of NLR for CAD condition was analyzed by ROC curve. **Results** The differences of WBC, NLR and CRP in peripheral blood of each group were statistically significant ( $\chi^2=29.962, 31.045, F=17.656$ , all  $P<0.05$ ), and NLR was positively correlated with cTnI level and Gensini scores in CAD patients ( $r=0.381, P=0.000; r=0.217, P=0.000$ ). The area under the ROC curve of NLR used to diagnose patients with CAD, SCAD and ACS was 0.720(95%CI: 0.671~0.770,  $P=0.000$ ), 0.643(95%CI: 0.582~0.704,  $P=0.000$ ) and 0.835(95%CI: 0.787~0.884,  $P=0.000$ ) respectively. **Conclusion** NLR level can be used as an auxiliary evaluation index of the degree of coronary stenosis.

**Keywords:** coronary artery disease; neutrophil/lymphocyte ratio; the degree of coronary stenosis

冠心病 (coronary artery disease, CAD) 是冠状动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病变发生狭窄或阻塞, 供血、供氧不足而引起的一系列心肌缺血症, 严重威胁人类生命健康, 具有高发病率、高死

亡率、高致残率、高复发率和多并发症的特征<sup>[1]</sup>。CAD 发生急性冠脉事件时起病突然, 后果凶险, 短时间内即可造成心肌不可逆损伤, 严重影响患者预后及生存质量<sup>[2]</sup>。目前 CAD 的检查和诊断主要

作者简介: 陈青文 (1993-), 女, 本科, 技师, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: cqwxsc999@163.com。

通讯作者: 李丹丹, 技师, 从事动脉粥样硬化性心血管疾病的新型标志物研究, E-mail: lidandan0526@163.com。

依靠临床症状、心肌损伤标志物、心电图、冠状动脉造影等手段,因CAD发生的原因具有复杂性,且症状繁多,在CAD早期、疗效监控及预后判断方面,现有的技术手段(尤其是心肌损伤标志物和冠状动脉造影检测)不仅耗时、有创、花费成本高,限制了患者的接纳程度及普及范围<sup>[3]</sup>。所以,寻找适用于CAD诊断和病情监测的取材方便、检测快速且可靠的指标是目前亟需解决的临床问题。多个研究显示,除血脂异常外,激活的炎症反应在CAD发生、发展中起到关键作用。白细胞(white blood cell, WBC)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和中性粒细胞淋巴细胞比率(the neutrophil/lymphocyte ratio, NRL)均被认为是CAD患者预测的危险指标<sup>[4]</sup>。NRL与CAD,休克及As的发生密切相关<sup>[5]</sup>,但NLR对CAD患者的冠脉狭窄程度的评估价值尚不清楚。因此,本研究旨在回顾性分析外周血NRL水平与CAD患者冠脉狭窄程度的相关性,以期发现NLR对CAD的病情评估价值。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选择2016年7月~2018年9月在东部战区总医院心血管内科收治的278例CAD患者,平均年龄 $63.93 \pm 11.53$ 岁,其中男性179例,女性99例。纳入标准:确诊为CAD且首次入院治疗(根据病史、临床诊断)。排除标准:所有入选患者无严重肝肾功能不全、血液系统疾病、恶性肿瘤、甲状腺功能异常、心脏病、瓣膜性心脏病及急慢性感染。健康对照组:收集同期在体检中心体检的正常对照者117例,平均年龄为 $60.94 \pm 8.77$ 岁,其中男性74例,女性43例。入选标准:经病史询问、常规体格检查以及实验室检查各项检测指标均正常的患者,本研究经东部战区总医院伦理委员会审查通过。

**1.2 试剂与仪器** WBC分类及计数采用希森美康XN2000全自动血细胞仪及配套试剂;CRP水平测定采用深圳国赛Olimpo及配套试剂;cTNT或cTNI含量测定采用东曹AIA2000及配套试剂;血脂[总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]和空腹血糖(GLU)检测采用7600型全自动生化分析仪及各自检测试剂盒进行检测。

## 1.3 方法

**1.3.1 冠状动脉造影**由心内科导管室专业医师在标准导管室完成操作,对每支冠状动脉血管的狭窄程度进行定量评定,患者均采用Judkins法行多体位左、右冠状动脉造影。

**1.3.2 分组参考**2013年欧洲心脏学会对稳定型心绞痛(stable coronary artery disease, SCAD)的诊断标准<sup>[6]</sup>及美国心脏病学会基金会对急性冠脉综

合征(acute coronary syndrome, ACS)的诊断标准<sup>[7]</sup>,将CAD患者分为SCAD组和ACS组。其中ACS组包括不稳定型心绞痛、急性ST段抬高性心肌梗死和急性非ST段抬高型心肌梗死的患者;SCAD组包括稳定型心绞痛和陈旧性心肌梗死患者。根据美国心脏病协会的冠状动脉分段评价标准,采用Gensini积分系统<sup>[8]</sup>。以冠状动脉的左主干支、左前降支、左回旋支以及右冠状动脉的血管狭窄情况进行评价。血管狭窄程度评价标准为: $< 50\%$ 为无明显狭窄; $50\% \sim 75\%$ 为中度狭窄; $> 75\%$ 为重度狭窄;血管狭窄程度 $\geq 50\%$ 即为血管狭窄标准,据此将CAD组分为观察组(0支血管狭窄组)、单支病变组、双支病变组和多支病变组。

**1.3.3 数据资料的归纳和整理**包括性别、年龄、身高、体重、白细胞(WBC)、中性粒细胞(NC)、淋巴细胞(LC),TC, TG, HDL-C, LDL-C, GLU和Gensini积分。根据NC和LC结果计算NLR水平。

**1.4 统计学分析** 数据分析采用SPSS 20.0软件进行。所有数据统计前行正态性检验和方差齐性分析,符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较用独立样本 $t$ 检验分析,多组间比较用单因素方差分析。方差齐性时,两组比较采用LSD检验;方差非齐性时,两组比较采用Tamhane's检验。符合非正态分布的数据以中位数(四分位数间距)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,两组间用非参数Mann-Whitney  $U$ 检验比较,多组间用Kruskal-Wallis  $H$ 秩和检验比较。变量间的相关性采用Spearman相关分析,ROC曲线分析NLR对CAD病情的预测价值。采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组临床资料及血生化指标结果比较** CAD患者组与对照组间性别、年龄及体重指数(body mass index, BMI)等比较差异无统计学意义(三者均 $P > 0.05$ )。在血脂、血糖方面,CAD患者TG和GLU水平均高于健康对照组,而HDL水平低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 CAD组与对照组各相关指标比较** 见表1。根据病情将CAD患者分为稳定型冠心病组(stable coronary artery disease, SCAD,  $n=153$ )和急性冠脉综合征组(acute coronary syndrome, ACS,  $n=125$ )。SCAD组和ACS组间WBC, NLR和CRP水平均高于正常对照组,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

表1 正常组、SCAD组和ACS组间各观察指标水平比较 [M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>),  $\bar{x} \pm s$ ]

项目	健康对照组 (n=117)	SCAD组 (n=153)	ACS组 (n=125)	$F/\chi^2$	P
WBC ( $\times 10^9/L$ )	5.81 $\pm$ 1.36	6.00 $\pm$ 1.55	7.67 $\pm$ 2.98	29.962	0.000
NLR	1.81 $\pm$ 0.71	2.38 $\pm$ 1.57	4.01 $\pm$ 3.58	31.045	0.000
CRP(mg/L)	0.5(0.5,0.8)	0.8(0.5,2.4)	2.5(0.5,10.2)	17.656	0.000

2.3 CAD患者冠脉狭窄支数与各观察指标水平比较 见表2。根据冠脉造影结果又将CAD患者分为观察组 (n=43), 单支病变组 (n=91), 双支病变

组 (n=51) 和三支病变组 (n=93)。不同病变支数组的WBC, NLR, CRP水平和Gensini评分均高于观察组, 差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

表2 CAD患者冠脉狭窄支数与各观察指标水平比较 [M(P<sub>25</sub>, P<sub>75</sub>),  $\bar{x} \pm s$ ]

参数	观察组 (n=43)	单支病变组 (n=91)	双支病变组 (n=51)	多支病变组 (n=93)	$F/\chi^2$	P
WBC ( $\times 10^9/L$ )	5.41 $\pm$ 1.40	6.46 $\pm$ 2.15	6.81 $\pm$ 1.91	7.09 $\pm$ 2.63	6.211	0.000
NLR	2.04 $\pm$ 0.80	2.85 $\pm$ 1.89	3.13 $\pm$ 2.53	3.62 $\pm$ 3.32	3.198	0.024
CRP(mg/L)	0.5(0.5,1.0)	1.1(0.5,4.5)	1.5(0.5,3.2)	2.2(0.5,6.4)	14.175	0.003
Gensini评分	5(3,7)	11(7,19)	23(14,35)	44(28,65)	156.828	0.000

2.4 相关性分析 对外周血NLR和心肌肌钙蛋白1(cTnI)及Gensini评分的相关性进行分析, 结果显示, NLR水平和cTnI及Gensini评分呈正相关,  $r$ 值分别为0.380和0.217, 均  $P < 0.05$ 。

2.5 NLR评估CAD及鉴别SCAD和ACS患者的临床价值分析 见图1。NLR评估CAD, SCAD及ACS患者的曲线下面积分别为0.720(95%CI:0.671~0.770,  $P=0.000$ ), 0.643(95%CI: 0.582~0.704,  $P=0.000$ ), 0.835(95%CI: 0.787~0.884,  $P=0.000$ )。

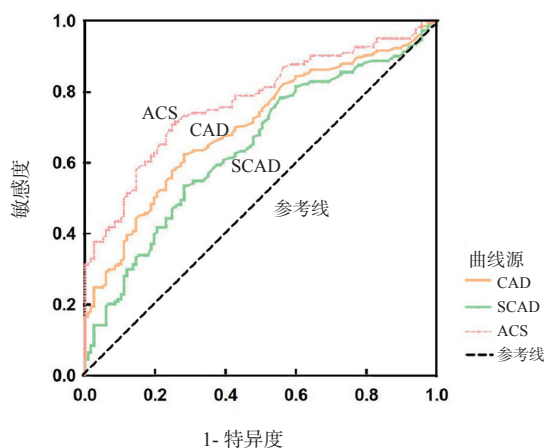


图1 NLR用于评估CAD, SCAD及ACS的ROC曲线

### 3 讨论

As是CAD的发病基础, 近年来, 大量研究表明, As是一种慢性炎症性疾病, 血管壁处脂质沉积、炎症细胞及多种相关的炎症分子和细胞因子等的相互作用贯穿As发生发展的始终<sup>[9]</sup>。目前, 基于血液检查的炎症指标如WBC及其分类、CRP均已被证实参与CAD不同的病理生理通路, 由WBC及其分类检测衍生的新指标NLR, 亦被证明与CRP有良好的相关性, 在CAD中具有良好的预测价值<sup>[5]</sup>。在本研究中, 出现冠脉狭窄的CAD患者组

WBC, NLR, CRP和Gensini积分均高于观察组, 且各组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 同时, CAD组WBC, NLR, CRP水平明显高于非CAD组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这些结果也进一步证实, 炎症细胞介导的炎症反应参与了CAD的发生发展过程, 高水平WBC, NLR, CRP有望是CAD患者发生不良心血管事件的危险性参考指标。然而, WBC计数和CRP受年龄、感染因素等影响差异较大, NLR水平能同时反映机体NC和LC的变化, 比WBC计数和CRP能更好地反映机体的炎症和应激程度<sup>[10-12]</sup>。可见, 在检测CAD传统危险因素如血脂、血糖、心肌损伤标志物的基础上, 同时分析血液NLR水平, 将有助于评估CAD进一步发生危险事件的风险, 并起到一定的预警作用。

为进一步探讨NLR与CAD患者冠脉狭窄程度的相关性, 本研究通过Spearman相关分析发现, NLR与cTnI和Gensini积分呈正相关, 这提示, 随着CAD冠脉狭窄程度增加, NLR水平越高, 同时, NLR是高Gensini积分的独立预测因子。此外, 我们进一步通过ROC曲线分析NLR评估CAD及CAD患者不同分组病人的效率进行了探索, 结果显示, NLR预测CAD和SCAD的曲线下面积分别为0.720和0.643, 而NLR预测ACS时的曲线下面积可达0.835, 具有较高的诊断价值。这也提示NLR能有效地反映CAD的存在及冠脉狭窄程度。紧急状态下, 心肌损伤标志物或冠脉造影结果未能在短时间内发出时, 临床医师可参考血细胞检测及NLR结果对患者病情做出迅速评估, 以防延误最佳治疗时机。

总而言之, NLR与CAD冠脉狭窄程度密切相关, 且具有简单易行、方便快捷、易于推广和检测的优势, 可作为临床医生预测CAD患者冠脉狭窄



程度的便捷参考指标。因研究入选患者均来自单中心,样本量较小,结果可能会受到其他混杂因素的影响,后续研究仍需设计前瞻性多中心实验,进一步扩大样本量,以期获得更可靠的应用数据。

#### 参考文献:

- [1] CHEN Weiwei, GAO Runlin, LIU Lisheng, et al. China cardiovascular diseases report 2015: a summary[J]. Journal of Geriatric Cardiology, 2017, 14(1): 1-10.
- [2] AGGARWAL M, AGGARWAL B, RAO J. Integrative medicine for cardiovascular disease and prevention[J]. The Medical Clinics of North America, 2017, 101(5): 895-923.
- [3] GÉNÉREUX P, MEHRAN R, LEON M B, et al. Classification for assessing the quality of diagnostic coronary angiography[J]. The Journal of Invasive Cardiology, 2017, 29(12): 417-420.
- [4] RUPARELIA N, CHAI J T, FISHER E A, et al. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies[J]. Nature Reviews Cardiology, 2017, 14(5): 314.
- [5] AFARI M E, BHAT T. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and cardiovascular diseases: an update[J]. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2016, 14(5): 573-577.
- [6] MONTALESCOT G, SECHTEM U, ACHENBACH S, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. [J]. European Heart Journal, 2013, 34(38): 2949-3003.
- [7] CANNON C P, BRINDIS R G, CHAITMAN B R, et al. 2013 ACCF/AHA key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes and coronary artery disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards(Writing Committee to Develop Acute Coronary Syndromes and Coronary Artery Disease Clinical Data Standards)[J]. Circulation, 2013, 127(9): 1052-1089.
- [8] GENSINI G G. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. The American Journal of Cardiology, 1983, 51(3): 606.
- [9] MALLIKA V, GOSWAMI B, RAJAPPA M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective[J]. Angiology, 2007, 58(5): 513-522.
- [10] 王阳斌, 夏茂, 夏永泉. 血浆 vWF、D-二聚体水平与外周血中性粒细胞/淋巴细胞比值联合检测在血栓性疾病中的临床诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 86-89.
- WANG Yangbin, XIA Mao, XIA Yongquan. Diagnostic value of vWF combined with D-dimer and peripheral blood NLR in the diagnosis of thrombotic disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 86-89.
- [11] 孟欣, 胡辽辽, 张宁. 等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在甲、乙型流感病毒感染患者预测价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(20): 2464-2467.
- MENG Xin, HU Liaoliao, ZHANG Ning, et al. Predictive value of neutrophil/lymphocyte ratio in patients infected with influenza A and B virus[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(20): 2464-2467.
- [12] 任党利, 韩海燕, 周鑫, 等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值在区分不同病原菌引起血流感染的价值[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 102-105.
- REN Dangli, HAN Haiyan, ZHOU Xin, et al. Clinical evaluation on ratio of neutrophil-to-lymphocyte in different pathogens[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(2): 102-105.

收稿日期: 2020-01-01 修回日期: 2020-06-02

#### (上接第41页)

- [16] LIU Xiaoliang, ZHOU Kaiyu, HUA Yimin, et al. Prospective evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio for intravenous immunoglobulin resistance in a large cohort of kawasaki disease patients[J]. Pediatric Infectious Disease Journal, 2020, 39(3): 229-231.
- [17] 袁迎第, 孙军, 魏春雷. 中性粒细胞与淋巴细胞比值对川崎病患儿冠状动脉扩张的预测作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(21): 1661-1664.
- YUAN Yingdi, SUN Jun, WEI Chunlei. The usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting coronary artery dilation with Kawasaki disease [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2017, 32(21): 1661-1664.
- [18] 陈利涛. 中性粒细胞与淋巴细胞比值、血小板与淋巴细胞比值在预测川崎病免疫球蛋白敏感性中的价值研究[J]. 全科医学临床与教育, 2019, 17(7): 616-618, 622.
- CHEN Litao. Values of neutrophil to lymphocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio in predicting the sensitivity of immunoglobulin to Kawasaki disease [J]. Clinical Education of General Practice, 2019, 17(7): 616-618, 622.
- [19] 袁迎第, 孙军, 李鹏飞, 等. 中性粒细胞与淋巴细胞比值及血小板与淋巴细胞比值对于川崎病 IVIG 敏感性的预测价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 410-413.
- YUAN Yingdi, SUN Jun, LI Pengfei, et al. Values of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in predicting sensitivity to intravenous immunoglobulin in Kawasaki disease[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(4): 410-413.
- [20] CHEN Yongbing, HUA Ying, ZHANG Chunyu, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts intravenous immunoglobulin-resistance in infants under 12-months old with Kawasaki disease[J]. Frontiers in Pediatrics, 2019, 7: 81.
- [21] 王策, 于宪一. 320例川崎病患儿临床特点及冠状动脉损伤的高危因素分析[J]. 中国小儿急救医学, 2018, 25(12): 939-942, 947.
- WANG Ce, YU Xianyi. Clinical characteristics and risk factors of coronary artery abnormalities in 320 children with Kawasaki disease[J]. Chinese Pediatric Emergency Medicine, 2018, 25(12): 939-942, 947.

收稿日期: 2020-05-23 修回日期: 2020-06-04

# 布鲁氏菌血清 IgM, IgG 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立及初步临床应用

刘涵轩<sup>1</sup>, 伍波<sup>1</sup>, 赵正春<sup>1</sup>, 陈超<sup>1</sup>, 韩露<sup>1</sup>, 梁辰<sup>2</sup>, 薛辉<sup>2</sup>, 冯杰<sup>2</sup>, 颜光涛<sup>2</sup>

(1. 北京中检安泰诊断科技有限公司, 北京 102600; 2. 解放军总医院第一医学中心医学检验中心, 北京 100853)

**摘要:** **目的** 应用胶体金免疫层析技术建立一种快速检测布鲁氏菌 IgM, IgG 抗体的方法, 并进行初步的性能验证。**方法** 采用枸橼酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记纯化的抗重组布鲁氏菌抗原, 将鼠抗人 IgG 抗体、鼠抗人 IgM 抗体和兔抗布鲁氏菌抗体喷在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线, 对 pH 值和抗体浓度等条件优化; 评估试剂盒灵敏度、特异度、交叉反应、准确度、精密度和干扰实验; 用该方法对临床的 400 份血清进行检测, 试管凝集试验验证其准确性。**结果** 该试纸条最佳胶体金标记的 pH 值为 7.5, 标记重组抗原质量浓度为 30 μg/ml。方法的灵敏度和稳定性较好且与其他病原菌无交叉反应。血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度的增高会使试纸条显色结果减弱。对 400 份临床样本进行检测, 其结果与试管凝集试验的符合率为 93.75%。**结论** 该试验建立的布鲁氏菌 IgM/IgG 抗体的胶体金免疫层析检测方法具有较好的特异度和稳定性, 整个检测过程可在 15min 内完成, 能够快速检测样品血清, 适用于现场快速检测。

**关键词:** 胶体金; 布鲁氏菌; 快速检测; 性能验证

中图分类号: R378.5; R446.61 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-102-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.025

## Preliminary Clinical Application of Colloidal Gold Immunochromatographic Detection of *Brucella* IgM, IgG Antibodies

LIU Han-xuan<sup>1</sup>, WU Bo<sup>1</sup>, ZHAO Zheng-chun<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>1</sup>, HAN Lu<sup>1</sup>, LIANG Chen<sup>2</sup>,  
XUE Hui<sup>2</sup>, FENG Jie<sup>2</sup>, YAN Guang-tao<sup>2</sup>

(1. Beijing Zhongjian Antai Diagnostic Technology Co., Ltd, Beijing 102600, China; 2. Center for Clinical Laboratory Medicine, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract:** **Objective** A rapid detection method of IgM, IgG antibody against *Brucella* was established by colloidal gold immunochromatography, and the preliminary performance verification was carried out. **Methods** Colloidal gold particles were prepared by trisodium citrate reduction method, and the purified anti-recombinant *Brucella* antigen was labeled. A mouse anti-human IgG antibody, a mouse anti-human IgM antibody, and a rabbit anti-*Brucella* antibody were sprayed on a nitrocellulose membrane as a detection line and a quality control line, and optimized for pH, antibody concentration, and other conditions. Assessed the kit sensitivity, specificity, cross-reactivity, accuracy, precision, and interference experiments. This method was used to test 400 clinical serums, and the tube agglutination test verified its accuracy. **Results** The test strip had an optimum pH of 7.5 and a labeled recombinant antigen concentration of 30 μg/ml. The method had good sensitivity and stability. It had no cross-reaction with other pathogens, and the increase of serum total bilirubin, blood lipid and hemoglobin concentration would weaken the coloration of test strips. For 400 clinical samples, the coincidence rate with the tube agglutination test was 93.75%. **Conclusion** The colloidal gold immunochromatographic assay for *Brucella* IgM, IgG antibody established in this experiment has good specificity and stability. The whole detection process can be completed within 15min, which can quickly detect sample serum and is suitable for rapid detection on site.

**Keywords:** colloidal gold; *Brucella*; rapid detection; performance verification

布鲁氏菌病 (*Brucellosis*) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的一种人畜共患的自然疫源性传染病。该病在 160 多个国家和地区有存在和流行<sup>[1]</sup>。在我国, 2005~2016 年布鲁氏菌病疫情总体呈上升趋势,

2014 年全国疫情达到历史记载的最高水平<sup>[2]</sup>。布鲁氏菌病的明确诊断依赖于可疑患者体液中致病细菌的证明, 通常通过培养鉴定<sup>[3]</sup>。快速准确的诊断是控制该疾病的关键步骤。目前常用的实验室方法不

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAK45B01)。

作者简介: 刘涵轩 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: lhxwf5566@126.com。

通讯作者: 颜光涛, 男, 研究员, 博士生导师, E-mail: yan301@263.net。

能同时具备检测过程快速灵敏、使用环境多样、操作要求简单以及高性价比等特点<sup>[4]</sup>。胶体金免疫层析法具有样本用量少、易于操作、检测速度快、准确度较高等优点,可在实验室和应用现场进行疾病的快速诊断和筛查<sup>[5]</sup>。

研究表明,IgM 抗体检测对布鲁氏菌病急性期诊断有意义,而 IgG 抗体检测对慢性布鲁氏菌病诊断有较高的参考价值<sup>[6]</sup>。本文建立了一种可同时测定布鲁氏菌病 IgM 抗体和 IgG 抗体胶体金免疫层析分析方法,为布鲁氏菌病的早期诊断提供了新的技术工具,有一定的临床应用前景。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 400 份被检血清来自内蒙古地区医院,200 份阴性血清来自非布鲁氏菌病流行区医院体检健康人群。高总胆红素、高血脂和溶血阳性血清均来自北京中检安泰诊断科技有限公司保存质控品。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器设备:XYZ3060 三维喷点平台、CM4000 切条机购自 Biodot 公司;MK3 酶标仪购自美国热电公司。

1.2.2 主要试剂:重组布鲁氏菌抗原、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgM 单克隆抗体、兔抗布鲁氏菌多克隆抗体、硝酸纤维素膜 CNC、金标垫购自某生物原料公司;布鲁氏菌试管凝集试验抗原购自青岛中创生物科技有限公司;布鲁氏杆菌 IgG 和 IgM 抗体检测试剂盒(ELISA 法)购自美国 DRG 公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 研究方法

#### 1.3.1 试剂盒检测方法的建立

1.3.1.1 胶体金颗粒的选择目标:选择制备粒径大小为 30 nm 的胶体金,在 100ml 纯化水中加入 4ml 1g/dl 氯金酸煮沸、在搅拌条件下加入 1.6ml 的 4g/dl 枸橼酸三钠溶液,煮沸 5 min。放置于室温环境自然冷却,应用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后定容到原体积,室温避光保存备用。观察胶体金溶液的物理性状,取 10ml 溶液在波长 400nm~700nm 范围内进行扫描,测定其最大吸收峰。

1.3.1.2 胶体金标记最适 pH 值的选择:取若干个 1.5ml 试管,分别加入 1ml 胶体金;用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  或 5 mol/L 盐酸将 pH 分别调为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10。分别取不同 pH 值的胶体金溶液 100  $\mu$ l 加到酶标孔内,3  $\mu$ l 浓度为 1mg/ml 的重组布鲁氏菌抗原,混匀,室温放置 15min;每孔分别加入 20  $\mu$ l 10g/dl NaCl 溶液,混匀,室温放置 2 h,在酶标仪上读取 522nm 波长下吸光度值;记录吸光度值变化最小的 pH 值(X)。再将 pH 值按梯度调

为 X-1.0, X-0.5, X, X+0.5, X+1, 重复上述步骤,保持吸光度值变化最小的 pH 值为最佳 pH 值<sup>[7]</sup>。

1.3.1.3 胶体金标记重组:布鲁氏菌抗原标记量的确定首先采用盐沉淀法选择重组布鲁氏菌抗原的最低标记量,然后用交叉配比法选出重组布鲁氏菌抗原的最佳标记量。取 8 支试管,分别加入的胶体金溶液 1ml;各试管依次加入不同质量浓度的重组抗原(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35  $\mu$ g/ml),混匀,室温放置 40min;加入 20  $\mu$ l 10g/dl NaCl,室温下放置 2h;颜色仍保持红色的为标记的最低重组抗原用量。通常在此基础上增加 20% 的重组抗原量即为标记时所需重组抗原的最佳量。

1.3.1.4 免疫层析 NC 膜的制备:根据本试验前期研究,确定检测线包被浓度为鼠抗人 IgG 1.0mg/ml,鼠抗人 IgM 1.0mg/ml;质控线包被浓度为兔抗布鲁氏菌抗体 2.0mg/ml。用三维喷点平台分别在 NC 膜上进行划线,喷点量为 0.1  $\mu$ l/mm,相隔 0.5cm,37 $^{\circ}$ C 干燥 3h 备用。

1.3.1.5 胶体金免疫层析试剂条的组装:将样品垫(滤血膜和玻璃纤维)、胶体金结合垫、制备完成的 NC 膜和吸水垫依次贴上 PVC 板,切割为每条 0.36cm,装入有干燥剂的铝箔袋中密封,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.1.6 检测方法和判定标准:选择血清/血浆加样量为 10  $\mu$ l,全血加样量为 20  $\mu$ l,加 100  $\mu$ l 样本稀释液,15 ~ 20min 为加样判读时间。若质控线和 IgG 检测线处均出现红色条带,表明样品 IgG 为阳性;若质控线和 IgM 检测线处均出现红色条带,表明样品 IgM 为阳性;若质控线、IgG 检测线和 IgM 检测线处出现 3 条红色条带,表明样品 IgM 和 IgG 均为阳性;若只有质控线处出现红色条带,表明样品为阴性;若质控线处不出现红色条带则说明该试纸条失效。

### 1.3.2 性能评估

1.3.2.1 分析灵敏度:取一个布鲁氏菌 IgG 最低检出限企业参考品原始血清(ELISA 检测结果 S/C 值为 3.85,复检误差小于 5%)和一个布鲁氏菌 IgM 最低检出限企业参考品原始血清(ELISA 检测结果 S/C 值为 3.33,复检误差小于 5%)。将两个血清分别用生理盐水梯度调整为:1:2, 1:4, 1:8, 1:16 和 1:32;以健康人的阴性血清作为对照,每个浓度样本用胶体金试剂盒检测三次。结果出现阳性信号的血清最高稀释度作为最低检出限。最低检出限可反映试剂盒的灵敏度。

1.3.2.2 特异度:收集 200 份健康人血清标本,经试管凝集试验检测布鲁氏菌抗体为阴性,用胶体金试剂盒进行复检。

1.3.2.3 干扰试验:通过干扰实验验证高胆红素、



溶血、高血脂对检测试剂盒的影响。准备3个浓度(S/C值分别为2.23, 3.25, 5.56; 编号P1, P2, P3)的布鲁氏菌IgG阳性标本一组, 3个浓度(S/C值分别为2.44, 3.33, 5.44; 编号N1, N2, N3)的布鲁氏菌IgM阳性标本一组, 每组设实验管和对照管各一个。①高胆红素干扰实验: 将各组血清分别用正常人血清、80  $\mu\text{mol/L}$  和 160  $\mu\text{mol/L}$  高总胆红素血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。②溶血干扰实验: 用正常人血清、10g/L 血红蛋白血清和20g/L 血红蛋白血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。③高血脂干扰实验: 用正常人血清、12mmol/L 高血脂血清和18mmol/L 高血脂血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。

1.3.3 初步临床应用: 用所制备的布鲁氏菌胶体金试纸条对采集自内蒙古牧区某医院的200份血清进行检测, 同时用试管凝集法做平行试验, 比较两者的符合率情况, 评价该方法的临床应用价值。

1.4 统计学分析 检测结果采用SPSS Statistics 22.0软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 检测方法的评价

2.1.1 胶体金溶液的鉴定: 肉眼观察胶体金溶液颜色鲜红、清亮, 无混浊及漂浮物, 由图谱可见其最大波峰出现在522nm处, 峰形狭窄(见图1)。说明制备的胶体金溶液颗粒大小分布均匀, 透光性和稳定性良好。

表1 胶体金最适标记重组抗原量的确定

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
HRS-Ag ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	5	10	15	20	25	30	35
实验结果	变蓝	变蓝	变蓝	变蓝	变色	不变	不变	不变

### 2.2 胶体金试纸条的性能评价结果

2.2.1 灵敏度结果: 本检测试剂检测不同稀释度的布鲁氏菌阳性血清最低检出限参考品血清, 当稀释度为1:8时检测线仍可显示清晰, 表明该检测试纸条具有良好的灵敏度。

2.2.2 特异度检测结果: 检测200份健康人血清标本, 其中195份样本结果为阴性, 本检测试剂特异度为97.5%。其中, 布鲁氏菌IgG抗体检测阳性例数为3份, 布鲁氏菌IgM抗体检测阳性例数为2份。

2.2.3 干扰试验结果: 见表2。实验结果发现高总胆红素、高血脂和溶血阳性血清与正常阴性血清差异较小, 并不干扰胶体金试剂卡对阴性样本检测的结果判定, 但干扰胶体金试剂卡对阳性样本检测的结果判定。血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度的增高均会使试纸条显色结果减弱。当血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度过高时, 会使试纸条出现假阴

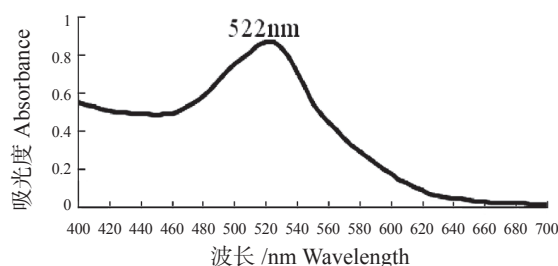


图1 胶体金溶液紫外-可见光谱图

2.1.2 最佳标记pH值的确定: 见图2。当pH值为7.5~9.0范围时其吸光度只有微小变化, 溶液保持红色, 无明显区别, 所以本试验最终确定胶体金标记抗体的最佳pH值为7.5。

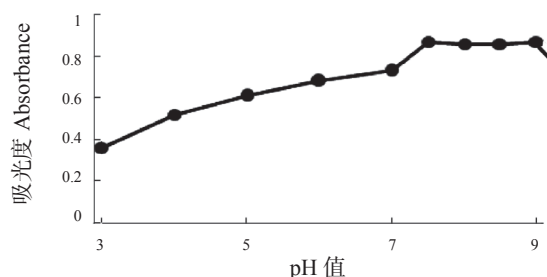


图2 标记重组抗原溶液的pH值测定曲线

2.1.3 重组布鲁氏菌抗原最佳标记量的确定: 见表1。从6号管后颜色基本趋于稳定, 溶液颜色没有明显变化。6号管所加标记用重组布鲁氏菌抗原标记量为25  $\mu\text{g/ml}$ 。在此基础上增加20%, 其抗原最适标记质量浓度为30  $\mu\text{g/ml}$ 。

性反应。

2.3 临床样品的检测 对采集自内蒙古牧区某医院的400份血清, 采用本方法制备的胶体金试纸条进行检测。结果检出IgG抗体阳性样本25份, 阳性率6.25%; IgM抗体阳性样本10份, 阳性率2.5%, IgG和IgM抗体均阳性样本5份。综上, 采用本方法制备的胶体金试纸条共检出阳性样本30份, 阳性率7.5%。试管凝集试验方法检出的阳性样本为32份, 阳性率8.0%, 二者的阳性符合率为93.75%。胶体金试纸条检出的阳性样本均来自试管凝集试验方法检出的阳性样本。

## 3 讨论

布鲁氏菌病是全球最常见的人畜共患病之一, 每年约有500 000例新病例, 对公众健康构成威胁。建立快速检测布鲁氏菌诊断方法具有非常重要的公共卫生学意义<sup>[8]</sup>。布鲁氏菌病的发病机制复杂, 潜

伏期最高可有5个月,其临床症状包括发烧、头痛、关节痛和背痛等,无法和伤寒、疟疾等疾病区分<sup>[9]</sup>。布鲁氏菌病诊断基于细菌培养和分子方法(直接测试),以及体外血清学和体内过敏性方法(间接测试)。

所有标准血清学测试均基于识别布鲁氏菌脂多糖(LPS)O抗原的抗体的检测<sup>[10]</sup>。应用胶体金免疫层析法检测人体内抗体,已广泛用于病毒、细菌及寄生虫病的免疫诊断<sup>[11-12]</sup>。

表2 干扰试验结果

组别		IgG 检测				IgM 检测			
		对照组 1	P1	P2	P3	对照组 1	N1	N2	N3
总胆红素组	10 μ mol/L	-	+	++	+++	-	+	++	+++
	80 μ mol/L	-	-	+	++	-	+	+	++
	160 μ mol/L	-	-	+	++	-	-	+	++
血红蛋白组	0g/L	-	+	++	+++	-	+	++	+++
	10g/L	-	-	+	++	-	-	+	++
	20g/L	-	-	+	++	-	-	+	++
血脂组	4mmol/L	-	+	++	+++	-	-	+	+++
	12mmol/L	-	+	+	++	-	-	+	++
	18mmol/L	-	-	+	++	-	-	+	++

刘亚东等<sup>[12-14]</sup>研制的胶体金法快速诊断布鲁氏菌病诊断试剂,与酶联免疫吸附测定检测和临床诊断检测结果的一致性较好。目前现有的胶体金方法检测布鲁氏菌病只能检测IgG抗体,不能同时检测IgM抗体。IgG抗体是血清中含量最多的免疫球蛋白,IgM抗体是在感染或免疫后最早产生的免疫球蛋白。有研究报道,对于布鲁氏菌感染患者后,首先血清IgM抗体升高;IgG抗体随后呈低水平上升,持续近一年后下降;治疗后IgG抗体水平降低,当病情再次加重时,IgG可迅速再次升高<sup>[6]</sup>。IgM抗体检测对布鲁氏菌病的早期诊断是有益的,IgM和IgG抗体联合测定,可以区分疾病的急性期和慢性期。

本研究制得的胶体金溶液为澄清透明的紫色液体,状态稳定良好。根据文献和前期研究,我们选择了最小标记蛋白量的1.2倍为标记蛋白量,这样能够有效避免假阴性和假阳性的现象<sup>[15]</sup>。

本研究通过优化胶体金标记条件、样品稀释液、金标垫和样品垫的制备条件,使产品的灵敏度达到上市产品水平,特异度高,性能良好。

我们用胶体金试剂盒方法和试管凝集试验这两种方法同时对临床样本进行检测,结果两者的阳性符合率为93.75%。本试剂盒方法的检出率与标准方法之间仍然存在差距,这可能是由于血清样品中的抗体滴度低所致。但是,以此方法创建的试剂盒没有假阳性现象出现。同时,也提示牧区布鲁氏菌感染较多,应及时进行治疗和预防。

本试验方法相较于ELISA法和试管凝集法相比,不需要添加多种试剂和酶,操作时间和反应时

间均大大减少。同时该方法的特异度和灵敏度也较好。因此,胶体金免疫层析法是布鲁氏菌病的理想且快速的检测方法。

#### 参考文献:

- [1] 陈丹,柳晓琳,刘孝刚,等.布鲁氏菌病流行趋势及其防治措施的研究进展[J].中国地方病防治杂志,2011,26(1):26-28.  
CHEN Dan, LIU Xiaolin, LIU Xiaogang, et al. Research progress on *Brucellosis* epidemic trend and its prevention measures[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2011, 26(1):26-28.
- [2] 崔步云,姜海.2005-2016年全国布鲁氏菌病监测数据分析[J].疾病监测,2018,33(3):188-192.  
CUI Buyun, JIANG Hai. Surveillance data of *Brucellosis* in China, 2005-2016[J]. Disease Surveillance, 2018, 33(3):188-192.
- [3] MCALLISTER T A. Laboratory diagnosis of human *Brucellosis*[J]. Scottish Medical Journal, 1976, 21(3):129-131.
- [4] OKTAY G, ÖZLEM B, NEVZAT I Y. Rapid immunofiltration assay based on colloidal gold-protein G conjugate as an alternative screening test for bovine and ovine *Brucellosis*[J]. Trop Anim Health Prod, 2012, 44(2):213-215.
- [5] 朱明东,洪林娣.胶体金免疫层析法快速诊断牛布鲁氏菌病的研究[J].中国人兽共患病学报,2008,24(8):755-756,759.  
ZHU Mingdong, HONG Lindi. A new method of rapid diagnosis of *Brucellosis* in cows by colloidal gold immunochromatographic assay[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(8):755-756,759.
- [6] 郭淑丽,李娟,苟荣.布鲁氏菌病患者血清免疫球蛋白的检测分析[J].中国热带医学,2016,16(3):288-289.

(下转第143页)

## VITEK-2 Compact 检测奇异变形杆菌、摩根摩根菌、铜绿假单胞菌的部分药敏结果准确性评价

武爱荣<sup>1</sup>, 杨乐<sup>2</sup> (1. 西安高新医院检验科, 西安 710075; 2. 西安市儿童医院神经内科, 西安 710003)

**摘要:**目的 探讨 VITEK-2 Compact 检测奇异变形杆菌、摩根摩根菌和铜绿假单胞菌的部分药敏结果的准确性。方法 收集 2017 年 3 月~2020 年 3 月临床分离的 58 株奇异变形杆菌、32 株摩根摩根菌和 280 株铜绿假单胞菌, 以纸片扩散法 (K-B 法) 为参考方法, 用 VITEK 2 Compact AST-GN16 药敏卡检测前两种菌对亚胺培南 (IPN) 的敏感度, 用 AST-GN09 药敏卡检测铜绿假单胞菌对亚胺培南、美罗培南 (MEM) 和氨曲南 (ATM) 的敏感度。结果 仪器法与 K-B 法比较, 经 58 株奇异变形杆菌药敏结果显示, 其标准符合率 (CA)、一般错误率 (MIE)、严重错误率 (ME) 和极严重错误率 (VME) 分别为 3.45%, 6.90%, 0% 和 89.66%, 两种方法之间的差异有统计学意义 ( $\chi^2=186.66, P<0.05$ ); 32 株摩根摩根菌药敏结果显示, 其 CA, MIE, ME 和 VME 分别为 12.5%, 6.25%, 81.25% 和 0%, 即两种方法之间的差异有统计学意义 ( $\chi^2=155.56, P<0.05$ ); 280 株铜绿假单胞菌药敏结果显示, 其 CA, MIE, ME 和 VME 分别为 88.93%, 10.71%, 0.36% 和 0%, 即 IPN 两种方法之间的差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.84, P<0.05$ )。MEM 和 ATM 的两种方法比较, 其 CA, MIE, ME 和 VME 分别为 95.00%, 5.00%, 0 和 0; 68.57%, 27.86%, 1.07% 和 2.5%, 即两种方法药敏结果的差异无统计学意义 ( $\chi^2=4.58, 0.78, P>0.05$ )。两种方法检测的分类一致性中, 只有 MEM 结果差异无统计学意义 ( $\chi^2=5.12, P>0.05$ ), 其它均有统计学意义 ( $\chi^2=11.72\sim186.68$ , 均  $P<0.05$ )。结论 用 VITEK-2 Compact AST-GN09 检测铜绿假单胞菌对 MEM 敏感度结果可靠, 无需验证, 而对 IPN 和 ATM 的敏感度结果不可靠, 需验证; VITEK-2 Compact AST-GN16 检测奇异变形杆菌和摩根摩根菌的 IPN 敏感度结果也存在不同程度的差异, 在工作中需采用 K-B 法进行补充修正, 以便更加准确的指导临床用药。

**关键词:** VITEK-2 Compact; K-B 法; 奇异变形杆菌; 摩根摩根菌; 铜绿假单胞菌

**中图分类号:** R378; R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-106-05

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.026

### Accuracy Evaluation of Partial Drug Sensitivity Results of Vitek-2 Compact Detection for *Proteus Singularis*, *Morgan Morgan* and *Pseudomonas Aeruginosa*

WU Ai-rong<sup>1</sup>, YANG Le<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China; 2. Department of Neurology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the accuracy of VITEK-2 Compact in the detection of partial drug sensitivity of *Proteus singularis*, *P. Morgan morgan* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** 58 strains of *Proteus singularis*, 32 strains of *P. Morgan morgan* and 280 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from March 2017 to March 2020. The paper diffusion method (K-B method) was used as the reference method, the sensitivity of the first two strains to IPN was detected by VITEK 2 Compact AST-GN16 drug sensitive card, the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to IPN, MEM and ATM was detected by AST-GN09 drug sensitive card. **Results** The instrument method was compared with K-B method, the results of drug sensitivity of 58 strains of *Proteus strangs* showed that the standard coincidence rate (CA), the general error rate (MIE), the serious error rate (ME) and the very serious error rate (VME) were 3.45%, 26.89%, 0% and 89.66%, respectively, and there were significant differences between the two methods ( $\chi^2=186.66, P<0.05$ ). The drug sensitivity of 32 strains of *P. Morgan morgan* showed that CA, MIE, ME and VME were 12.5%, 6.25%, 81.25% and 0, respectively, and the difference between the two methods was statistically significant ( $\chi^2=155.56, P<0.05$ ). The drug sensitivity of 280 *Pseudomonas aeruginosa* strains showed that CA, MIE, ME and VME were 88.93%, 10.71%, 0.36% and 0 respectively, and the difference between IPN was statistically significant ( $\chi^2=9.84, P<0.05$ ). Comparison of ATM and MEN, the values of CA, MIE, ME and VME were 95.00%, 5.00%, 0 and 0 respectively, and 68.57%, 27.86%, 1.07%, 2.50%, and there was no difference in drug sensitivity between ATM and MEM methods ( $\chi^2=0.78$  and 4.58,  $P>0.05$ ). The two methods were detected in the classification consistency, Only MEM results were not statistically significant ( $\chi^2=5.12, P>0.05$ ), and the others were statistically significant ( $\chi^2=11.72\sim186.68$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The results of the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to MEM detected by Vitek-2 Compact AST-GN09 are reliable without verification and the sensitivity results to IPN and ATM are not reliable and

作者简介: 武爱荣 (1976-), 女, 学士学位, 副主任检验师, 主要从事病原微生物感染诊断, E-mail: wu\_aorong@126.com。

通讯作者: 杨乐 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 神经内科。



need to be verified. The IPN sensitivity results of VITEK-2 Compact AST-GN16 in detection of *Proteus singularis* and *P. Morgan morgan* also varied to different degrees, so K-B method should be used for supplement and modification in the work to guide clinical medication more accurately.

**Keywords:** VITEK-2 compact; K-B method; *Proteus singularis*; *P. Morgan morgan*; *Pseudomonas aeruginosa*

临床微生物学实验室的主要功能之一是对有意义的细菌分离株进行抗微生物药物敏感性检测,而在抗微生物耐药性增加的时代,敏感性试验结果的准确性对临床精准化治疗显得尤为重要。目前临床微生物实验室用于测定细菌对抗生素体外敏感性的方法主要有稀释法、纸片扩散法(K-B法)和自动化仪器法等<sup>[1-2]</sup>,随着自动化仪器普及,在临床应用较为广泛的VITEK-2 Compact全自动微生物分析系统,其药敏试验是采用连续动态检测原理,监测待测菌在抗生素设定的不同浓度与生长对照孔中的生长及差异,来计算最低抑菌浓度(MIC),虽然缩短了检测时间,但同时增加了部分药敏结果不准确的风险<sup>[3]</sup>。多项研究<sup>[3-5]</sup>表明,K-B法可以用来验证自动化仪器法检测药敏的局限性。本次研究是根据VITEK-2 Compact配套的革兰氏阴性菌药敏卡AST-GN16和AST-GN09说明书提示的方法局限性,以K-B法为参考方法,验证该仪器检测奇异变形杆菌、摩根摩根菌和铜绿假单胞菌的部分药敏结果的准确性。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集2017年3月~2020年3月西安高新医院临床分离的58株奇异变形杆菌、32株摩根摩根菌和280株铜绿假单胞菌,剔除同一患者相同部位的重复菌株,所有菌株均经VITEK-2 Compact全自动微生物细菌鉴定仪鉴定。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853购自卫生部临床检验中心。

### 1.2 仪器和试剂

**1.2.1 仪器:** VITEK2 Compact全自动微生物细菌鉴定仪,微生物浊度比浊仪由法国梅里埃公司生产。

**1.2.2 试剂:** 亚胺培南(10 μg/片)、美罗培南(10 μg/片)和氨曲南(30 μg/片)三种药敏纸片,均由英国OXOID公司生产。GN鉴定卡、GN16药敏卡、GN09药敏卡、水解酪蛋白琼脂(MH)、哥伦比亚血琼脂培养基和麦康凯琼脂培养基均由法国梅里埃公司生产,试验期间均在有效期内。

### 1.3 方法

**1.3.1 体外药敏试验及结果判读:** K-B法,质量控制和结果判读:敏感(S)、中介(I)、耐药(R)均参照美国CLSI M100S(2017版)进行操作<sup>[6]</sup>; VITEK2 Compact鉴定及配套AST-GN16药敏卡,GN09药敏卡测定和质量控制,严格按照仪器操作规程进行。

**1.3.2 药敏数据分析标准:** 参照美国CLSI M23-A2文件<sup>[7]</sup>,标准一致性(categorical agreement, CA)指实验方法与参考方法的符合率;一般错误率(minor errors, MIE)指参考方法的结果为R或S,实验方法为I,或者参考方法的结果是I,实验方法为S或R;严重错误率(major errors, ME)指参考方法的结果为S,实验方法为R;极严重错误率(very major errors, VME)指参考方法的结果是R,实验方法为S;它们可接受的误差范围分别为CA ≥ 90%, MIE ≤ 10%, ME ≤ 3%, VME ≤ 1.5%。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS19.0统计学软件进行数据分析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 菌株来源及分布** 2017年3月~2020年3月临床分离的280株铜绿假单胞菌、58株奇异变形杆菌和32株摩根摩根菌均分离自住院患者标本。铜绿假单胞菌和奇异变形杆菌的标本来源主要是痰、尿和分泌物,分别占各自总检出菌的69.64%(195株),12.14%(34株)和8.57%(24株);18.97%(11株),41.38%(24株)和31.03%(18株)。摩根摩根菌主要来自尿56.25%(18株)和分泌物31.25%(10株)。铜绿假单胞菌来自18个科室,以神经内科、呼吸科和重症医学科居多,分别占31.1%,19.6%和13.6%;奇异变形杆菌来自16个科室,以泌尿外科、神经内科和肛肠科居多,分别占15.5%,15.5%和12.1%。摩根摩根菌来自12个科室,以重症医学科,泌尿外科和骨科居多,分别占21.9%,18.6%和15.6%。

**2.2 三种菌两种药敏试验结果比较** 见表1。对收集的三种细菌,应用K-B法和VITEK仪器法对亚胺培南(IPN),美罗培南(MEM)和氨曲南(ATM)进行药敏试验,58株奇异变形杆菌对IPN的药敏结果,32株摩根摩根菌对IPN的药敏结果和280株铜绿假单胞菌对IPN和ATM的药敏结果,两种方法之间的差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而280株铜绿假单胞菌对MEM药敏结果,两种方法之间的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

**2.3 两种药敏方法比较** 见表2。以K-B法为参考方法,VITEK仪器法的CA, MIE, ME和VME结果分析,三种细菌所检测抗生素的CA,除MEM大于90%,其它均小于90%,MIE均大于3%,ME除摩根摩根菌为81.25%,其它均小于3%,VME除

奇异变形杆菌为 89.66%, 铜绿假单胞菌的 ATM 为 2.5%, 其它均为 0。

表 1 三种细菌用两种药敏试验方法的结果比较 [n(%)]

细菌种类	抗生素	K-B 法			VITEK 仪器法			$\chi^2$	P
		S	I	R	S	I	R		
铜绿假单胞菌	ATM	140 (50.00)	68 (24.29)	72 (25.71)	152 (54.29)	54 (19.29)	74 (26.43)	0.78	<0.05
	IPN	143 (51.07)	1 (0.36)	136 (48.57)	114 (40.71)	32 (11.43)	134 (47.86)	9.84	<0.05
	MEM	143 (51.07)	1 (0.36)	136 (48.57)	141 (50.36)	15 (5.36)	124 (44.29)	4.58	>0.05
奇异变形杆菌	IPN	58 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (3.45)	4 (6.90)	52 (89.66)	186.66	<0.05
摩根摩根菌	IPN	26 (81.25)	2 (6.25)	4 (12.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	32 (100.00)	155.56	<0.05

表 2 K-B 法与 VITEK 仪器法结果比较 [n(%)]

细菌种类	抗生素	CA	MIE	ME	VME	$\chi^2$	P
铜绿假单胞菌	ATM	192 (68.57)	78 (27.86)	3 (1.07)	7 (2.50)	37.34	<0.05
	IPN	249 (88.93)	30 (10.71)	1 (0.36)	0 (0.00)	11.72	<0.05
	MEM	266 (95.00)	14 (5.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	5.12	>0.05
奇异变形杆菌	IPN	2 (3.45)	4 (6.90)	0 (0.00)	52 (89.66)	186.68	<0.05
摩根摩根菌	IPN	4 (12.50)	2 (6.25)	26 (81.25)	0 (0.00)	155.56	<0.05

### 3 讨论

随着碳青霉烯类药物在临床频繁广泛地应用, 耐碳青霉烯类的革兰氏阴性菌有逐年上升趋势, 给临床抗感染治疗带来巨大挑战, 而准确检测革兰氏阴性菌药敏结果, 尤其是碳青霉烯类药敏结果, 对控制多重耐药菌, 治疗重症感染和预防院内感染有着重要的临床意义。本次研究主要是针对 VITEK2 Compact 配套药敏卡, 在检测三种阴性菌对碳青霉烯类药物敏感性时的局限性进行分析, 并说明采取验证方法的必要性。

奇异变形杆菌是泌尿系统感染最常见的病原菌之一, 仅次于大肠埃希氏菌。本次研究的 58 株奇异变形杆菌, 主要来自泌尿外科的尿标本和肛肠科的脓分泌物, 与既往研究发现该菌主要来自创口分泌物、尿液、阴道分泌物等基本相符<sup>[8-9]</sup>。在 AST-GN16 药敏卡说明书中指出, 检测变形菌属对亚胺培南的敏感度时要用其他方法进行验证, 仪器法对 58 株奇异变形杆菌亚胺培南药敏检测结果与 K-B 法比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 而仪器法的 CA 值只有 3.45%, 其耐药率高达 89.66%, 远高于文献 [10] 报道的 35.9%, 这可能与本次纳入的标本数量少有关。用 K-B 法对 52 株亚胺培南耐药株复核, 全部为敏感, 同时对纳入研究的菌株做美罗培南药敏检测, 结果均敏感, 说明两种碳青霉烯类药物敏感度一致。在 CLSI 文件指出, 变形杆菌可通过非产碳青霉烯酶机制导致对亚胺培南 MIC 趋向升高, 这也是仪器法局限性的主要原因。

摩根摩根菌是泌尿道和伤口感染的主要病原菌之一, 也可引起医源性感染。本次研究的 32 株摩根摩根菌主要来自尿和分泌物, 与变形杆菌来源

基本一致。在 AST-GN16 药敏卡说明书中指出, 检测摩根摩根菌对亚胺培南的敏感度时要用其他方法进行验证, 仪器法检测该菌对亚胺培南的耐药率达 100%, 用 K-B 法检测其对亚胺培南的耐药率仅为 12.5%, 与李金等<sup>[10]</sup>报告的耐药率 15.9% 相似, 但高于刘芳等<sup>[11]</sup>报告的耐药率 3.8%, 而用 K-B 法检测其对美罗培南药敏结果均敏感。相关文献<sup>[10-11]</sup>均指出, 对于亚胺培南耐药率高于美罗培南进一步提示, K-B 法检测亚胺培南耐药性更准确。该菌对亚胺培南的主要耐药机制与膜通透性降低有关, 在 CLSI 文件也指出, 摩根摩根菌可通过非产碳青霉烯酶机制导致对亚胺培南 MIC 趋向升高, 使得通过仪器法检测亚胺培南的耐药率偏高, 所以要用 K-B 法进行验证。

铜绿假单胞菌是临床最常见的非发酵革兰氏阴性杆菌, 具有易定植和多耐药的特点, 是下呼吸道感染的主要病原菌, 是引起呼吸机相关性肺炎的前三位革兰氏阴性菌之一<sup>[12]</sup>, 而本次研究 280 株铜绿假单胞菌的标本来源主要也是痰。所使用的 AST-GN09 药敏卡说明书中指出, 检测假单胞菌对 ATM 的敏感度时要用其他方法进行验证, 以及该菌易产生耐药的特点, 因此, 本次研究对 ATM, IPN 和 MEM 分别进行了验证。以 K-B 法为参考方法, IPN 和 ATM 两种方法之间的差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 两种抗生素的标准符合率分别为 88.93% 和 68.57%, 与罗疏薇等<sup>[13]</sup>报告的 70.37% 和 88.89% 相似, 均小于 90%。虽然 ATM 作为铜绿假单胞菌治疗可选药物在临床很少使用, 但该药仍然是慢性阻塞性肺疾病急性加重患者, 在铜绿假单胞菌感染治疗时的推荐药物之一<sup>[14]</sup>, 所以, 验证

其药敏结果准确性是非常有必要的。MEM两种方法之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),标准符合率为95%,略高于李瑜珍等<sup>[15]</sup>报告的90%。本次研究发现,对碳青霉烯类敏感菌株,用AST-GN09药敏卡检测亚胺培南敏感性时,仪器法的MIE高达10.71%,结果会将敏感判读为中介,这可能与CLSI折点修订有关<sup>[16]</sup>,所以当实验室在使用CLSI修改后折点去判读结果时,如果出现分类不一致时,应该用K-B法进行验证。

综上所述,在用VITEK-2 Compact AST-GN16药敏卡检测奇异变形杆菌、摩根摩根菌的亚胺培南敏感性,和用AST-GN09药敏卡检测铜绿假单胞菌的亚胺培南和氨曲南敏感性结果时,均要用K-B法进行验证,必要时可选用E-test法或稀释法进行修正,给临床提供一个可靠的准确结果。

#### 参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M02-A11: Performance for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard eleventh edition CLSI document [S]. Wayne: PA, CLSI M02-A11, 2012:12-13.
- [2] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard ninth edition CLSI document [S]. 19th Edition. Wayne: PA, CLSI M07-A9, 2012: 16-19.
- [3] 刘云, 万玉香, 马炜, 等. VITEK 2 Compact 检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星药敏结果的准确性评价[J]. 现代检验医学杂志, 2018,33(1):133-136.  
LIU Yun, WAN Yuxiang, MA Wei, et al. Evaluation on the accuracy of VITEK 2 compact for the susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to amikacin[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33(1):133-136.
- [4] 王颖, 陈芳芳, 黄梅, 等. VITEK 2 Compact 专家系统对肠杆菌科碳青霉烯酶耐药表型分析的问题探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4):101-103,106.  
WANG Ying, CHEN Fangfang, HUANG Mei, et al. Discussion on the problems of Vitek 2 compact advanced expert system to identify carbapenemase phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017,32(4):101-103,106.
- [5] 武爱荣, 安良, 黄波, 等. VITEK-2 Compact AST-GN16 检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星和哌拉西林-他唑巴坦药敏结果的准确性评价[J]. 现代检验医学杂志, 2018,33(6):136-139.  
WU Airong, AN Liang, HUANG Bo, et al. Evaluation of the accuracy of *Acinetobacter baumannii*'s susceptibility to amikacin and piperacillin-tazobactam in the detection of Vitek-2 compact AST-GN16[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33(6):136-139.
- [6] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M100: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 27th Edition. Wayne: PA, CLSI M07, 2017.
- [7] Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M23: Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents: Approved Guideline[S]. Wayne: PA, CLSI M23, 2008.
- [8] 马巧红, 陈群英, 何娟妃. 132株奇异变形杆菌的临床分布及药敏分析[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4):348-349, 351.  
MA Qiaohong, CHEN Qunying, HE Juanfei. Clinical distribution and drug sensitivity analysis of 132 strains of *Proteus mirabilis*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(4):348-349, 351.
- [9] 陆玉婷, 王胜奎, 乔昀. 2015~2017年奇异变形杆菌耐药情况分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(1):143-146.  
LU Yuting, WANG Shengkui, QIAO Yun. Analysis of the drug resistance of *Proteus mirabilis* from 2015 to 2017[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2019,26(1):143-146.
- [10] 李金, 胡志东, 汪复, 等. 2005-2014年CHINET变形杆菌属、沙雷菌属、枸橼酸杆菌属、摩根菌属及普罗威登菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3):284-293.  
LI Jin, HU Zhidong, WANG Fu, et al. Changing resistance profile of *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella* and *Providencia* isolates in hospitals across China: data from CHINET antimicrobial resistance surveillance program 2005-2014[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2016,16(3):284-293.
- [11] 刘芳, 金炎, 刘芸, 等. 摩根摩根菌的临床分布及耐药性分析[J]. 广西医学, 2017, 39(5):590-591, 609.  
LIU Fang, JIN Yan, LIU Yun, et al. Clinical distribution and drug resistance of *Morganella morganii*[J]. Guangxi Medical Journal, 2017,39(5):590-591,609.
- [12] 袁巧, 白静静, 袁喆, 等. 2013-2015年重症监护病房的呼吸机相关性肺炎病原学构成及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017,32(3):45-48.  
YUAN Qiao, BAI Jingjing, YUAN Zhe, et al. Analysis of distribution and drug resistance of isolated pathogens for ventilator-associated-pneumonia in ICU from 2013 to 2015[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017,32(3):45-48.
- [13] 罗疏薇, 夏云, 何秀丽, 等. VITEK2全自动微生物分析系统药敏检测结果准确性探讨[J]. 重庆医学, 2009,38(19):2413-2415.  
LUO Shuwei, XIA Yun, HE Xiuli, et al. Accuracy evaluation of automatic microorganism analysis system Vitek-2 for antimicrobial susceptibility test[J]. Chongqing Medicine, 2009,38(19):2413-2415.
- [14] 慢性阻塞性肺疾病急性加重抗感染治疗中国专家共识编写组. 慢性阻塞性肺疾病急性加重抗感染治疗中国专家共识[J]. 国际呼吸杂志, 2019,39(17):1281-1296.  
Writing Group of Expert Consensus on Anti-infective



- therapy for Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Expert consensus on anti-infective therapy for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in China[J]. International Journal of Respiration, 2019,39(17):1281-1296.
- [15] 李瑜珍, 曾学辉, 莫莉, 等. VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪对黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌药敏检测评价[J]. 现代检验医学杂志, 2016,31(4):121-124.
- LI Yuzhen, ZENG Xuehui, MO Li, et al. Evaluation of drug susceptibility test to mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* and non-mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* with VITEK2 compact automatic microbiology analyzer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016,31(4):121-124.
- [16] 何鸿绯. VITEK2-Compact 及 VITEK AST-GN09 药敏卡对部分革兰阴性杆菌亚胺培南药敏的准确性分析[J]. 实用医技杂志, 2019, 26(10):1258-1260.
- HE Hongfei. The accuracy of VITEK2-Compact and VITEK AST-GN09 drug sensitive card for imipenem of gram-negative bacilli was analyzed[J]. Journal of Practical Medical Technology, 2019,26(10):1258-1260.
- 收稿日期: 2020-06-22 修回日期: 2020-07-27
- 
- (上接第 97 页)
- ZHANG Zhaoting, FU Bing, GE Zhonglin, et al. The correlation between non-motor symptoms and SNCA gene polymorphism in Parkinson's disease patients in Lianyungang Area[J]. Neural Injury and Functional Reconstruction, 2019,14(10):529-530.
- [7] LI Jun, JIN Miao, WANG Li, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease in China[J]. Journal of Neurology, 2017, 264(3): 476-481.
- [8] 王黎萍, 李星云, 桂小红, 等. 嗅觉评估联合经颅黑质超声检查早期诊断帕金森病的临床价值分析[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(10): 1028-1032.
- WANG Liping, LI Xingyun, GUI Xiaohong, et al. Olfactory assessment and substantia nigra ultrasonography in early diagnosis of Parkinson's disease[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2018, 17(10): 1028-1032.
- [9] KATAOKA H, TANAKA N, SAEKI K, et al. Low frontal assessment battery score as a risk factor for falling in patients with Hoehn-Yahr Stage III Parkinson's disease: a 2-year prospective study[J]. European Neurology, 2014, 71(3/4): 187-192.
- [10] SHAH N V, BEYER G A, SOLOW M, et al. Spinal fusion in Parkinson's disease patients: a propensity Score-Matched analysis with minimum 2-year surveillance[J]. Spine, 2019, 44(14): E846-E851.
- [11] 罗懿, 万赢, 干静, 等. Sniffin' Sticks 方法评价帕金森病患者的嗅觉功能[J]. 中华神经科杂志, 2014, 47(6): 370-374.
- LUO Yi, WAN Ying, GAN Jing, et al. Sniffin' Sticks test in evaluating olfactory function in Parkinson's disease[J]. Chin J Neurol, 2014, 47(6): 370-374.
- [12] 周立, 张大伟, 王志勇. 多巴胺受体在大鼠嗅球的表达及其在帕金森病大鼠嗅觉障碍中的作用[J]. 解剖学报, 2019, 50(4): 411-417.
- ZHOU Li, ZHANG Dawei, WANG Zhiyong, et al. Expression of dopamine receptors in rat olfactory bulb and its role in hyposmia of Parkinson's disease rat model[J]. Acta Anatomica Sinica, 2019, 50(4): 411-417.
- [13] DAVIES K M, MERCER J F, CHEN N, et al. Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics[J]. Clinical Science (London, England: 1979), 2016, 130(8): 565-574.
- [14] 张思怡, 于裴夫, 朱文清, 等. 跨膜蛋白 175、三甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶和  $\alpha$ -突触核蛋白基因的三个单核苷酸多态性与中国北方汉族帕金森病遗传易患性的相关性分析[J]. 中华神经科杂志, 2018,51(7):520-525.
- ZHANG Siyi, YU Peifu, ZHU Wenqing, et al. A relevant research of connections between the genetic susceptibility of Parkinson's disease and three single nucleotide polymorphisms in transmembrane protein 175, methylcrotonoyl-coenzyme A carboxylase 1 and alpha-synuclein in northern Chinese Han population[J]. Chinese Journal of Neurology, 2018,51(7):520-525.
- [15] CAO Yulan, YANG Yaping, MAO Chengjie, et al. A role of BAG3 in regulating SNCA/ $\alpha$ -synuclein clearance via selective macroautophagy[J]. Neurobiology of Aging, 2017, 60(1): 104-115.
- [16] HEMAN-ACKAH S M, MANZANO R, HOOZEMANS J, et al. Alpha-synuclein induces the unfolded protein response in Parkinson's disease SNCA triplication iP-SC-derived neurons[J]. Human Molecular Genetics, 2017, 26(22): 4441-4450.
- [17] DAVIS A A, ANDRUSKA K M, BENITEZ B, et al. Variants in GBA, SNCA, and MAPT influence Parkinson disease risk, age at onset, and progression[J]. Neurobiology of Aging, 2016, 37(30): 209.
- [18] 郭丽丽, 王咏, 王莹, 等. SNCA 和 GBA 在帕金森病中相互作用研究进展[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(1): 97-101.
- GUO Lili, WANG Yong, WANG Ying, et al. Advance in the interaction between SNCA and GBA in Parkinson's disease[J]. Basic & Clinical Medicine, 2019, 39(1): 97-101.
- [19] 张佳, 康文岩, 刘军. 帕金森病患者唾液  $\alpha$ -突触核蛋白与纹状体多巴胺摄取功能的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2017, 34(1): 45-48.
- ZHANG Jia, KANG Wenyan, LIU Jun. The association of salivary  $\alpha$ -synuclein concentration and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease[J]. Journal of Clinical Internal Medicine, 2017, 34(1): 45-48.
- [20] 苏鹭芬, 陈燕美, 蔡优生, 等. 唾液  $\alpha$ -突触核蛋白和 DJ-1 蛋白水平对帕金森病的诊断价值[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2018, 44(1): 1-5.
- SU Lufen, CHEN Yanmei, CAI Yousheng, et al. Salivary  $\alpha$ -synuclein and DJ-1 for the value of the diagnosis of Parkinson disease[J]. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2018, 44(1): 1-5.
- 收稿日期: 2020-06-11 修回日期: 2020-06-29

# 多囊卵巢综合征患者血清肌联素水平表达与多种生化代谢指标的相关性分析

李晓丽<sup>1</sup>, 赵莉<sup>2</sup>, 曹阳阳<sup>2</sup>, 马文鹏<sup>1</sup>

(1. 宝鸡市妇幼保健院妇科, 陕西宝鸡 721000; 2. 西安高新医院妇科, 西安 710075)

**摘要:** **目的** 探究多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 患者血清肌联素 (myonectin) 水平表达与多种生化代谢指标的相关性分析。**方法** 选取2018年5月~2019年11月宝鸡市妇幼保健院收治的55例PCOS患者为观察组, 另选取58例同期体检健康女性为对照组。收集两组的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、超敏C反应蛋白 (hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、游离睾酮 (free testosterone, FT)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 等生化代谢指标。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测受试者血清中 Myonectin 的水平。**结果** 两组的 hs-CRP、FT 和 Myonectin 水平差异均具有统计学意义 ( $t=0.43, 11.6, 13.6$ , 均  $P < 0.001$ ), 且观察组的 hs-CRP 和 FT 水平高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 观察组的 Myonectin 为  $10.40 \pm 4.18$  ng/ml, 显著高于对照组的  $6.45 \pm 2.07$  ng/ml。Myonectin 高、低表达组的 TC, LDL-C, HDL-C, hs-CRP, FSH, LH 和 FT 水平差异均无统计学意义 ( $t=1.714, 0.504, 0.108, 0.667, 0.374, 0.674, 0.527$ , 均  $P > 0.05$ ), Myonectin 高、低表达组的 FBG 和 TG 水平差异具有统计学意义 ( $t=14.384, 15.195$ , 均  $P < 0.05$ )。Spearman 相关性分析, 血清 Myonectin 水平与 FBG, TG 呈正相关关系 ( $r_s$  值分别为 0.074 和 0.681,  $P < 0.05$ )。**结论** Myonectin 是 PCOS 的潜在生物学标记物, 其与 FBG, TG 呈正相关关系。

**关键词:** 多囊卵巢综合征; 肌联素; 生化代谢指标

中图分类号: R711.75; R446.112 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-111-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.027

## Correlation Analysis between Expression of Serum Myonectin and Various Biochemical and Metabolic Indexes in Patients with Polycystic Ovary Syndrome

LI Xiao-li<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>, CAO Yang-yang, MA Wen-peng<sup>1</sup>

(1. Department of Gynaecology, Baoji Maternal and Child Health Care Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China;

2. Gynaecology Department, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the correlation between the expression of serum Myonectin and various biochemical indicators for polycystic ovary syndrome (PCOS) patients. **Methods** From May 2018 to November 2019, 55 PCOS patients admitted to the department of Baoji Maternal and Child Health Care Hospital were selected as the observation group, and 58 healthy women in the same period were selected as the control group. Collection of two sets of fasting plasma glucose (FBG), total cholesterol (TC), three acyl glycerin (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), Hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) free testosterone (FT), folliclestimulating hormone (FSH), luteinzing hormone (LH) and other biochemical metabolic indicators. Serum Myonectin levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The hs-CRP, FT and Myonectin levels of the two groups were statistically significant ( $t=0.43, 11.6, 13.6$ , all  $P < 0.001$ ), and the hs-CRP and FT levels of the observation group were higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ), and the Myonectin level of the observation group was  $10.40 \pm 4.18$  ng/ml, which was significantly higher than that of the control group ( $6.45 \pm 2.07$  ng/ml). The levels of TC, LDL-C, HDL-C, hs-CRP, FSH, LH and FT in the Myonectin high and low expression groups were not statistically significant ( $t=1.714, 0.504, 0.108, 0.667, 0.374, 0.674, 0.527$ , all  $P > 0.05$ ), while the levels of FBG and TG in the Myonectin high and low expression groups were statistically significant ( $t=14.384, 15.195$ , all  $P < 0.05$ ). Spearman correlation analysis showed that serum Myonectin level was positively correlated with FBG and TG (RS values were 0.074 and 0.681, respectively,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Myonectin is a potential biological marker of PCOS,

作者简介: 李晓丽 (1978-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 宫腔镜检查及治疗, E-mail: baolixiaol@163.com。

通讯作者: 马文鹏 (1982-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤及妇科疾病诊断与治疗, E-mail: 514294840@qq.com。

which is positively correlated with FBG and TG.

**Keywords:** polycystic ovary syndrome; myonectin; biochemical and metabolic index

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是指患者具有雄激素过多、卵巢功能障碍和多囊卵巢形态的一种疾病, 其发病率逐年升高<sup>[1-2]</sup>。临床上, PCOS 主要以高胰岛素血症、月经不调、多毛症、不孕不育、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 分泌过剩等为特征, 严重影响女性的身体健康和生活质量。目前, PCOS 的病因尚未完全阐明, 血液中潜在的生物标志物在探究 PCOS 的病因学方面发挥重要作用。PCOS 患者与多种代谢异常相关, 包括胰岛素抵抗、2 型糖尿病、肥胖和血脂异常。肌联素 (Myonectin) 又名 C1q TNF- $\alpha$  相关蛋白异构体 15 (C1QTNF15)<sup>[3]</sup>, 其是由肌肉组织表达和分泌的新型肌肉因子, 近年来有报道指出 Myonectin 的表达受到代谢状态控制<sup>[4]</sup>, Myonectin 是一种营养调节性细胞因子, 在胰岛素抵抗中发挥潜在作用<sup>[1,5]</sup>。本研究拟分析 PCOS 患者血清 Myonectin 的水平表达与多种生化代谢指标的相关性。具体报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2018 年 5 月~2019 年 11 月宝鸡市妇幼保健院收治的 55 例 PCOS 患者为观察组, 平均年龄为  $21.41 \pm 4.96$  岁, 身体质量指数 (body mass index, BMI) 为  $22.8 \pm 3.3 \text{ kg/m}^2$ 。另选取 58 例同期体检健康女性为对照组, 平均年龄为  $20.61 \pm 5.15$  岁, BMI 为  $21.9 \pm 3.7 \text{ kg/m}^2$ 。收集两组研究对象的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、超敏 C 反应蛋白 (hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、游离睾酮 (free testosterone, FT)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 等生化代谢指标。本研究经由我院伦理委员会审批通过。

纳入标准<sup>[6]</sup>: ①观察组参照多囊卵巢综合征的诊断标准, 另外需满足以下两项标准中的任意一项即可诊断为 PCOS: 超声检查结果显示存在多囊卵巢 (9 个及以上 10 mm 以下的窦卵泡); 血清中睾酮 (testosterone, TTE) 水平高于 2.5 nmol 或存在多毛的临床体征; ②自愿参加且签署知情同意书者。

排除标准: ①卵巢肿瘤疾病和放化疗史者; ②并发先天性肾上腺增生、库欣综合征、甲状腺功能异常和高泌乳素血症等疾病者; ③2 个月内有激素

类和降脂类药物服用史者; ④恶性肿瘤和自身免疫性疾病者。

1.2 仪器与试剂 应用贝克曼公司 AU-5800 全自动生化仪检测受试者的 FBG, TC, TG, HDL-C, LDL-C, hs-CRP, FT, FSH 和 LH。采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中 Myonectin 水平, 试剂盒购自上海基尔顿生物有限公司。

1.3 方法 抽取受试者清晨空腹静脉血 5 ml, 3 000 r/min 离心 15 min 后取血清, 保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中待测。采用全自动生化仪检测 FBG, TC, TG, HDL-C, LDL-C, hs-CRP, FT, FSH 和 LH。采用 ELISA 检测血清中 Myonectin 的水平。试验内变异系数 (CV) 为 6%, 试验间变异系数为 8%。

1.4 统计学分析 运用 SPSS20.0 统计学软件分析数据, 计量资料行 *t* 检验, 以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。相关性分析采用 Spearman 相关性检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组各生化代谢指标的比较 见表 1。两组的 FBG, TC, LDL-C, HDL-C, TG, hs-CRP 和 FSH 等生化代谢指标差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 具有可比性。两组的 hs-CRP, FT 和 Myonectin 水平差异具有统计学意义, 且观察组的 hs-CRP, FT 和 Myonectin 水平高于对照组 (均  $P < 0.05$ )。

表 1 两组各生化代谢指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	观察组 (n=55)	对照组 (n=58)	<i>t</i>	<i>P</i>
FBG (mg/dl)	$82.42 \pm 9.42$	$85.21 \pm 8.63$	0.43	0.90
TC (mg/dl)	$212.21 \pm 35.98$	$217.46 \pm 27.53$	0.50	0.05
LDL-C (mg/dl)	$139.33 \pm 32.25$	$144.19 \pm 28.94$	0.10	0.39
HDL-C (mg/dl)	$42.80 \pm 10.92$	$43.54 \pm 11.49$	0.32	0.63
TG (mg/dl)	$161.61 \pm 33.92$	$158.63 \pm 30.88$	0.70	0.40
hs-CRP (mg/L)	$2.30 \pm 0.70$	$1.70 \pm 0.50$	15.9	<0.001
FSH (mIU/mL)	$8.13 \pm 1.97$	$7.87 \pm 1.90$	1.71	0.17
LH (mIU/mL)	$9.20 \pm 5.00$	$8.60 \pm 2.50$	0.90	0.41
FT (nmol/L)	$3.20 \pm 0.90$	$1.50 \pm 0.40$	11.6	<0.001
Myonectin (ng/ml)	$10.40 \pm 4.18$	$6.45 \pm 2.07$	13.6	<0.001

2.2 Myonectin 高、低表达组中多项生化代谢指标比较 见表 2。根据血清 Myonectin 水平的不同将受试者分为两组, 低表达组 (Myonectin  $\leq 6.7 \text{ ng/ml}$ ) 和高表达组 (Myonectin  $> 6.7 \text{ ng/ml}$ ), Myonectin



高、低表达组的 TC, LDL-C, HDL-C, hs-CRP, FSH, LH 和 FT 水平差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), Myonectin 高、低表达组的 FBG 和 TG 水平差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表2 Myonectin 高、低表达组中多项生化代谢指标比较

指标 (单位)	Myonectin 低表达组 (n=53)	Myonectin 高表达组 (n=60)	t	P
FBG (mg/dl)	82.42 ± 9.42	104.42 ± 12.42	14.384	0.000
TC (mg/dl)	212.21 ± 35.98	252.11 ± 37.98	1.714	0.190
LDL-C (mg/dl)	138.33 ± 31.25	139.13 ± 30.25	0.504	0.447
HDL-C (mg/dl)	41.68 ± 10.92	42.80 ± 10.42	0.108	0.811
TG (mg/dl)	161.72 ± 33.92	198.04 ± 32.62	15.195	0.000
hs-CRP (mg/l)	2.28 ± 0.70	2.30 ± 0.64	0.667	0.508
FSH (mIU/ml)	8.11 ± 1.97	7.99 ± 2.10	0.374	0.257
LH (mIU/ml)	9.17 ± 5.00	8.93 ± 5.14	0.674	0.759
FT (nmol/l)	3.11 ± 0.90	3.01 ± 1.17	0.527	0.387

2.3 血清 Myonectin 水平的 Spearman 相关性分析 结合 Myonectin 高、低表达组的结果, 采用 Spearman 相关性分析, 血清 Myonectin 水平与 FBG, TG 呈正相关关系 ( $r_s$  值分别为 0.074 和 0.681,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

PCOS 是具有雄激素过多, 卵巢功能障碍及多囊卵巢形态的一种异质性疾病, 其发病原因较复杂, 同时不同表型间相互影响加重 PCOS 疾病的发展。目前, PCOS 的发病机制尚未阐明, 这给 PCOS 的临床诊疗带来巨大的挑战。临床上 PCOS 患者常表现为高雄激素血症、排卵障碍、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、血脂异常、心血管患病风险增加和全身的低度慢性炎症等, 严重影响患者的正常工作和生活。肌肉组织是 IR 的重要靶组织, Myonectin 是一种新型肌肉因子, 属于以 N 末端信号肽。动物实验研究指出 Myonectin 是一种营养调节性细胞因子, 其在 IR 中发挥潜在作用。目前关于 Myonectin 在 PCOS 疾病发生、发展中的作用尚未阐明, 本研究选取 55 例 PCOS 患者为观察组, 另选同期 58 例体检健康女性为对照组, 探究 PCOS 患者血清 Myonectin 的水平表达及其与多种生化代谢指标的相关性。

本研究结果显示 Myonectin 在 PCOS 患者中高表达, 其可作为 PCOS 的潜在生物学标记物, 另外由于 PCOS 疾病并发肥胖、心血管疾病、糖尿病等均与炎症紧密相关, hs-CRP 是临床上较为常用的炎症指标之一, 由肝脏细胞合成。本研究表明 PCOS 患者血清中 hs-CRP 水平高于健康体检女性。PCOS 发病的主要因素中包括有以游离形式存在的 FT<sup>[7-8]</sup>, FT 是反映患者高雄激素血症的重要指标之

一<sup>[9-12]</sup>, 本研究结果显示 PCOS 患者血清中 FT 水平高于健康女性。

不同水平 Myonectin 组中多项生化代谢指标结果比较表明, Myonectin 高、低表达组的 FBG 和 TG 水平差异具有统计学意义, 这可提示 Myonectin 作为一种营养调节性细胞因子可参与血糖、血脂的代谢过程。Spearson 相关性检验进一步证实了血清 Myonectin 水平与 FBG, TG 呈正相关关系。综上所述, Myonectin 是 PCOS 的潜在生物学标记物, 其与 FBG, TG 呈正相关关系。

### 参考文献:

- [1] SELDIN M M, PETERSON J M, BYERLY M S, et al. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis[J]. J Biol Chem. 2012;287(15):11968-11980.
- [2] LITTLE H C, RODRIGUEZ S, LEI Xia, et al. Myonectin deletion promotes adipose fat storage and reduces liver steatosis[J]. FASEB J, 2019,33(7): 8666-8687.
- [3] 黎可嘉. 肌联素对 2 型糖尿病的预测价值 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- LI Kejia. Myonectin predicts the development of type 2 diabetes [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018.
- [4] SELDIN M M, LEI Xia, TAN S Y, et al. Skeletal muscle-derived myonectin activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy in liver[J]. J Biol Chem. 2013; 288(50):36073-36082.
- [5] PARK S Y, CHOI J H, RYU H S, et al. C1q tumor necrosis factor  $\alpha$ -related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase[J]. J Biol Chem. 2009, 284(41):27780-27789.
- [6] 魏代敏, 张真真, 王泽, 等. 高雄激素对多囊卵巢综合征患者辅助生殖治疗妊娠后产科并发症的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(1):18-22.
- WEI Daimin, ZHANG Zhenzhen, WANG Ze, et al. Effect of hyperandrogenism of singleton pregnancy from in vitro fertilization in women with polycystic ovary syndrome [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2018, 53(1):18-22.
- [7] 杜静, 李佳丽, 晏耀明, 等. 多囊卵巢综合征患者血清 AMH, LH 和 FSH 水平检测及临床应用研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5):68-71.
- DU Jing, LI Jiali, YAN Yaoming, et al. Detection and clinical application of serum AMH, FSH and LH in patients with polycystic ovary syndrome [J]. J Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(5):68-71.
- [8] 李丽春, 张红莉, 南刚. 多囊卵巢综合征患者血清 IL-23 水平的检测及临床意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(5):108-109, 114.
- LI Lichun, ZHANG Hongli, NAN Gang. Clinical significance of serum IL-23 level in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5):108-109, 114.

(下转第 158 页)

# 喉鳞癌组织中 miR-1225-5p 和 CDC14B 蛋白水平表达与临床病理特征及预后的关系

闫娟, 安丽, 张杰, 拓明祥 (延安市人民医院, 陕西延安 716000)

**摘要:** 目的 探究喉鳞癌组织中 miR-1225-5p 基因和细胞分裂周期蛋白 14B (CDC14B) 蛋白表达与临床病理特征及预后的关系。方法 选取 2012 年 1 月~2015 年 6 月在延安市人民医院行手术切除的 67 例喉鳞癌患者癌组织及其对应癌旁正常组织进行实验。采用 qRT-PCR 法检测癌组织及癌旁正常组织中 miR-1225-5p mRNA 表达; 采用 SP 免疫组化染色法检测癌组织及癌旁正常组织中 CDC14B 蛋白表达; 探究 miR-1225-5p 及 CDC14B 与临床病理特征及预后的关系。结果 喉鳞癌组织中 miR-1225-5p mRNA 表达水平显著低于癌旁正常组织 ( $1.7 \pm 0.5$  vs  $5.9 \pm 1.6$ ), 差异具有统计学意义 ( $t=20.508$ ,  $P<0.001$ ); CDC14B 蛋白阳性表达率显著高于癌旁正常组织 (76.1% vs 37.3%), 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=20.550$ ,  $P<0.001$ )。miR-1225-5p mRNA 不同表达在喉鳞癌患者分化程度 ( $\chi^2=3.824$ ,  $P=0.000$ )、T 分期 ( $\chi^2=1.859$ ,  $P=0.034$ )、TNM 分期 ( $\chi^2=3.597$ ,  $P=0.000$ ) 及是否淋巴结转移 ( $\chi^2=2.191$ ,  $P=0.016$ ) 之间的差异均具有统计学意义。CDC14B 蛋白不同表达在喉鳞癌患者肿瘤直径 ( $\chi^2=5.060$ ,  $P=0.025$ )、分化程度 ( $\chi^2=6.125$ ,  $P=0.013$ )、T 分期 ( $\chi^2=10.129$ ,  $P=0.001$ )、TNM 分期 ( $\chi^2=8.114$ ,  $P=0.014$ ) 及是否淋巴结转移 ( $\chi^2=4.273$ ,  $P=0.038$ ) 之间的差异均具有统计学意义。miR-1225-5p 低表达、CDC14B 阳性患者术后 5 年总生存率低于 miR-1225-5p 高表达、CDC14B 阴性患者 (Log-rank  $P=0.046$ ,  $0.023$ )。结论 喉鳞癌组织中 miR-1225-5p 低表达、CDC14B 阳性表达与喉鳞癌恶性程度及预后密切相关, 可作为喉鳞癌潜在的肿瘤标志物及治疗靶点。

**关键词:** 喉鳞癌; miR-1225-5p; 细胞分裂周期蛋白 14B

中图分类号: R739.65; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-114-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.028

## Relationship between miR-1225-5P and CDC14B Expression Levels and Clinicopathological Features and Prognosis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

YAN Juan, AN Li, ZHANG Jie, TUO Ming-xiang (Yan'an People's Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between miR-1225-5p gene and CDC14B protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma, clinicopathological features and prognosis. **Methods** A total of 67 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who underwent surgical resection in Yan'an People's Hospital from January 2012 to June 2015 were selected for the experiment. The expression of miR-1225-5p mRNA in cancer tissues and adjacent normal tissues was detected by qRT-PCR. SP immunohistochemical staining was used to detect CDC14B protein expression in cancer tissues and adjacent normal tissues, and explore the relationship between miR-1225-5P and CDC14B and the clinicopathological features and prognosis of the patients. **Results** The expression level of miR-1225-5p mRNA in laryngeal squamous cell carcinoma tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ( $1.7 \pm 0.5$  vs  $5.9 \pm 1.6$ ), with statistically significant difference ( $t=20.508$ ,  $P<0.001$ ). The positive expression rate of CDC14B protein was significantly higher than that of adjacent normal tissues (76.1% vs 37.3%), and the difference was statistically significant ( $\chi^2=20.550$ ,  $P<0.001$ ). The differences of miR-1225-5p mRNA expression in differentiation degree ( $\chi^2=3.824$ ,  $P=0.000$ ), T stage ( $\chi^2=1.859$ ,  $P=0.034$ ), TNM stage ( $\chi^2=3.597$ ,  $P=0.000$ ) and lymph node metastasis ( $\chi^2=2.191$ ,  $P=0.016$ ) were statistically significant. The differences of CDC14B expression in tumor diameter ( $\chi^2=5.060$ ,  $P=0.025$ ), differentiation degree ( $\chi^2=6.125$ ,  $P=0.013$ ), T stage ( $\chi^2=10.129$ ,  $P=0.001$ ), TNM stage ( $\chi^2=8.114$ ,  $P=0.014$ ) and lymph node metastasis ( $\chi^2=4.273$ ,  $P=0.038$ ) were statistically significant. The 5-year postoperative overall survival rate of patients with low miR-1225-5p expression and positive CDC14B expression was lower than that of patients with high miR-1225-5p expression and negative CDC14B expression (log-rank  $P$  value was 0.046, 0.023). **Conclusion** The low expression of miR-1225-5p and the positive expression of CDC14B in laryngeal squamous cell carcinoma were closely related to the degree of malignancy and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma, which can be used as potential tumor markers and therapeutic targets for laryngeal squamous cell carcinoma.

作者简介: 闫娟 (1987-), 女, 汉, 硕士, 主治医师, 耳鼻咽喉头颈外科。E-mail: fhfh255457gye@163.com。

通讯作者: 安丽 (1986-), 女, 汉, 学士, 主治医师, 耳鼻咽喉头颈外科。

**Keywords:** laryngeal squamous carcinoma; miR-1225-5p; cell division cycle 14B

喉癌是最常见的头颈部恶性肿瘤,以鳞状细胞癌最为常见,手术是其主要治疗方式,然而晚期患者预后较差,放化疗耐药及术后局部高复发率是晚期患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。因此,基于分子水平研究喉癌的发展具有积极意义。miRNA是由19~24个核苷酸组成的短链非编码RNA,近年研究证实<sup>[2-3]</sup>,miRNAs能够调控人类基因组中约60%的基因,在人类多种恶性肿瘤中表达异常,可通过调节肿瘤细胞生物学行为参与肿瘤的发生发展进程,作为致癌基因或抑癌基因发挥作用。miR-1225-5p作为肿瘤抑制因子,最先于胃癌研究中被报道表达下调,与胃癌侵袭性表型及不良预后密切相关<sup>[4]</sup>。胶质母细胞瘤中miR-1225-5p异常过表达可抑制细胞的增殖、侵袭及迁移,在癌组织中低表达与肿瘤恶性程度显著相关<sup>[5]</sup>。细胞分裂周期蛋白14B(cell division cycle 14B, CDC14B)是细胞周期重要调节因子,能够抑制癌基因的异常表达,防止细胞恶性病变<sup>[6]</sup>。据研究报道,乳腺癌、肝癌、卵巢癌等<sup>[7-8]</sup>肿瘤中均见CDC14B低表达,与肿瘤分化程度及病理分期相关。然而目前有关miR-1225-5p和CDC14B在喉癌中的表达作用尚不明确。因此,本研究对miR-1225-5p基因和CDC14B蛋白在喉鳞癌组织中的表达及临床意义进行探究,现总结如下:

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2012年1月~2015年6月在我院行手术切除的67例喉鳞癌患者癌组织及其配对的癌旁正常组织进行实验。入组患者均为原发病例,术前未接受任何放化疗治疗,临床病理资料完整;排除并发其他部位恶性肿瘤或存在严重脏器功能障碍及精神、认知功能障碍等病例。所有组织标本于液氮中低温保存,制成石蜡标本,用于后续研究。本研究经我院医学伦理委员会批准,患者及家属均知情同意。

收集入组67例喉鳞癌患者病例资料,包括:年龄40~79岁,平均年龄 $57.3 \pm 7.2$ 岁,男性56例,女性11例;分化程度:高分化41例,中低分化26例;颈部淋巴结转移36例;T分期:T1~T2的40例,T3~T4的27例;TNM分期:I~II期38例,III~IV期29例;喉癌发生部位:声门型43例,声门上型19例,声门下型5例;既往有吸烟/饮酒史46例;肿瘤直径:<2cm的35例,2~4cm的19例,>4cm的13例。术后对入组患者进行为期5年随访,以死亡或随访终止为研究终点,观察术后总生存情况。

**1.2 试剂和仪器** Trizol试剂购自美国Invitrogen

公司;实时荧光定量PCR仪购自瑞士Roche公司;紫外分光光度计购自上海精科分析仪器厂;逆转录试剂盒购自TAKARA公司;CDC14B抗体购自美国Abcam公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 qRT-PCR法检测miR-1225-5p mRNA相对表达:**取组织样本研磨匀浆处理,采用Trizol法提取总RNA,并检测其浓度及纯度,后按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA,并以此为模板配置20  $\mu$ mol/L PCR反应体系,应用荧光定量PCR仪进行扩增反应,以GAPDH为内参。引物序列由Invitrogen设计合成,miR-1225-5p上游:5'-ACAGTGCGGTCTACGCATGCGTTCGGTAGACAGTCGTAG-3',下游:5'-GCGACAGCTGCTTACGTAGGATGCGCGCATAGCTTGACAG-3';GAPDH上游:5'-GCATGTGATCGATGACAGTTATCAG-3',下游:5'-GTCCTGATGATGCGTAGCATGATAGC-3'。反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 min预变性,95  $^{\circ}$ C变性10 s,60  $^{\circ}$ C退火20 s,72  $^{\circ}$ C延伸10 s,循环40次,实验重复3次取平均值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析miR-1225-5p mRNA相对表达。

**1.3.2 SP免疫组化染色法检测CDC14B蛋白表达:**取组织样本切片、脱蜡、水化,PBS清洗,3g/dl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶,枸橼酸盐缓冲液高压修复抗原;滴加正常山羊血清室温封闭20 min,加入一抗,4  $^{\circ}$ C过夜;次日,加入生物素化二抗(IgG),37  $^{\circ}$ C孵育20 min,PBS清洗,加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素孵育20 min;DAB染色,苏木素复染,脱水、透明,封片。鼠抗人PTEN单抗、OTUD3抗体购自Abcam公司,SP试剂盒、DAB显色液购自福州迈新生物技术开发公司,PBS代替一抗作阴性对照。

**结果判读:**CDC14B阳性判定为细胞浆内呈现棕黄色颗粒。根据阳性细胞数及染色强度进行半定量评分,于高倍镜下随机选取5个视野进行阳性细胞计数,评分标准:染色程度:无染色(0分),轻度染色(1分),中度染色(2分),强染色(3分);阳性细胞数计数:阴性(0分), $\leq 10\%$ (1分),11%~50%(2分),51%~75%(3分), $> 75\%$ (4分)。两积分和为0~2分记为阴性表达, $> 2$ 分记为阳性表达。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS 25.0进行数据分析处理,计数资料采用 $n(\%)$ 表示,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。癌组织及癌旁正常组织中miR-1225-5p及CDC14B表达比较采用配对样本 $t$ 检验和 $\chi^2$ 检验;两者表达与临床病理特征的关系

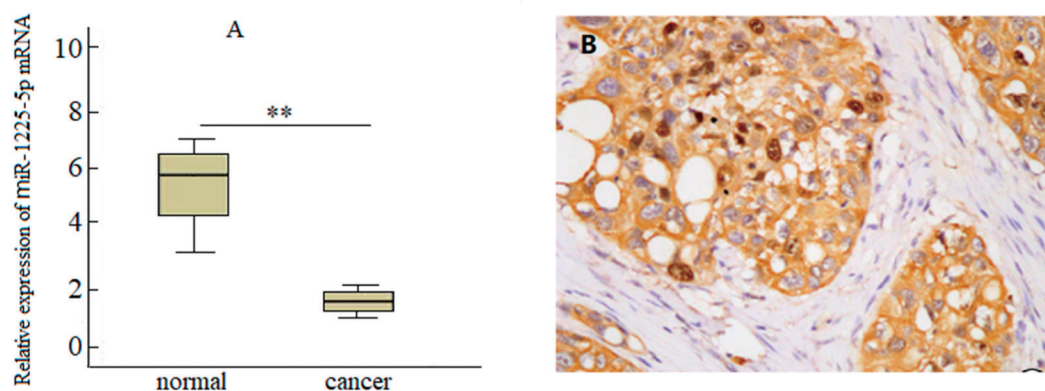


系分析采用  $t$  检验和  $\chi^2$  检验; K-M 法分析两者表达与预后的关系。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 喉鳞癌组织及癌旁正常组织中 miR-1225-5p 及 CDC14B 相对表达比较 喉鳞癌组织中 miR-1225-5p mRNA 相对表达水平显著低于癌旁正常组织

( $1.7 \pm 0.5$  vs  $5.9 \pm 1.6$ ), 差异有统计学意义 ( $t=20.508$ ,  $P < 0.001$ )。见图 1A。CDC14B 蛋白阳性主要定位于细胞浆呈棕黄色, 代表性图见图 1B。喉鳞癌组织中 CDC14B 蛋白阳性率 (76.1% vs 37.3%) 高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=20.550$ ,  $P < 0.001$ )。



A: 喉鳞癌组织及癌旁正常组织中 miR-1225-5p mRNA 表达 (\*\* $P < 0.01$ ); B: 喉鳞癌组织中 CDC14B 蛋白阳性表达 ( $\times 400$ )

图 1 miR-1225-5p 及 CDC14B 在喉鳞癌组织中的表达

2.2 miR-1225-5p 及 CDC14B 表达与喉鳞癌临床病理特征的关系 见表 1。根据免疫组化结果将入组患者分为 CDC14B 阳性组 ( $n=51$ ) 和阴性组 ( $n=16$ ), 经分析 miR-1225-5p 及 CDC14B 表达与临床病理特征的关系, 结果显示: miR-1225-5p mRNA 不同表达在喉鳞癌患者分化程度 ( $\chi^2=3.824$ ,  $P=0.000$ )、T 分期 ( $\chi^2=1.859$ ,  $P=0.034$ )、TNM 分期 ( $\chi^2=3.597$ ,

$P=0.000$ ) 及是否淋巴结转移 ( $\chi^2=2.191$ ,  $P=0.016$ ) 之间的差异具有统计学意义。CDC14B 蛋白不同表达在喉鳞癌患者肿瘤直径 ( $\chi^2=5.060$ ,  $P=0.025$ )、分化程度 ( $\chi^2=6.125$ ,  $P=0.013$ )、T 分期 ( $\chi^2=10.129$ ,  $P=0.001$ )、TNM 分期 ( $\chi^2=8.114$ ,  $P=0.014$ ) 及是否淋巴结转移 ( $\chi^2=4.273$ ,  $P=0.038$ ) 之间的差异具有统计学意义。

表 1 miR-1225-5p 及 CDC14B 表达与临床病理特征的关系

临床特征	$n=67$	miR-1225-5p mRNA			CDC14B ( $n=51$ )		
		$\bar{x} \pm s$	$t$	$P$	positiv(%)	$\chi^2$	$P$
年龄 (岁)	$\geq 60$	36	$1.6 \pm 0.7$	1.325	0.095	27 (75.0)	0.054
	$< 60$	31	$1.8 \pm 0.5$			24 (77.4)	
性别	男	56	$1.7 \pm 0.9$	0.352	0.363	44 (78.6)	1.128
	女	11	$1.8 \pm 0.6$			7 (63.6)	
吸烟 / 饮酒史	有	46	$1.8 \pm 1.0$	1.208	0.116	37 (80.4)	1.504
	无	21	$1.5 \pm 0.8$			14 (66.7)	
肿瘤部位	声门型	43	$1.8 \pm 1.1$	0.841	0.202	35 (81.4)	1.838
	声门上 / 下型	24	$1.6 \pm 0.5$			16 (66.7)	
肿瘤直径 (cm)	$\leq 4$	54	$1.8 \pm 1.5$	1.427	0.079	38 (70.4)	5.060
	$> 4$	13	$1.2 \pm 0.3$			13 (100.0)	
分化程度	高分化	41	$2.0 \pm 0.6$	3.824	0.000	27 (65.9)	6.125
	中低分化	26	$1.3 \pm 0.9$			24 (92.3)	
TNM 分期	I ~ II	38	$1.9 \pm 0.7$	3.597	0.000	24 (63.2)	8.114
	III ~ IV	29	$1.4 \pm 0.3$			27 (93.1)	
T 分期	T1~T2	40	$1.8 \pm 0.8$	1.859	0.034	25 (62.5)	10.129
	T3~T4	27	$1.5 \pm 0.3$			26 (96.3)	
淋巴结转移	是	36	$1.6 \pm 0.4$	2.191	0.016	31 (86.1)	4.273
	否	31	$1.9 \pm 0.7$			20 (64.5)	

2.3 miR-1225-5p 及 CDC14B 与喉鳞癌患者预后的关系 见图2。根据入组患者 miR-1225-5p mRNA 表达平均数分为 miR-1225-5p 高表达组 (n=18) 和低表达组 (n=49)。至末次随访结束, 所有患者均获得完整随访资料, 随访时间为 4 ~ 60 个月, 失访 6 例, 死亡 20 例 (miR-1225-5p 低表达组死

亡 18 例, CDC14B 阳性组 19 例)。K-M 法绘制生存曲线分析预后总生存率, 结果显示: miR-1225-5p 低表达组术后 5 年总生存率明显低于高表达组, 差异有统计学意义 (Log-rank  $P=0.046$ ); CDC14B 阳性表达组术后 5 年总生存率明显低于阴性表达组, 差异有统计学意义 (Log-rank  $P=0.023$ )。

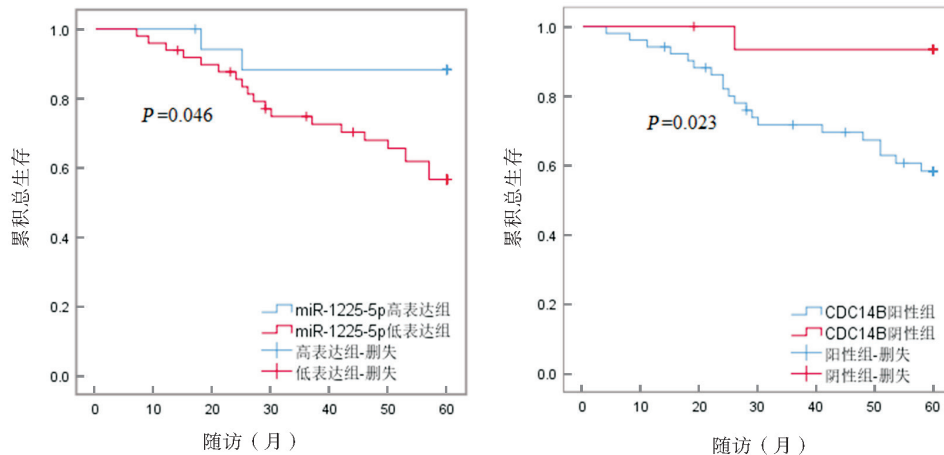


图2 miR-1225-5p 及 CDC14B 表达与喉鳞癌患者预后的关系

### 3 讨论

近年在对肿瘤分子机制的研究中发现, miRNA 参与基因表达的调控, 与人类多种肿瘤的发生发展密切相关<sup>[9]</sup>。研究表明<sup>[10]</sup>, miRNAs 作为致癌或抑癌基因在人类多种肿瘤发病机制中发挥肿瘤抑制因子、癌基因或肿瘤干细胞调节因子等重要作用。且在 miRNA 表达差异的研究中, 有文献综述了近几年国内外研究癌症相关的 miRNA 标记物, 发现癌症的发生发展过程伴随着众多 miRNAs 的异常表达, 不同类型恶性肿瘤发生发展的不同阶段常伴随着某些特异性 miRNA 分子表达的增高或降低<sup>[11-12]</sup>。由此可见, miRNAs 参与癌症发展的各个阶段, 通过对 miRNAs 进行探究分析, 可为喉癌临床诊治提供帮助。

miR-1225-5p 是近年新发现的一个 miRNA, 研究发现在胃癌及胶质母细胞瘤中 miR-1225-5p 表达抑制, 其异常过表达可抑制细胞的增殖、侵袭及迁移, 并证实胰岛素受体底物 1 (nIRS1) 可能是 miR-1225-5p 的功能靶点, 其可能通过抑制 IRS1 进而发挥抑制作用<sup>[4-5]</sup>。胰腺癌细胞系中 miRNA-1225-5p 通过靶向 JAK1 抑制胰腺癌细胞凋亡<sup>[13]</sup>。miRNA-1225-5p 通过介导 ROS 生成, 激活 Keap1-Nrf2-HO-1 信号通路, 抑制 TNF-TNF-诱导的小鼠破骨细胞形成<sup>[14]</sup>。miR-1225-5p 差异表达是星形细胞瘤临床诊断及预测预后的良好标记物<sup>[15]</sup>。提示 miR-1225-5p 可作为新的肿瘤治疗靶标及预后标志物。本研究探究发现喉鳞癌组织中 miR-1225-5p 表达下降, 进一步分析发现其与恶性病理及预后关系密切,

表明 miR-1225-5p 参与喉鳞癌发生发展进程。

CDC14B 是一种高度保守的双特异性磷酸酶, 在肿瘤的研究中发现<sup>[16]</sup>, CDC14B 作为重要细胞周期调节因子, 能够帮助 DNA 修复损伤, 保证基因遗传稳定性, 也可抑制癌基因异常表达, 防止细胞恶性病变。CHIESA 等<sup>[17]</sup>发现, 在鼠成纤维细胞系 NIH3T3 中 CDC14B 过表达可导致细胞发生恶性转变。WEI 等<sup>[18]</sup>研究发现, CDC14B 以和癌基因 H-RasV12 相似的作用方式发挥致癌作用。神经胶质瘤中, CDC14B 通过调控 SKP2/p21/p27 信号通路抑制癌细胞的增殖和分化<sup>[19]</sup>。肾透明细胞癌组织中 CDC14B mRNA 表达水平明显降低, 其低表达患者肿瘤分期和复发风险更高<sup>[20]</sup>。恶性程度越高、侵袭性越强的不同类型甲状腺髓样癌组织中 CDC14B 表达水平越低<sup>[21]</sup>。乳腺癌组织中 CDC14B 表达水平均较正常组织明显降低, 其低表达患者肿瘤恶性程度越高, 预后越差<sup>[7]</sup>。大量研究已证实<sup>[16,18]</sup>, CDC14B 涉及肿瘤发生发展的多个方面, 具有多种生物学功能, 既充当致癌基因, 又可充当抑癌基因。而本研究检测发现, 喉鳞癌组织中 CDC14B 蛋白随着喉鳞癌恶性发展明显增加, 提示其在喉鳞癌中可能充当致癌因子。本研究结果提示 miR-1225-5p 和 CDC14B 与喉鳞癌恶性发展进程及预后关系密切, 为喉鳞癌的研究提供了新的思路和目标, 但将其作为理想的预后分子标志物仍需纳入更多临床数据进行探讨。此外, 目前有关 miR-1225-5p 和 CDC14B 在喉鳞癌中的研究报道较少, 而本研究仅基于临床

病理初步探究了两者在喉鳞癌中的表达及作用,其具体调控的作用机制及两者间的相互作用还尚未知,后期还需通过设计体外实验于分子细胞生物学角度对两者参与调控喉鳞癌发生发展的内在分子作用机制进行深入探讨,以期为喉鳞癌临床治疗提供新的可靠靶点。

综上所述,喉鳞癌组织中 miR-1225-5p 低表达, CDC14B 阳性表达,与临床病理及预后关系密切,进一步探究其与喉鳞癌发生发展的分子作用机制,可为喉鳞癌提供新的治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] 乐慧君,陈思宇,李芸,等.喉癌诊疗策略及进展[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2019,33(11):1017-1021.  
LE Huijun, CHEN Siyu, LI Yun, et al. The progress on diagnosis and treatment of larynx cancer [J]. Journal of Clinical Otolaryngology Head and Neck Surgery (China), 2019, 33(11):1017-1021.
- [2] 张振,李芬.ceRNA与肿瘤[J].现代检验医学杂志,2016,31(4):128-130.  
ZHANG Zhen, LI Fen.ceRNA and tumor [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4):128-130.
- [3] WANG Xin, ZHANG Yi, ZHI Xiuyi. Correlation between microRNA expression, clinicopathological characteristics, and prognosis in patients with non-small cell lung cancer: A retrospective study[J]. Thoracic Cancer, 2017, 8(5):511-516.
- [4] ZHENG Haiyin, ZHANG Fuxing, LIN Xinjian, et al. MicroRNA-1225-5p inhibits proliferation and metastasis of gastric carcinoma through repressing insulin receptor substrate-1 and activation of  $\beta$ -catenin signaling[J]. Oncotarget, 2016, 7(4):4647-4663.
- [5] LI Dongyuan, CHI Guonan, CHEN Zhuo, et al. MicroRNA-1225-5p behaves as a tumor suppressor in human glioblastoma via targeting of IRS1[J]. OncoTargets and Therapy, 2018, 2018(11): 6339-6350.
- [6] 刘儒,谢基明,孟峻.细胞分裂周期蛋白14生物学功能的研究进展[J].吉林大学学报(医学版), 2019, 45(4):960-964.  
LIU Ru, XIE Jiming, MENG Jun. Research progress in biological functions of cell division cycle protein 14 [J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2019, 45(4):960-964.
- [7] 吴媚,黄羽,侯佳音,等.CDC14b在乳腺癌组织中的表达水平和临床预后价值研究[J].广西医科大学学报,2020,37(6):1119-1125.  
WU Mei, HUANG Yu, HOU Jiayin, et al. Study on the expression level and clinical prognostic value of CDC14b in breast cancer tissues and its clinical [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2020, 37(6):1119-1125.
- [8] 李瑞林,孟峻.细胞分裂周期蛋白14B在肿瘤中的研究进展[J].临床检验杂志,2018,36(8):632-633.  
LI Ruilin, MENG Jun. Progress of cell division cyclin 14B in tumor [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 36(8):632-633.
- [9] HEIM S, MITELMAN F. Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells[M]. 4th Ed. Hoboken: Wiley & Blackw, 2015: 351-357.
- [10] TAHIRI A, AURE M R, KRISTENSEN V N. MicroRNA networks in breast cancer cells [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1711: 55-81.
- [11] SAHABI K, SELVARAJAH G T, ABDULLAH R, et al. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers[J]. Journal of Veterinary Science, 2018, 19(2):162-171.
- [12] 李洪,唐浏,郑淋,等.结肠癌组织中 microRNA-126 表达及临床意义[J].现代检验医学杂志,2017,32(4):60-63.  
LI Hong, TANG Liu, ZHENG Lin, et al. Expression of microRNA-126 in colon cancer and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(4):60-63.
- [13] ZHONG Ruolei, LI Sheng, FANG Kaifeng, et al. microRNA-1225 inhibit apoptosis of pancreatic cancer cells via targeting JAK1[J]. Cell Cycle, 2019, 18(9):990-1000.
- [14] REZIWAN K, SUN Dalei, ZHANG Bo, et al. MicroRNA-1225 activates Keap1-Nrf2-HO-1 signalling to inhibit TNF $\alpha$ -induced osteoclastogenesis by mediating ROS generation[J]. Cell Biochem Funct, 2019, 37(4):256-265.
- [15] RIVERA-DÍAZ M, MIRANDA-ROMAN M A, SOTO D, et al. MicroRNA-27a distinguishes glioblastoma multiforme from diffuse and anaplastic astrocytomas and has prognostic value[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(1):201-218.
- [16] LIN Han, HA Kyungsoo, LU Guojun, et al. Cdc14A and Cdc14B redundantly regulate DNA double-strand break repair[J]. Molecular & Cellular Biology, 2015, 35(21):3657-3668.
- [17] CHIESA M, GUILLAMOT M, JOSE BUENO M, et al. The Cdc14B phosphatase displays oncogenic activity mediated by the Ras-Mek signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2011, 10(10):1607-1617.
- [18] WEI Zubo, ZHANG Pumin. A phosphatase turns aggressive: the oncogenicity of Cdc14B[J]. Cell Cycle, 2011, 10(15):2414.
- [19] CHEN Nanpeng, UDDIN B, HARDT R, et al. Human phosphatase CDC14A regulates actin organization through dephosphorylation of epithelial protein lost in neoplasm[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(20):5201-5206.
- [20] KIM Y, CHOI J W, LEE J H, et al. Loss of CD-C14B Expression in clear cell renal cell carcinoma: meta-analysis of microarray data sets[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 141(4):551-558.
- [21] OCZKO-WOJCIECHOWSKA M, SWIERNIAK M, KRAJEWSKA J, et al. Differences in the transcriptome of medullary thyroid cancer regarding the status and type of RET gene mutations[J]. Sci Rep, 2017, 7:42074.



# 基于 Logistic 回归和 ROC 曲线评价外周血 PCT, CRP, NEU% 和 PLT 水平在血流感染中的联合预测价值

潘锡龙, 陈 丽, 梁利斯 (中山市东升医院检验科, 广东中山 528414)

**摘要:** **目的** 探讨降钙素原 (procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、中性粒细胞百分比 (neutrophil percentage, NEU%) 和血小板 (platelet, PLT) 在血流感染 (bloodstream infection, BSI) 中的联合预测价值。**方法** 收集 103 例 BSI 疑似患者常规指标 PCT, CRP, WBC, NEU% 和淋巴细胞百分比 (lymphocyte percentage, LYM%)、中性粒细胞/淋巴细胞 (neutrophils/lymphocytes, NEU/LYM) 和血培养的检测结果及临床诊断资料, 比较 BSI 者与非 BSI 者 PCT, CRP, WBC, NEU%, LYM% 和 NEU/LYM 水平差异, 将差异有统计学意义的指标纳入 Logistic 逐步回归, 建立在 BSI 中联合预测模型, 确定联合预测组合, 通过受试者工作特征曲线 (the receiver operating characteristic curve, ROC) 比较预测组合中单个指标与联合预测模型在 BSI 中的预测价值。**结果** BSI 者与非 BSI 者的 PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM 及 PLT 比较, 差异均有统计学意义 ( $Z=4.006, 3.214, 2.030, 1.956, 1.966, 2.565$ , 均  $P<0.10$ ), WBC 差异无统计学意义 ( $Z=0.227, P>0.10$ )。PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM 及 PLT 被纳入 Logistic 回归。经 Logistic 回归, PCT, CRP, NEU% 和 PLT 被纳入建模组合; 联合预测模型为  $\text{Logit } P = -4.890 + 1.877\text{PCT} + 1.345\text{CRP} + 1.650\text{NEU\%} + 1.610\text{PLT}$ , 且 PCT, CRP, NEU% 和 PLT 的优势比 (OR) 分别为 6.5, 3.8, 5.2 和 5.0。PCT, CRP, NEU%, PLT 和联合预测模型的 ROC 曲线下面积 (area under ROC curve, AUC) 分别为 0.732, 0.686, 0.618, 0.649 和 0.859, 联合预测模型 AUC 均明显大于单一指标 AUC ( $P<0.05$ )。**结论** 在 BSI 疑似人群中, PCT, CRP, NEU% 和 PLT 的联合预测模型均比各指标单独应用时有更好的预测价值, 单独应用 PCT, NEU% 或 PLT 可协助初步识别 BSI, 使用联合预测模型进行综合判断可协助确认 BSI。

**关键词:** Logistic 回归; 受试者工作特征曲线; 生物标志物; 血流感染; 预测价值

**中图分类号:** R515.3; R446.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-119-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.029

## Evaluation of the Combined Predictive Value of Peripheral Blood PCT, CRP, NEU% and PLT Levels in Bloodstream Infection Based on Logistic Regression and ROC Curve

PAN Xi-long, CHEN Li, LIANG Li-si

(Department of Clinical Laboratory, Dongsheng Hospital of Zhongshan City, Guangdong Zhongshan 528414, China)

**Abstract: Objective** To investigate the combined predictive value of procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), neutrophil percentage (NEU%) and platelet (PLT) in bloodstream infection (BSI). **Methods** The results of PCT, CRP, WBC, NEU% and lymphocyte percentage (LYM%), neutrophils/lymphocytes (NEU/LYM) and blood culture and clinical diagnostic data of 103 suspected BSI patients were collected. The differences of PCT, CRP, WBC, NEU%, LYM% and NEU/LYM levels between BSI and non-BSI were analyzed. The detection indicators with significant differences between BSI and non-BSI were included in the logistic stepwise regression. The joint prediction model was established in BSI. The joint prediction portfolio was determined. The predictive value in BSI was compared between a single indicator in the prediction portfolio and the joint prediction model through the receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** The PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM and PLT levels of BSI patients and non-BSI patients were significantly different ( $Z=4.006, 3.214, 2.030, 1.956, 1.966, 2.565$ , all  $P<0.10$ ), but there was no significant difference in WBC levels ( $Z=0.227, P>0.10$ ). PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM and PLT were included in the logistic stepwise regression. PCT, CRP, NEU% and PLT were included in the modeling portfolio by the logistic stepwise regression. The joint prediction model was  $\text{Logit } P = -4.890 + 1.877\text{PCT} + 1.345\text{CRP} + 1.650\text{NEU\%} + 1.610\text{PLT}$ . The odds ratios (OR) of PCT, CRP, NEU% and PLT were 6.5, 3.8, 5.2 and 5.0, respectively. The area under the ROC curve (AUC) of PCT, CRP, NEU%, PLT and the joint prediction model were 0.732, 0.686, 0.618, 0.649 and 0.859, respectively. The AUC of the joint prediction model was significantly greater than that of the single indicator ( $P<0.05$ ). **Conclusion** In the suspected BSI

**作者简介:** 潘锡龙 (1980-), 男, 大学本科, 副主任技师, 主要从事实验室质量管理及诊断指标应用, E-mail: panxilong\_houlin@126.com。

population, the combined prediction models of PCT, CRP, NEU% and PLT were better than those of each indicator when applied alone. Application of PCT, NEU% or PLT alone is helpful for initial identification of BSI. The application of the joint prediction model to comprehensive judgment is helpful to confirm BSI.

**Keywords:** logistic regression; receiver operating characteristic curve; biomarker; bloodstream infection; predictive value

血流感染 (bloodstream infection, BSI) 具有起病急、病情进展快、病情严重、死亡率高的特征<sup>[1-2]</sup>, 及早诊断和治疗对改善预后和降低死亡率至关重要<sup>[3-4]</sup>。血培养是 BSI 诊断金标准, 但时间过长, 无法及早做出诊断。分子生物学技术可快速诊断, 但其实验室开展条件苛刻、生产成本低, 不利于推广<sup>[5]</sup>。单一生物标志物检测, 虽时间短但敏感度或特异度不理想<sup>[6]</sup>。因此, 寻求简便、快速、有效的 BSI 诊断手段, 成为实验室多年来共同努力的一个目标。本研究目的是应用 Logistic 回归构建降钙素原 (procalcitonin, PCT)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、中性粒细胞百分比 (neutrophil percentage, NEU%) 和血小板 (platelet, PLT) 在细菌性 BSI 中联合预测模型, 研究其在 BSI 早期诊断中的临床价值。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 采用回顾性分析, 选取 2019 年 1 月~2020 年 3 月中山市东升医院同时进行 PCT, CRP, 血细胞检测及血培养的疑似 BSI 者 103 例。其中, 血培养阳性、临床诊断为 BSI 者 43 例 (即 BSI 组), 男女比例为 25:18, 年龄  $59.7 \pm 15.3$  岁; 血培养阴性的临床诊断为非 BSI 者 60 例 (即非 BSI 组), 其中男女比例为 39:21, 年龄  $62.6 \pm 19.0$  岁。BSI 组与非 BSI 组的人口学特征、基础疾病等一般临床资料匹配 ( $P>0.05$ )。排除标准: ①年龄小于 18 岁; ②临床资料及检测数据不完整者; ③ PCT, CRP, 血细胞检测与血培养的时间差  $>4$  h; ④对同一患者住院期间多次重复 PCT, CRP, 血细胞检测、血培养情况, 如非血流感染者只纳入第 1 次结果, 如血流感染者只纳入第 1 次血培养阳性时结果; ⑤伴自身免疫缺陷或应用免疫调节治疗者、恶性肿瘤、孕妇及哺乳期妇女等。本研究对所涉及病人资料保密, 经医院伦理委员会备案。

1.2 仪器与试剂 使用南京基蛋生物 Getein1600 荧光免疫分析系统检测血清 PCT; 使用迈瑞 BC-5390 CRP 血液分析系统进行外周全血细胞计数和 CRP 检测, 执行国际血液学复检专家组推荐的 41 条自动 CBC 和 DC 复检规则<sup>[7]</sup>; 按照血培养操作规范<sup>[8]</sup>, 执行双侧双套原则, 使用美国 BD 公司 BACTEC 9050 血培养系统、江门凯林哥伦比亚血平板和梅里埃 ATB 细菌鉴定系统进行血培养。

1.3 研究方法 ①收集病人 PCT, CRP, 白细胞 (white blood cells, WBC), NEU%, 淋巴细胞百分

比 (percentage, LYM%), 中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophils/lymphocytes, NEU/LYM), PLT, 血培养的检测数据和临床资料。②比较 BSI 组与非 BSI 组的 PCT, CRP, WBC, NEU%, LYM%, NEU/LYM 及 PLT 的组间差异 (即单因素分析)。③将单因素分析中差异有统计学意义的指标作为自变量, 将是否为 BSI 作为因变量, 进行 Logistic 回归: 首先作回归适用条件验证 (连续性自变量与因变量 log 转换值是否存在线性关系、自变量之间是否存在多重共线性); 验证通过后绘制单变量在 BSI 中受试者工作特征曲线 (the receiver operating characteristic curve, ROC) 并以最佳 cutoff 值作为临界点进行二分类转换, 然后进行多变量二项 Logistic 逐步回归构建联合预测模型 (变量筛选设定  $a_{\text{入}}=0.10$ ,  $a_{\text{出}}=0.15$ ), 如有离群点作去除后重新回归; 进行回归系数 (b) 检验、模型拟合优度检验、优势比 (OR) 分析。④绘制联合预测模型 ROC 曲线, 比较单变量 (即单一指标) 与多变量联合 (多指标联合) 预测模型 ROC 曲线下面积 (area under ROC curve, AUC), 分析联合预测模型的临床价值。

1.4 统计学分析 非正态分布计量资料以中位数 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示及组间差异比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验,  $P<0.10$  为差异有统计学意义; 采用 Box-Tidwell 检验连续性单变量与因变量 log 转换值线性关系,  $P>0.05$  为存在线性关系; 通过线性回归获得容忍度  $>0.10$  或方差膨胀因子  $<10.0$  为不存在多重共线性; 以  $>3.0$  倍标准差为离群点; Hosmer-Lemeshow 检验模型拟合优度, 以  $P>0.05$  为拟合优度高; 采用 Wald 检验回归系数 b,  $P<0.05$  为差异有统计学意义; AUC 比较采用单一变量的  $Z$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。数据统计分析应用 SPSS19.0, Medcalc 15.0 软件处理。

## 2 结果

2.1 单变量分析 见表 1。BSI 组与非 BSI 组的 PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM 及 PLT 比较, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.10$ ), WBC 差异无统计学意义 ( $P>0.10$ )。

2.2 多变量二项 Logistic 回归 见表 2, 表 3。连续性自变量与因变量 log 转换值存在线性关系, 自变量间不存在多重共线性, 不存在离群点。Logistic 逐步回归显示: LYM% ( $a=0.314$ ) 和 NEU/LYM ( $a=0.413$ ) 被拒绝纳入回归, PCT, CRP, NEU%, PLT 分别与 BSI 的发生独立相关,

联合预测模型拟合优度高 ( $P=0.587$ ), 所有回归系数  $b$  有统计学意义, 模型表达式为  $\text{Logit}P=-4.890+1.877\text{PCT}+1.345\text{CRP}+1.650\text{NEU\%}+1.610\text{PLT}$

LT。PCT, CRP, NEU% 和 PLT 的 OR 分别为 6.534, 3.837, 5.208 和 5.003。

表1 BSI组与非BSI组PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM, PLT和WBC水平的组间差异分析 [M( $P_{25}$ ,  $P_{75}$ )]

检测指标	非BSI组	BSI组	Mann-Whitney $U$ 检验	
			Z	P
PCT (ng/ml)	0.79 (0.09, 10.94)	9.76 (2.69, 35.09)	4.006	0.000
CRP (mg/L)	62.85 (17.92, 112.35)	140.00 (57.79, 192.83)	3.214	0.001
WBC ( $\times 10^9/\text{L}$ )	12.75 (6.74, 18.26)	10.46 (8.69, 14.60)	0.227	0.820
NEU%	83.25 (74.90, 89.50)	87.70 (82.23, 91.15)	2.030	0.042
LYM%	11.15 (6.40, 17.05)	8.10 (4.53, 11.90)	1.956	0.051
NEU/LYM	7.27 (4.23, 13.93)	10.57 (6.77, 19.66)	1.966	0.049
PLT ( $\times 10^9/\text{L}$ )	192.5 (148.0, 300.0)	170.0 (104.0, 218.8)	2.565	0.010

表2 Logistic回归自变量与因变量logit转换值线性、自变量间多重共线性检验

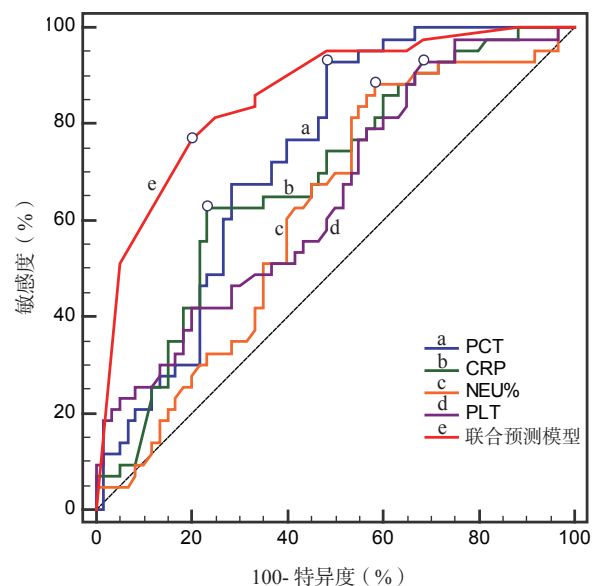
自变量	自变量与因变量logit转换值线性		自变量间多重共线性	
	Wald值	P	容忍度	方差膨胀因子
PLT	0.359	0.549	0.839	1.192
CRP	1.512	0.219	0.826	1.211
NEU%	0.081	0.776	0.317	3.153
LYM%	1.432	0.231	0.288	3.478
NEU/LYM	2.168	0.141	0.755	1.324
PLT	0.026	0.872	0.887	1.127

表3 多变量二项 Logistic 回归分析

自变量	回归系数		OR (95%CI)
	b值	P	
PCT	1.877	0.008	6.534 (1.643 ~ 25.985)
CRP	1.345	0.010	3.837 (1.375 ~ 10.705)
NEU%	1.650	0.010	5.208 (1.475 ~ 18.388)
PLT	1.610	0.022	5.003 (1.285 ~ 19.895)
常数	-4.890	0.000	-

注: 95%CI为95%置信区间。

2.3 PCT, CRP, NEU%, PLT及联合预测模型在BSI中诊断性能 见表4和图1。在BSI中, PCT, CRP, NEU%, PLT及其联合预测模型的敏感度和特异度分别为93.02%, 62.79%, 88.37%, 93.02%, 76.74%和51.67%, 76.67%, 41.67%, 31.67%, 80.00%。PCT, CRP, NEU%, PLT及其联合预测模型的AUC分别为0.732, 0.686, 0.618, 0.649和0.859, 联合预测模型AUC均明显大于单一指标AUC ( $P<0.05$ )。



注: 图中“○”表示最佳截断值所在位置, “---”表示参考线。

图1 PCT, CRP, NEU%, PLT及这4个指标联合预测模型在BSI中ROC曲线



表4 PCT, CRP, NEU%, PLT 及这4个指标联合预测模型在BSI中诊断性能

指标	Cutoff 值	敏感度 (%)	特异度 (%)	AUC (95%CI)
PCT (ng/ml)	0.82	93.02	51.67	0.732 (0.636 ~ 0.815) <sup>ab</sup>
CRP (mg/L)	112.7	62.79	76.67	0.686 (0.587 ~ 0.774) <sup>ab</sup>
NEU%	78.6	88.37	41.67	0.618 (0.517 ~ 0.712) <sup>ab</sup>
PLT ( $\times 10^9/L$ )	262.0	93.02	31.67	0.649 (0.548 ~ 0.740) <sup>ab</sup>
联合预测模型	0.50	76.74	80.00	0.859 (0.776 ~ 0.919) <sup>a</sup>

注: 95%CI 为 95% 置信区间; a 表示 AUC 与 0.5 比较,  $P < 0.05$ ; b 表示单一指标与联合预测模型的 AUC 比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

Logistic 回归在诊断指标应用方面具有以下优点<sup>[9-10]</sup>: ①能消除各指标间的混杂因素。② Logistic 回归模型对多个分类自变量进行拟合后新生成的联合预测因子能优化提高 ROC 曲线光滑度和工作性能。③对具体某个患者, 在获得各指标检测数据后通过方程求得预测概率, 并与模型的临界值(cutoff)比较, 得到倾向性诊断。这种基于临床数据建模的方式更符合循证医学思想, 是对临床医生经验性判断的一个重要补充, 尤其是当指标与指标之间出现矛盾的诊断方向时应用联合模型判断能很好解决。然而, 目前应用 Logistic 回归对常规指标<sup>[11]</sup>在成年人 BSI 中联合预测价值进行评价的报道比较罕见, 故本文展开这方面探讨。

本研究发现 BSI 人群 PCT, CRP, NEU%, NEU/LYM 表现较高水平和 PLT 表现较低水平。除 WBC 外, PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM 和 PLT 在 BSI 人群中水平表现与国内外相关报道<sup>[12-13]</sup>相似。众所周知重度感染时外周血 WBC 计数可出现显著升高或下降等不同表现, WBC 在区别感染严重程度时存在一定缺点, 在本文中得到了验证。在单因素差异分析时, 为了避免漏掉一些重要因素, 本研究将  $P$  值放宽到 0.10, 并得到将 PCT, CRP, NEU%, LYM%, NEU/LYM, PLT 纳入 Logistic 逐步回归。因为本研究同样关注自变量对因变量的影响程度(即权重或优势比 OR), 故将连续性自变量进行二分类转换, 最终得到具有预测意义的由 PCT, CRP, NEU%, PLT 形成的联合预测模型。在 BSI 疑似人群中, 当 PCT 高于 0.82 ng/ml 时 BSI 发生风险增加 6.5 倍, 当 NEU% 高于 78.6 时 BSI 发生风险增加 5.2 倍, 当 PLT 低于  $262 \times 10^9/L$  时 BSI 发生风险增加 5.0 倍, 当 CRP 高于 112.7 mg/L 时 BSI 发生风险增加 3.8 倍。预测权重(即 OR)由大到小的自变量依次为 PCT, NEU%, PLT, CRP。李旻等<sup>[14]</sup>人指出 PCT, CRP 与 BSI 相关且 PCT 预测权重大于 CRP, 而 NEU, PLT 则与 BSI 无关, 与本研究有一定差别, 可能与研究人群和建模组合指标不同有关, 也可能与

研究人群的划分不同有关, 值得进一步探讨。虽然本研究与相关报道<sup>[15]</sup>均表明 BSI 与非 BSI 人群 LYM% 水平差异有统计学意义、与相关报道<sup>[15-16]</sup>均表明 BSI 与非 BSI 人群 NEU/LYM 水平差异有统计学意义, 但本研究通过 Logistic 回归建模后却发现 LYM%, NEU/LYM 不被作为有意义的指标, 可见即便是在单因素分析时差异有统计学意义的指标也不一定被纳入预测模型中。另外, 基于研究方法不同, 本研究与相关研究<sup>[15,17-18]</sup>的研究结果也存在一定差异。卢仁泉<sup>[19]</sup>等人间接指出在联合多个指标对疾病进行协助诊断时应对这些指标进行科学组合和应用 Logistic 回归建模, 并兼顾模型敏感度和特异度、确定 cutoff 值, 以达到最佳诊断效果, 而且指出利用 Logistic 回归建模的方法是未来发展方向, 具有广阔应用前景。冯磊等<sup>[20]</sup>人研究也表明 Logistic 回归可提高分析结果的可靠性和有效性。

本研究发现, 联合预测模型、PCT 均具有一定识别和鉴别 BSI 的综合能力(即整体诊断效能, AUC 均  $> 0.70$ ), 而 CRP, NEU%, PLT 的整体诊断准确性则相对较低(AUC 均  $< 0.70$ ), 其中联合预测模型均比任一指标单独应用时的整体诊断性能都要好。显然, 通过 Logistic 回归建立联合模型能得到具有更佳的 BSI 预测效果, 其诊断能力较应用单一指标时显著提升。PCT, NEU%, PLT 和联合预测因子具有较好的 BSI 识别能力(敏感度), CRP 和联合预测因子具有较好的 BSI 鉴别能力(特异度), 尤其是在各指标联合后具有更好的特异度。鉴于此, 在 BSI 疑似人群中可先参考 PCT, NEU%, PLT 检测数据进行协助初筛, 然后使用预测模型进行协助确认。本研究还发现 PCT 在联合建模中的权重和单独应用时的整体诊断性能(即 AUC)均最大, 与相关报道<sup>[14-15,17-18,21]</sup>相似, 在协助 BSI 诊断时 PCT 是一个相对较好的指标。

综上所述, WBC, LYM% 或 NEU/LYM 单独应用时对 BSI 的预测意义不大, PCT, NEU%, PLT 或 CRP 单独应用时对 BSI 有一定预测价值, 其中 PCT 预测价值最大。PCT, CRP, NEU% 和 PLT 的联合预测模型均比各指标单独应用时有更好

的BSI预测价值。单独应用PCT, NEU%或PLT可协助初步识别BSI, 使用联合预测模型进行综合判断可协助确认BSI。本研究不足之处是未对所建模型进行验证, 往后将纳入更多临床病例进一步验证或完善模型。

#### 参考文献:

- [1] 周梦兰, 杨启文, 于淑颖, 等. 血流感染流行病学研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(2): 212-217.  
ZHOU Menglan, YANG Qiwen, YU Shuying, et al. Updates on the epidemiology of bloodstream infection[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2019, 19(2): 212-217.
- [2] YANG Zuyao, ZHAN Siyan, WANG Bo, et al. Fatality and secular trend of bloodstream infections during hospitalization in China: a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Peking University Health Sciences, 2010, 42(3): 304-307.
- [3] 凌利芬, 陆学东, 汤一苇. 血流感染的实验室诊断进展研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(14): 2234-2240.  
LING Lifeng, LU Xuedong, TANG Yiwei. Advances in laboratory diagnosis of bloodstream infections[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2018, 28(14): 2234-2240.
- [4] LEVY M M, DELLINGER R P, TOWNSEND S R, et al. The surviving sepsis campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis[J]. Critical Care Medicine, 2010, 38(2): 367-374.
- [5] 王铁山, 苏建荣. 分子诊断学在细菌和真菌的血流感染检测中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 1-5.  
WANG Tieshan, SU Jianrong. Clinical application of molecular diagnostics in detecting bloodstream infections of bacterial and fungal pathogens[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 1-5.
- [6] 郭建, 吴文娟. 血流感染分子诊断的研究进展[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 584-589.  
GUO Jian, WU Wenjuan. The research progress in the molecular diagnosis of blood stream infection[J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 584-589.
- [7] BARNES P W, MCFADDEN S L, MACHIN S J, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Laboratory hematology, 2005, 11: 83-90.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 503-2017 临床微生物实验室血培养操作规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National Health Commission of the People's Republic of China. WS/T 503-2017 Operating procedures of blood culture for clinical microbiology laboratory[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.
- [9] 段立伟, 张晟, 林兆奋. 以 logistic 回归模型构建联合预测因子对脓毒症诊断及预后判断的临床运用[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(2): 139-144.  
DUAN Liwei, ZHANG Sheng, LIN Zhaofen. Formulation of combined predictive indicators using logistic regression model in predicting sepsis and prognosis[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2017, 29(2): 139-144.
- [10] TRIPEPI G, JAGER K J, STEL V S, et al. How to deal with continuous and dichotomic outcomes in epidemiological research: linear and logistic regression analyses[J]. Nephron Clinical Practice, 2011, 118(4): C399-C406.
- [11] 张真路, 武利涛, 周新. 血流感染相关生物标志物的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(9): 719-720.  
ZHANG Zhenlu, WU Litao, ZHOU Xin. Clinical application of biomarkers related to bloodstream infection[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2014, 37(9): 719-720.
- [12] 徐远久, 鲁小龙, 温晓峰. 降钙素原和超敏C-反应蛋白在早期血流感染患者中的临床诊断价值[J]. 重庆医学, 2017, 46(34): 4836-4838.  
XU Yuanjiu, LU Xiaolong, WEN Xiaozeng. Clinical value of procalcitonin and hypersensitive C-reactive protein in patients with early bloodstream infection[J]. Chongqing Medicine, 2017, 46(34): 4836-4838.
- [13] 宋丽娜, 令狐志宏, 于珊珊, 等. 降钙素原检测对血流感染的预测价值[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(7): 1322.  
SONG Lina, LINGHU Zhihong, YU Shanshan, et al. Predictive value of procalcitonin detection for bloodstream infection[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2019, 36(7): 1322.
- [14] 李旻, 赖惠英, 石婧, 等. 不同炎症因子对老年女性患者细菌性血流感染的早期诊断价值[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(2): 192-196.  
LI Min, LAI Huiying, SHI Jing, et al. The early diagnostic value of different inflammatory factors in elderly female patients with blood stream infection[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2018, 37(2): 192-196.
- [15] 吴琼, 李丽娟, 刘国梁, 等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值联合降钙素原检测在血流感染诊断中的价值[J]. 检验医学, 2016, 31(10): 898-901.  
WU Qiong, LI Lijuan, LIU Guoliang, et al. The value of neutrophil/lymphocyte ratio combined with procalcitonin in the diagnosis of bloodstream infection[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(10): 898-901.
- [16] 李若倩, 蒋清清, 马萍, 等. C反应蛋白和中性粒细胞/淋巴细胞比值对血流感染的诊断价值[J]. 检验医学, 2016, 31(10): 902-903.  
LI Ruqian, JIANG Qingqing, MA Ping, et al. Diagnostic value of C-reactive protein and neutrophil/lymphocyte ratio in blood flow infection[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(10): 902-903.
- [17] 余潇, 胡海珍, 李小宁. 降钙素原、血小板计数联合检测对血流感染的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(19): 2779-2781, 2786.  
YU Xiao, HU Haizhen, LI Xiaoning. Diagnostic value of combined detection of procalcitonin and platelet count for bloodstream infection[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2019, 16(19): 2779-2781, 2786.
- [18] PAN Yaping, FANG Yaping, XU Yuanhong, et al. The diagnostic value of procalcitonin versus other biomarkers in prediction of bloodstream infection[J]. Clinical Laboratory, 2017, 63(2): 277-285.

- [19] 卢仁泉, 陈苗苗, 郭林. 肿瘤标志物联合检测及评分模型在肿瘤诊疗中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(3): 180-184.  
LU Renquan, CHEN Miaomiao, GUO Lin. The application and prospect for the tumor marker score model in clinical diagnosis and therapy [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2018, 41(3): 180-184.
- [20] 冯磊, 年士艳, 赵阳, 等. 不同分析策略下应用二分类 Logistic 回归进行疾病风险评估的结果差异性分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(3): 232-236.  
FENG Lei, NIAN Shiyan, ZHAO Yang, et al. Difference analysis of results of disease risk assessment by using binary Logistic regression under different analysis strategies [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2018, 41(3): 232-236.
- [21] 张婷, 丁爽, 李洪春, 等. 血清 PCT, CRP 及 NEU% 联合检测对细菌性血流感染的早期诊断价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 75-77, 80.  
ZHANG Ting, DING Shuang, LI Hongchun, et al. Early diagnostic value of combined detection of serum PCT, CRP and NEU% in patients with bacterial bloodstream infection [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 75-77, 80.
- 收稿日期: 2020-06-15 修回日期: 2020-07-11
- 
- (上接第 67 页)
- [4] O'BRIEN J, HAYDER H, ZAYED Y, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation [J]. Frontiers in Endocrinology, 2018, 9: 402.
- [5] SCHULTE C, KARAKAS M, ZELLER T. microRNAs in cardiovascular disease - clinical application [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017, 55(5): 687-704.
- [6] LI Zhuoling, WU Jia, WEI Weishi, et al. Association of serum miR-186-5p with the prognosis of acute coronary syndrome patients after percutaneous coronary intervention [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 686.
- [7] ZHANG Jungang, LI Yaxing, ZHAO Qingzhen. Circulating miR-23b as a novel biomarker for early risk stratification after ST-Elevation myocardial infarction [J]. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2018, 24: 1517-1523.
- [8] PILBROW A P, CORDEDDU L, CAMERON V A, et al. Circulating miR-323-3p and miR-652: candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes [J]. International Journal of Cardiology, 2014, 176(2): 375-385.
- [9] 张梦轩, 张冬娜, 李雪, 等. 血清 IMA, H-FABP 与 hs-CRP 水平联合检测在 ACS 早期诊断中的应用研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 16-18, 22.  
ZHANG Mengxuan, ZHANG Dongna, LI Xue, et al. Application of combined detection of serum IMA, H-FABP and hs-CRP levels in early diagnosis of ACS [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(5): 16-18, 22.
- [10] 冯荣波, 李全培, 张远朝, 等. 高敏肌钙蛋白-I 在急性冠状动脉综合征中的表达及临床意义 [J]. 检验医学, 2019, 26(21): 144-146, 150.  
FENG Rongbo, LI Quanpei, ZHANG Yuanchao, et al. The expression and clinical significance of high-sensitivity troponin-I in acute coronary syndrome [J]. Laboratory Medicine, 2019, 26(21): 144-146, 150.
- [11] 龚福汉, 肖小强, 张学平. 床旁联合检测 cTnI、NT-proBNP 在急性 NSTEMI 患者早期诊断中的应用价值 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(1): 85-87.  
GONG Fuhuan, XIAO Xiaoqiang, ZHANG Xueping. Application value of bedside combined detection of cTnI and NT-proBNP in early diagnosis of acute NSTEMI [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2019, 16(1): 85-87.
- [12] 张国正, 梁岩, 蔺亚晖, 等. 高敏肌钙蛋白-I 浓度及变化诊断急性心肌梗死的中国人群临床应用研究 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(1): 44-49.  
ZHANG Guozheng, LIANG Yan, LIN Yahui, et al. Clinical application research on the diagnosis of acute myocardial infarction by the concentration and dynamic change of high-sensitivity troponin-I in Chinese population [J]. Chinese Circulation Journal, 2019, 34(1): 44-49.
- [13] FLORIJS B W, BIJCKER R, VAN DER VEER E P, et al. Gender and cardiovascular disease: are sex-biased microRNA networks a driving force behind heart failure with preserved ejection fraction in women [J]. Cardiovascular Research, 2018, 114(2): 210-225.
- [14] 郝中坚, 吕吉元, 吴宏, 等. 循环 miRNA-21 在急性冠脉综合征早期诊断中的表达水平及其临床意义研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(11): 1701-1704.  
HAO Zhongjian, LÜ Jiyuan, WU Hong, et al. Expression level and clinical significance of circulating miRNA-21 in early diagnosis of acute coronary syndrome [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease, 2019, 17(11): 1701-1704.
- [15] CHEN Fengshou, LI Xiaoqian, LI Zhe, et al. Altered expression of MiR-186-5p and its target genes after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2020, 718: 134669.
- [16] YAO Yan, ZHANG Xin, CHEN Haipeng, et al. MicroRNA-186 promotes macrophage lipid accumulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting cystathionine  $\gamma$ -lyase in THP-1 macrophages [J]. Atherosclerosis, 2016, 250(4): 122-132.
- [17] HE Weilai, CHE Hong, JIN Chaolong, et al. Effects of miR-23b on hypoxia-induced cardiomyocytes apoptosis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96(7): 812-817.
- [18] KAUR A, MACKIN S T, SCHLOSSER K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease [J]. Cardiovascular Research, 2020, 116(6): 1113-1124.
- [19] BRUNO N, TER MAATEN J M, OVCHINNIKOVA E S, et al. MicroRNAs Relate to early worsening of renal function in patients with acute heart failure [J]. International Journal of Cardiology, 2016, 203(8): 564-569.
- 收稿日期: 2020-07-06 修回日期: 2020-08-12



## 外周血血小板计数与红细胞比容联合检测对代谢综合征的预测价值

樊凡, 唐西怀, 何浩浩 [陕西省老年病医院(省二院)检验科, 西安 710005]

**摘要:** **目的** 探讨外周血血小板计数(PLT)与红细胞比容(HCT)联合检测对代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的预测价值。**方法** 2017年2月~2019年12月选择在陕西省老年病医院体检的成年人360例作为研究对象, 调查所有入选者的一般资料, 并进行外周血血小板计数与红细胞比容联合检测, 判断代谢综合征发生情况进行预测价值分析。**结果** 在360例入选者中, 诊断为MS的50例, 检出率为13.9%。MS组的性别、年龄、吸烟、饮酒、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、舒张压与非MS组对比, 差异无统计学意义( $t/\chi^2=0.322\sim0.956$ , 均 $P>0.05$ ), 两组的体重指数、腰围、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、收缩压相比, 差异有统计学意义( $t$ 或 $\chi^2=0.000\sim0.013$ , 均 $P<0.05$ )。MS组的外周血血小板计数与红细胞比容分别为 $(332.56\pm 61.35)\times 10^9/L$ 和 $54.06\%\pm 2.84\%$ , 均高于非MS组的 $(185.35\pm 50.12)\times 10^9/L$ 和 $43.87\%\pm 2.67\%$ , 且差异有统计学意义( $t=18.647, 26.834$ , 均 $P<0.05$ )。Pearson相关分析显示血小板计数、红细胞比容、体重指数、腰围、FBG, TG, HDL-C, LDL-C, 收缩压与代谢综合征显著相关( $r=0.000\sim0.003$ , 均 $P<0.05$ )。血小板计数、红细胞比容单独预测代谢综合征的ROC曲线下面积分别为0.632和0.642, 两者联合预测的ROC曲线下面积为0.766。**结论** 外周血血小板计数与红细胞比容联合检测预测代谢综合征具有较高的准确性, 对代谢综合征早期筛查具有重要参考价值。

**关键词:** 代谢综合征; 外周血; 血小板计数; 红细胞比容; 血糖; 血脂

**中图分类号:** R446.111; R589 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)06-125-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.030

## Predictive Values of Combined Detection of Peripheral Blood Platelet Count and Hematocrit for Metabolic Syndrome

FAN Fan, TANG Xi-huai, HE Hao-hao

(Department of Laboratory Medicine, Geriatric Hospital in Shaanxi Province, Xi'an 710005, China)

**Abstract: Objective** To explore the predictive values of combined detection of peripheral blood platelet count and hematocrit for metabolic syndrome. **Methods** From February 2017 to December 2019, 360 cases of adults who were selected for physical examination in Geriatric Hospital in Shaanxi Province were selected as the research object. The general information of all cases were investigated, and combined detection of peripheral blood platelet count and hematocrit were performed to determine the occurrence of metabolic syndrome. **Results** 50 cases were diagnosed with metabolic syndrome in the 360 cases, and the detection rates were 13.9%. There were no significant difference in gender, age, smoking, drinking, TC, diastolic blood pressure compared between the MS group and non-MS group ( $t/\chi^2=0.322\sim0.956$ , all  $P>0.05$ ). The difference of body mass index, waist circumference, FBG, TG, HDL-C, LDL-C and systolic blood pressure compared between the two groups were statistically significant ( $t/\chi^2=0.000\sim0.013$ , all  $P<0.05$ ). The peripheral blood platelet count and erythrocyte volume of the MS group were  $(332.56\pm 61.35)\times 10^9/L$  and  $54.06\%\pm 2.84\%$  respectively, which were both higher than those of the non-MS group [ $(185.35\pm 50.12)\times 10^9/L$  and  $43.87\%\pm 2.67\%$ ], and the differences were statistically significant ( $t=18.647, 26.834$ , all  $P<0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that platelet count, hematocrit, body mass index, waist circumference, FBG, TG, HDL-C, LDL-C, and systolic blood pressure were significantly correlated with metabolic syndrome ( $r=0.000\sim0.003$ ,  $P<0.05$ ). The area under the ROC curve predicted by platelet count and hematocrit separately were 0.632 and 0.642 respectively, and the area under the ROC curve predicted by combined detection of platelet count and hematocrit were 0.766. **Conclusion** The combined detection of peripheral blood platelet count and hematocrit has high accuracy in predicting metabolic syndrome, and it has important reference value for early screening of metabolic syndrome.

**作者简介:** 樊凡(1983-), 女, 硕士研究生, 主管检验师, 研究方向: 临床检验、生物化学检验, E-mail: fanf2020@126.com。

**通讯作者:** 唐西怀(1969-), 男, 本科, 主管检验师, 研究方向: 生物化学检验、血液细胞形态学, E-mail: 1052552764@qq.com。

**Keywords:** peripheral blood; metabolic syndrome; platelet count; hematocrit; blood glucose; blood lipids

随着饮食结构和生活方式的改变,肥胖以及严重的患病率不断增加,使得代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的发生率逐渐增加<sup>[1]</sup>。该病发生与发展过程比较复杂,涉及的因素比较多<sup>[3]</sup>。其中肥胖可导致游离脂肪酸增加、胰岛素抵抗、减少胰岛素介导的葡萄糖摄取,形成恶性循环<sup>[4]</sup>。血小板计数是调节人体血液功能平衡的重要因素,也是影响机体血栓形成与血凝块形成的重要指标<sup>[5-6]</sup>。红细胞比容 (hematocrit, HCT) 与肥胖、高脂血症的发生存在一定关联,也与代谢综合征的某些代谢组分有关<sup>[7]</sup>。本文具体探讨了外周血血小板计数与红细胞比容联合检测对代谢综合征的预测价值,以明确两者与代谢综合征发病的相关性。现报道如下:

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 2017年2月~2019年12月选择在陕西省老年病院体检的成年人360例作为研究对象,年龄18~60岁,体检资料完整。排除标准:妊娠与哺乳期妇女;身体残缺者和近期感染者;体检资料缺乏者;重大脏器疾病携带者;并发自身免疫性疾病患者;既往有精神性疾病史。此次研究经本院伦理委员会批准。

**1.2 仪器与试剂** 相关生化指标检测采用日立7180全自动生化分析仪,试剂均购自四川迈克生物有限公司;血小板计数与红细胞比容检测采用希森美康 XN-550 血细胞分析仪。所有实验室设备经过校准和使用了盲重复样品。

**1.3 方法** ①调查所有入选者的一般资料,包括性别、年龄、体重指数、生活习惯、腰围、家族病史、

血压等。②抽取入选者的空腹12h静脉血2~3ml,低温放置2~3h,3000 r/min离心15min。检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、血小板计数与红细胞比容。③代谢综合征诊断标准:腹型肥胖:男性腰围 $\geq 90$ cm,女性腰围 $\geq 85$ cm;高血糖:FBG $\geq 6.1$ mmol/L;高血压:血压 $\geq 130/85$ mmHg;TG $\geq 1.7$ mmol/L;HDL-C $< 1.04$ mmol/L。当具备 $\geq 3$ 项可诊断为代谢综合征。

**1.4 统计学分析** 选择Epidata3.02软件进行数据录入和处理,并将部分指标量化,导入SPSS17.00统计软件进行分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,对比采用 $\chi^2$ 检验;计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对比采用 $t$ 检验。相关性分析采用Pearson相关分析,绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线判断预测价值,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 代谢综合征发生情况** 见表1。在360例入选者中,诊断为MS 50例,检出率为13.9%。MS组的性别、年龄、吸烟、饮酒、TC、舒张压与非MS组对比差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),两组的体重指数、腰围、FBG, TG, HDL-C, LDL-C, 收缩压等对比差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。

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

项目	MS组 ( $n=50$ )	非MS组 ( $n=310$ )	$\chi^2/t$	$P$
性别(男/女)	26/24	160/150	0.003	0.956
年龄(岁)	40.45 $\pm$ 4.59	41.09 $\pm$ 5.22	0.332	0.724
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	26.68 $\pm$ 2.14	22.14 $\pm$ 2.95	10.204	0.000
吸烟 [ $n(\%)$ ]	18(36.0)	110(35.5)	0.005	0.944
饮酒 [ $n(\%)$ ]	22(44.0)	140(45.2)	0.023	0.879
TC(mmol/L)	5.80 $\pm$ 0.22	5.73 $\pm$ 0.29	0.422	0.633
舒张压(mmHg)	84.20 $\pm$ 10.44	86.09 $\pm$ 9.11	0.702	0.322
腰围(cm)	100.34 $\pm$ 6.77	89.76 $\pm$ 10.14	12.942	0.000
FPG(mmol/L)	8.19 $\pm$ 0.94	5.82 $\pm$ 0.68	22.844	0.000
TG(mmol/L)	3.63 $\pm$ 0.81	2.54 $\pm$ 0.77	8.724	0.002
HDL-C(mmol/L)	1.00 $\pm$ 0.15	1.21 $\pm$ 0.11	5.975	0.013
LDL-C(mmol/L)	3.92 $\pm$ 0.14	3.01 $\pm$ 0.18	8.092	0.004
收缩压(mmHg)	156.49 $\pm$ 23.13	132.20 $\pm$ 19.42	10.221	0.000

**2.2 血小板计数与红细胞比容对比** MS组的血小板计数 [ $(332.56 \pm 61.35) \times 10^9/L$  vs  $(185.35 \pm 50.12) \times 10^9/L$ ]

和红细胞比容 ( $54.06\% \pm 2.84\%$  vs  $43.87\% \pm 2.67\%$ ) 与非MS组相比差异有统计学意义 ( $t=18.647$ , 26.834,

均  $P < 0.05$ 。

2.3 相关性分析 见表2。在360例入选者中, Pearson 相关分析显示血小板计数、红细胞比容、体重指数、腰围、FBG, TG, HDL-C, LDL-C, 收缩压与代谢综合征具有显著相关性 ( $P < 0.05$ )。

表2 血小板计数、红细胞比容等指标与代谢综合征的相关分析 ( $n=360$ )

指标	$r$	$P$
血小板计数	0.566	0.003
红细胞比容	0.671	0.000
体重指数	0.701	0.000
腰围	0.813	0.000
FBG	0.564	0.003
TG	0.601	0.002
HDL-C	0.714	0.000
LDL-C	0.535	0.005
收缩压	0.611	0.001

2.4 预测价值 在360例入选者中, 血小板计数、红细胞比容单独预测代谢综合征的 ROC 曲线下面积分别为 0.632, 0.642, 约登指数 0.242, 0.259; 两者联合检测的 ROC 曲线下面积为 0.766, 约登指数 0.344。

### 3 讨论

目前随着经济的快速发展, 人民生活水平和营养条件有明显改善的同时, 也导致代谢综合征发病率呈现迅速增长的趋势。代谢综合征是一组多种异常代谢成分聚集的临床症候群, 包括血压升高、TG 升高、血糖升高、中心性肥胖、HDL-C 降低等<sup>[2]</sup>。代谢综合征是多种危险因素相互作用和累加的结果, 与高血压、肥胖、糖尿病、血脂异常等密切相关。胰岛素抵抗是多数与代谢相关疾病的致病基础, 也是代谢综合征发病的重要环节。同时脂肪摄入过多与消耗不足也容易引起肥胖, 导致胰岛素抵抗, 也是一个重要的致病因素<sup>[8]</sup>。并且肥胖者可发展成胰岛素型糖尿病, 增加心血管疾病的危险<sup>[9]</sup>。

本研究显示在360例入选者中, 诊断为代谢综合征的50例, 检出率为13.9%。MS组的性别、年龄、吸烟、饮酒、TC、舒张压与非MS组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 两组的体重指数、腰围、FBG, TG, HDL-C, LDL-C, 收缩压相比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同时也有研究显示, 当发生胰岛素抵抗时, 胰岛素不能抑制脂肪分解, 可使得机体内 TG, HDL-C 水平增加<sup>[10]</sup>。血脂异常也可下调靶细胞膜上的胰岛素受体亲和力数目, 干扰胰岛素信号转导, 抑制葡萄糖转运, 加重胰岛素抵抗, 从而造成恶性循环。

代谢综合征是一组复杂的代谢紊乱症候群, 众多不同的因素都促进代谢综合征的发展。本研究显示 MS 组的血小板计数与红细胞比容与非 MS 组相比具有统计学差异。其中代谢综合征患者较普通人群更易发生血小板数目增多与红细胞比容增加, 后两者也可使代谢综合征的患病风险升高。从机制上分析, 血小板可释放某些炎症因子, 还能直接激活红细胞, 导致炎症因子的进一步释放<sup>[11]</sup>。较高的血小板及细胞数目也与胰岛素抵抗、动脉粥样硬化之间存在显著相关性, 也会增加已有心血管疾病患者的死亡率。这与马晓天等<sup>[12]</sup>人的研究结果一致。

代谢综合征由一组心血管疾病危险因素导致, 包括高血糖、血脂异常、高血压、血栓前状态、腹型肥胖、促炎症状态等, 其基本的病理生理机制是胰岛素抵抗与中心性肥胖<sup>[13]</sup>。本研究中 Pearson 相关分析显示血小板计数、红细胞比容、体重指数、腰围、FBG, TG, HDL-C, LDL-C, 收缩压与代谢综合征显著相关; 血小板计数、红细胞比容单独预测代谢综合征的 ROC 曲线下面积分别为 0.632, 0.642, 两者联合检测的 ROC 曲线下面积为 0.766。从机制上分析, 代谢综合征患者体内处于胰岛素抵抗状态, 可导致血小板呈现功能亢进状态, 伴随有纤溶活性下降, 增加了心血管事件的发生风险<sup>[14-15]</sup>。本研究也有一定的局限性, 研究对象的筛选具有一定意愿性, 且样本量不足, 将在后续研究中进行深入分析。

总之, 血小板计数与红细胞比容联合检测预测代谢综合征具有较高的准确性, 对代谢综合征早期筛查具有重要参考价值。

### 参考文献:

- [1] 刘铁蕾, 苏易, 吴钰, 等. 社区糖尿病高危人群代谢综合征早期防控策略优化研究 [J]. 上海医药, 2019, 40 (14): 41-44.  
LIU Yilei, SU Yi, WU Yu, et al. Study of optimization of early prevention and control strategies for metabolic syndrome in high-risk population of diabetes mellitus in the community [J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal, 2019, 40(14): 41-44.
- [2] 龚春雨, 邓华, 赖飞, 等. 成都地区男性良性前列腺增生率与代谢综合征的相互关系 [J]. 西部医学, 2019, 31(10): 1586-1590.  
GONG Chunyu, DENG Hua, LAI Fei, et al. Preliminary study on the relationship between benign prostatic hyperplasia and metabolic syndrome in males in Chengdu [J]. Medical Journal of West China, 2019, 31(10): 1586-1590.
- [3] PONTOIZEAU C, GIRARD A, MESBAH H, et al. Prognostic value of baseline total metabolic tumor volume measured on FDG PET in patients with richter syndrome [J]. Clinical Nuclear Medicine, 2020, 45(2): 118-122.



- [4] 毛维维, 伊桂叶. 不同肥胖类型患者血清代谢指标与内脏脂肪指数的相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019,34(5):1-3, 8.  
MAO Weiwei, YI Guiye. Correlation between serum metabolic indexes of different obesity types and visceral adiposity index[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(5):1-3, 8.
- [5] 朱意平, 李春阳, 陈超, 等. 生活方式干预对双相障碍合并代谢综合征患者的影响[J]. 齐鲁护理杂志, 2019,25(1):40-43.  
ZHU Yiping, LI Chunyang, CHEN Chao, et al. Effect of lifestyle intervention on patients with bipolar disorder complicated with metabolic syndrome[J]. Journal of Qilu Nursing, 2019,25(1):40-43.
- [6] 刘珂华, 刘启贵, 陈芳芳, 等. 代谢综合征与危险因素的相关研究论文可视化分析[J]. 现代预防医学, 2019,46(1):180-186.  
LIU Kehua, LIU Qigui, CHEN Fangfang, et al. Visualization analysis of the studies on metabolic syndrome and risk factors[J]. Modern Preventive Medicine, 2019,46(1):180-186.
- [7] 郑伟扬, 刘怡娅. 贵州省成年居民膳食模式与代谢综合征的关系[J]. 现代预防医学, 2019,46(10):1761-1764.  
ZHENG Weiyang, LIU Yiya. Relationship between dietary patterns and metabolic syndrome among adult residents in Guizhou province[J]. Modern Preventive Medicine, 2019,46(10):1761-1764.
- [8] 梁宝璐, 陶丽新, 陈硕, 等. 北京市上班族通勤方式与代谢综合征关联性研究[J]. 现代预防医学, 2019, 46(11):1956-1960.  
LIANG Baoli, TAO Lixin, CHEN Shuo, et al. Association between mode of transportation and metabolic syndrome of officer workers, Beijing[J]. Modern Preventive Medicine, 2019,46(11):1956-1960.
- [9] 李爽境, 黄闪闪, 刘熹润, 等. 决策树模型与logistic回归模型在代谢综合征影响因素分析中的应用 - 以凉山地区为例[J]. 现代预防医学, 2019,46(13):2319-2323,2328.  
LI Shuangjing, HUANG Shanshan, LIU Xirun, et al. Application of decision tree and logistic regression model on risk factors of metabolic syndrome: a case study in Liangshan region[J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(13):2319-2323,2328.
- [10] JIALAL G, ADAMS-HUET B, JIALAL I. Both the platelet count and the platelet:lymphocyte ratio are not increased in nascent metabolic syndrome[J]. Platelets, 2019, 30(8):1057-1058.
- [11] 王兆秀, 季红, 张立瑶, 等. 信息平台在代谢综合征病人健康管理中的应用进展[J]. 护理研究, 2019, 33(7):1162-1166.  
WANG Zhaoxiu, JI Hong, ZHANG Liyao, et al. Application progress on information platform in health management of patients with metabolic syndrome[J]. Chinese Nursing Research, 2019,33(7):1162-1166.
- [12] 马晓天, 顾建华, 王丽, 等. 血小板计数与代谢综合征关联性的前瞻性队列研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(12):92-97.  
MA Xiaotian, GU Jianhua, WANG Li, et al. Association between platelet count and metabolic syndrome based on a prospective cohort study[J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2018,56(12):92-97.
- [13] 郭海健, 念馨, 梁友芳, 等. 基于多中心横断面调查的中国人代谢综合征的流行情况及危险因素[J]. 中华疾病控制杂志, 2019,23(7):796-801.  
GUO Haijian, NIAN Xin, LIANG Youfang, et al. The prevalence and risk factors of metabolic syndrome in Chinese population based on the multi center cross-sectional survey[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2019,23(7):796-801.
- [14] 王绵, 张力辉, 苏胜偶. 2018年内分泌代谢疾病重要临床进展[J]. 临床荟萃, 2019,34(1):33-40.  
WANG Mian, ZHANG Lihui, SU Shengou. Clinical advances in endocrine and metabolic disease in 2018[J]. Clinical Focus, 2019,34(1):33-40.
- [15] 杨滢, 王素华, 石玉荣. 代谢综合征患者FGF21水平与HDL亚类分布的关系[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40(7):793-797.  
YANG Ying, WANG Suhua, SHI Yurong. The relationship between the distribution of HDL subclass and the level of serum FGF21 in patients with metabolic syndrome[J]. Journal of Qiqihar University of Medicine, 2019, 40(7):793-797.

收稿日期: 2020-02-19 修回日期: 2020-03-06

(上接第58页)

- [11] KONO M, NAKAMURA Y, OYAMA Y, et al. Increased levels of serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respiratory Medicine, 2016,115:46-52.
- [12] LOIMARANTA V, HEPOJOKI J, LAAKSOAHO O, et al. Galectin-3-binding protein: A multitask glycoprotein with innate immunity functions in viral and bacterial infections[J]. Leukoc Biol, 2018, 104(4):777-786.
- [13] DEROO E P, WROBLESKI S K, SHEA E M, et al. The role of galectin-3 and galectin-3-binding protein in venous thrombosis[J]. Blood, 2015,125(11):1813-1821.
- [14] 谢浩. Mac-2结合蛋白在动脉粥样硬化和斑块去稳定性中的作用和机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- XIE Hao. Role of mac-2 binding protein in atherosclerosis and plaque destabilization and mechanisms involved[D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [15] GLEISSNER C A, ERBEL C, LINDEN F, et al. Galectin-3 binding protein, coronary artery disease and cardiovascular mortality: Insights from the LURIC study[J]. Atherosclerosis, 2017,260:121-129.
- [16] POWELL T J, SCHRECK R, MCCAL M, et al. A Tumor-derived protein which provides T-cell costimulation through accessory cell activation[J]. Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology, 1995,17(4):209-221.

收稿日期: 2019-09-23

修回日期: 2019-10-07

# 新型冠状病毒血清特异性抗体检测的假性问题 分析和对策探讨

宁明哲,陶月,陈雨欣,柏兵(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,南京 210008)

**摘要:**新型冠状病毒肺炎对全球造成了巨大威胁。目前血清抗体检测,成为该疾病诊断和流行控制的关键指标。我国“新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)”中,已明确将新型冠状病毒抗体检测作为临床确诊标准。在临床实际工作过程中,笔者发现新型冠状病毒抗体检测存在着假阳性或者假阴性的问题,给临床解读造成困扰。该文针对新型冠状病毒抗体检测方法的设计和原理,分析可造成假阳性和假阴性结果的原因,并指出解决方法,从而促进对新冠病毒抗体检测更好的理解,以及为临床提供更加全面的结果解读。

**关键词:**新型冠状病毒肺炎;新型冠状病毒;IgM 抗体;IgG 抗体;假阳性;假阴性

**中图分类号:** R373.19; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-129-03

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.031

## SARS-CoV-2 Serological Antibody Testing: Problems of False Detections and the Solutions

NING Ming-zhe, TAO Yue, CHEN Yu-xin, BAI Bing

(Department of Laboratory Medicine, Gulou Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** The novel coronavirus pneumonia (COVID-19) outbreak has caused a global disaster. Currently, the antibody testing has become the key for controlling of this pandemic. The guidelines from the National Health Commission (trial version 7) recommend the antibody (IgM and IgG) testing for the COVID-19 diagnosis and therapy. However, false positive and negative detections are often found in clinical laboratories. The author therefore here discuss the possible reasons and solutions of the questionable results, based on the designs and principles of the immunoassays developed for the COVID-19 antibody detection. This review will facilitate better understanding of the COVID-19 antibody detection and more appropriate interpretation of the results for clinicians.

**Keywords:** novel coronavirus; antibody; false positive; false negative

2019年底发现的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)迅速席卷全球,已成为全球的公共卫生大事件,对全球各地区人民的生命健康和经济带来巨大损失。新型冠状病毒感染导致的疾病称为新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19),据世界卫生组织的实时数据统计,截止2020年7月4日,全球COVID-19确诊病例达1130多万例,死亡人数超过52万。目前,我国的防控防疫工作已取得阶段性成果,COVID-19抗体检测是进行流行病学调查的主要方法。同时,国家卫生健康委员会2020年3月3日发布的“新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)”,已明确将COVID-19 IgM和IgG抗体作为临床确诊标准<sup>[1]</sup>。然而,在4月份国家药品监督管理局也提出抗体检测试剂仅用作对SARS-CoV-2核酸检测阴性疑似病例的补充检测<sup>[2-5]</sup>,或在疑似病例诊断中与核酸检测协同使用,不作为SARS-CoV-2感染者确诊和排除的依据,也不适用

于一般人群的筛查。这提示现有SARS-CoV-2抗体检测试剂使用过程中可能存在一定的假阴性和假阳性情况。

目前被国家药品监督管理局批准的COVID-19抗体检测试剂盒厂家有广州万孚生物技术股份有限公司、唐山英诺特生物技术有限公司、博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司、厦门万泰凯瑞生物技术有限公司、珠海丽珠试剂股份有限公司、珠海经济特区海泰生物制药有限公司、上海芯超生物科技有限公司、南京诺唯赞医疗科技有限公司、博奥赛斯(重庆)生物科技有限公司、广东和信健康科技有限公司与丹娜(天津)生物科技有限公司。上述检测试剂盒主要检测SARS-CoV-2特异性的IgM和IgG抗体,检测方法包括酶联免疫法、化学发光法及胶体金免疫层析法,包被的抗原包括SARS-CoV-2的N蛋白(Nucleoprotein)、M蛋白(Membrane protein)和S蛋白(Spike glycoprotein)。需要提出

**作者简介:** 宁明哲(1978-),女,硕士,主任技师,主要从事临床免疫实验室检查,E-mail: 54669182@qq.com。

**通讯作者:** 柏兵, E-mail: bb00004@outlook.com。

的是,本次流行的 SARS-CoV-2 与曾经流行的 Bat-SL-CoV, SARS-CoV 与 MERS-CoV 相比, N, M 和 S 蛋白在氨基酸序列上具有极高的相似性(90%左右)<sup>[6]</sup>。这是检测方法中的抗原设计及结果判断应当考虑的因素。除此之外, COVID-19 的基因末端多出一个新的 ORF10 基因, 表达 38 个氨基酸。用它作为抗原表位, 可极大保证 COVID-19 抗体检测的特异性, 但目前的相关研究和应用很少。

由于包被抗原选择的复杂性、高质量抗体制备的困难性以及免疫学检测方法本身的局限性, 敏感度高、特异度强的试剂盒需要通过严格的性能验证。由于疫情的迫切性, 上述在极短时间内生产出的 COVID-19 抗体检测试剂盒, 虽然总体性能尚可, 但也出现了一些检验结果与临床表现和流行病学特征不相符的现象。现对它们进行初步探讨, 并提供一些应对思路。

## 1 COVID-19 抗体检测中的假阳性问题

1.1 既往冠状病毒感染 COVID-19 属于  $\beta$  家族的冠状病毒<sup>[7]</sup>。根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库,  $\beta$  家族冠状病毒该家族中有六种、173 个病毒。COVID-19 中的 N 蛋白、P 蛋白、S 蛋白在氨基酸序列上除与非典型性肺炎病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV)和中东呼吸综合征病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)有高达 90% 以上的相似度外, 还有多种其它冠状病毒在基因序列比对中显示有类似氨基酸序列。这些病毒多数不致病, 但因为具有类似序列, 可以在人体内产生干扰性抗体, 从而导致 COVID-19 抗体检测的假阳性问题。该种情况一般导致 IgG 抗体假阳性, 但不排除 IgM 假阳性。

1.2 交叉抗体的存在 人体正常情况下含有  $10^{11}$  (1 000 亿) 个 B 细胞, 至少可结合 1 000 万种不同抗原表位以上的抗体<sup>[8]</sup>。而正常机体每天产生  $10^9$  个新的 B 细胞。如此庞大的表位结合多样性, 完全有可能随机产生能与包被在检测载体中的抗原片段结合的抗体。另外, 人体在环境中可受到近 1 400 种病原体感染, 或接受各种致敏原的刺激, 会产生更多新的抗体, 极大增加了不同人体间抗体库构成的复杂性, 使得干扰抗体可以随机存在。这种情况下的假阳性, 应仅 IgG 抗体或 IgM 抗体阳性<sup>[10]</sup>。

1.3 高浓度弱亲和力的抗体或蛋白干扰 根据抗原抗体结合的反应公式  $[Ab]+[Ag]=[Ag-Ab]$  及解离常数  $K_d=[Ab]*[Ag]/[Ag-Ab]$ 。Kd 越大, 亲和力越小。一般鼠单抗的亲和力在 1nmol/L 左右 ( $10^{-9}$ mol/L), 兔单抗的亲和力在 0.01nmol/L 左右 ( $10^{-10}$ mol/L)。人体正常血清中 IgM 总浓度约为 1mg/ml, 针对某

一表位的抗体 IgM 浓度估计在总 IgM 浓度的万分之一以下, 因此其有效浓度不超过 1nmol/L。在抗原为 10nmol/L (约 1  $\mu$ g/ml) 和 Kd 为 1nmol/L 的情况下, 1nmol/L 的 IgM 将与 9% 的抗原结合。当 Kd 降低 1 000 倍 (1 000nmol/L) 时, 仅有 0.1% 的抗原被结合, 导致检测信号将降低 100 倍。然而, 当这种低亲和力的抗体浓度 1 000 倍增高时 (1 000nmol/L), 近 50% 的抗原被结合。而这种亲和力高浓度的杂质分子在血液中经常存在。比如, 一般细胞因子的浓度在 1ng/ml 左右, 而清蛋白在 50mg/ml 左右, 有着千万倍数的差异, 可对检测造成干扰。

1.4 方法学本身的问题 特别是胶体金免疫层析法。这种方法方便快捷、便于床边诊断, 但检测过程中没有充分的清洗过程, 难以有效去除非特异性结合物质。这种情况下, 可用缓冲液手工充分洗涤。真阳性的结果, 一般不受洗涤明显影响。

1.5 其它常见因素的干扰 如类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)<sup>[9]</sup>、补体、嗜异性抗体、溶菌酶等。

## 2 COVID-19 抗体检测中的假阴性问题

2.1 检测试剂中的抗原设计与制备 这些抗原蛋白的制备一般采用肽段合成或在质粒表达的方法。合成的肽段和在大肠埃希菌中所表达的肽段没有人体中正常情况下的翻译后修饰 (post-translational modification)。在真核细胞中表达的蛋白的翻译和修饰是否与 COVID-19 所感染的肺泡上皮细胞中产生的修饰相同尚不清楚。比如 SARS-CoV 的 S 蛋白有高达 23 个糖基化位点和 7 个二硫键。这些被修饰的位点对线性和空间抗原表位有着决定性作用, 在合成或重组表达的抗原中未必完全存在, 这样就可能检测的假阴性。

2.2 双抗原夹心法容易产生假阴性结果 这种方法需要两个抗原与抗体特异性反应同时存在。前已述及, 由于抗原抗体反应的平衡性及 Kd 常数, 抗原与抗体并非 100% 结合。假如只有 70% 结合时, 两者同时结合, 以形成最终的有效被检测物时, 只有近一半 (49%)。双抗原夹心法检测抗体的另一个缺点是空间位阻问题。包被抗原与标记抗原在待测血清标本中并非游离存在。因为血清的蛋白浓度极高 (50~70  $\mu$ g/ $\mu$ l), 蛋白容易相互附着。一个抗体双臂上抗原结合区域之间的空间较小。当包被抗原与标记抗原与待测血清中的蛋白有相互附着时, 会因为空间位阻的原因而影响其与待测抗体的结合, 而造成检测的假阴性。

2.3 试纸条的胶体金免疫层析法更易产生假阴性结果 相对于其它常规免疫学检测方法中 30 min 左右的抗原抗体结合时间, 胶体金试纸条法的反应时间一般在 1 min 内完成, 抗原抗体可能无法充分混



匀及反应,造成假阴性的结果,而且阳性结果的线性定量关系较差。另外,在胶体金试纸条检测COVID-19抗体的方法中,抗原包被膜条,胶体金标记抗人IgM或IgG。在人血清标本中IgM和IgG的含量极高,而真正待测抗体的浓度应该在万分之一以下,而胶体金标记的二抗与血清标本中如此高浓度的IgM或IgG完全结合,导致因灵敏度不足而出现的检测假阴性。

2.4 其它导致检测假阴性的常见问题 如基质干扰、钩状反应等。

### 3 COVID-19 抗体检测问题的解决思路

3.1 同时检测针对SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体<sup>[10-11]</sup>,在接触感染源后的第一个星期左右,IgM和IgG可同时出现阳性。同时检测针对SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体可提高敏感度。

3.2 动态检测SARS-CoV-2的IgM和IgG抗体感染初期,第一次抗体检测阳性时,在3~7天后再次检测,IgM和IgG水平一般都出现4倍升高。

3.3 建议用不同蛋白(如联用N蛋白和S蛋白)或不同序列的肽段作为包被抗原的试剂盒,进行复查。如为假阳性,两者同时阳性的可能性较小。

3.4 对金标试纸条可能存在的假阳性,可考虑用磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤震荡3~5次;对金标试纸条的假阴性,可考虑将前端含有胶体金的垫片取下,先将试纸条插入血清中进行充分层析。然后将膜条移入新的滤纸,并在洗脱的胶体金中进行层析。

3.5 对于非特异性蛋白吸附造成空间位阻的问题,可在样本中加入较强的去垢剂。一般免疫学检测方法中所用的缓冲液仅含0.05%的吐温-20,不足以去除较强干扰蛋白的吸附。此时可考虑选择1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),甚至RIPA(Radio Immunoprecipitation Assay)缓冲液。这可适用于胶体金试纸条法,但不适用于抗原或抗体被动吸附于固相载体上的免疫学方法。

3.6 怀疑为类风湿因子(RF)等干扰时,可直接检测RF水平;当RF水平较高时,可考虑为RF水平的干扰。

### 4 结论

血清新型冠状病毒特异性的抗体检测是对疑似新型冠状病毒患者的补充检测。但是如果将抗体检测应用于临床大规模检测时,则需要考虑潜在检测假阳性和假阴性的问题,本文也提出了一些解决思路。相信随着对SARS-CoV-2研究的深入,抗体检测方法和检测性能会愈发完善,从而有可能用于大规模人群的筛查和诊断中,以更好地帮助临床诊断和流行病的回顾性研究。

### 参考文献:

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒

肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL].(2020-03-4)[2020-03-04].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.

National Health Commission of the People's Republic of China. The guideline of diagnosis and treatment of COVID-19 (Pilot Release 7) [EB/OL].(2020-03-4)[2020-03-04].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.

[2] MEYER B, DROSTEN C, MU LLER M A. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls[J]. Virus Research, 2014, 194: 175-183.

[3] LU Hongzhou, STRATTON C W, TANG Yiwei. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(4):401-402.

[4] 鲁彦, 居军, 李德红. 核酸和血清学指标结合,多类型标本联检,提高新型冠状病毒检出率[J/OL]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1161-1163, 1165.

LU Yan, JU Jun, LI Dehong. Novelcoronavirus detection rate is improved by combining nucleic acid and serological markers with multiple types of specimens[J/OL]. Laboratory Medicine and Clinic, 2020, 17(9): 1161-1163, 1165.

[5] 王露莹, 陈品儒, 郑国湾, 等. 新型冠状病毒检测方法的研究进展[J/OL]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 411-416.

WANG Luying, CHEN Pinru, ZHENG Guowan, et al. Research progress on detection methods of SARS-CoV-2 [J/OL]. Drugs & Clinic, 2020, 35(3): 411-416.

[6] GRIFONI A, SIDNEY J, ZHANG Yun, et al. A Sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2[J]. Cell Host & Microbe, 2020, 27(4): 671-680.e2.

[7] LU Roujian, ZHAO Xiang, LI Juan, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. The Lancet, 2020, 395(10224):565-574.

[8] REES A R. Understanding the human antibody repertoire[J]. MAbs, 2020, 12(1): 1729683.

[9] 上海市医学会检验医学分会. 新型冠状病毒核酸和抗体检测临床应用专家共识[J/OL]. 国际检验医学杂志, 2020,41(14):1665-1669.

Shanghai Medical Association Laboratory Medicine Branch. Consensus of novel coronavirus nucleic acid and antibody detection for clinical application[J/OL]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020,41(14):1665-1669.

[10] 郑培明, 崔发财, 张福明, 等. 新型冠状病毒IgM和IgG抗体不同检测方法在新型冠状病毒感染中的临床应用评价[J]. 检验医学, 2020, 35(4): 291-294.

ZHENG Peiming, CUI Facai, ZHANG Fuming, et al. Clinical evaluation of different detection methods of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in the COVID-19 diagnosis[J]. Laboratory Medicine, 2020, 35(4): 291-294.

收稿日期: 2020-06-27 修回日期: 2020-07-06

# 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 热灭活咽拭子及热灭活后提取核酸样本在 4℃ 保存的稳定性研究

喻 晶, 吴夏枫, 刘晓翌, 纪 玲 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518029)

**摘要:** 目的 研究 56℃ 30 min 热灭活后的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 咽拭子及提取的核酸在 4℃ 保存的稳定性。方法 采用多重荧光定量 PCR 方法对一例 COVID-19 患者的咽拭子样本, 56℃ 30 min 热灭活后进行 COVID-19 双靶点 (ORF1ab 和 N 基因) 核酸检测, 把原始咽拭子样本及提取的核酸保存在 4℃, 分别于 24, 48, 72 和 96h 再次检测咽拭子样本及提取核酸中新冠病毒核酸的含量 ( $C_t$  值), 分析热灭活后咽拭子样本及提取核酸在 4℃ 保存的稳定性。结果 COVID-19 患者的咽拭子样本, 56℃ 30 min 热灭活后核酸检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性,  $C_t$  值分别为 31.27 和 30.64, 咽拭子样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因的结果为 24h (31.41 和 30.68), 48h (34.13 和 34.28), 72h (34.06 和 34.11) 和 96h (36.22 和 40.02)。提取的核酸 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后的检测结果为 24h (31.64 和 30.06), 48h (31.62 和 29.95), 72h (31.72 和 29.75) 和 96h (31.36 和 30.09)。56℃ 30 min 热灭活的咽拭子样本在 4℃ 保存 24h 后, 对 COVID-19 核酸的检测无明显影响 (偏倚 <1%), 但 4℃ 保存 48~72h, ORF1ab 基因核酸降解约 7 倍, N 基因降解约 11 倍, 4℃ 保存 96h, ORF1ab 和 N 基因核酸分别降解 30.91 倍和 666.29 倍。但是提取的核酸 4℃ 保存 24~96h 后, 对核酸的检测结果无明显影响 (偏倚均小于 3%)。结论 研究结果表明 56℃ 30 min 热灭活后提取的核酸的稳定性比原始咽拭子样本好, 热灭活后的咽拭子样本可在 4℃ 保存 24h。

**关键词:** 新型冠状病毒肺炎; 热灭活; 咽拭子样本; 提取核酸; 4℃ 保存

中图分类号: R373.19; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-132-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.032

## Study on the Stability of Heat-Inactivated Throat Swab and Its Extracted Nucleic Acid of COVID-19 Stored at 4℃

YU Jing, WU Xia-feng, LIU Xiao-yi, JI Ling

(Department of Laboratory Medicine, Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518029, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the stability of heat-inactivated throat swab and its extracted nucleic acid sample of Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19) after stored at 4℃. **Methods** Multiple-quantitative real-time PCR was used to detect a throat swab sample from a patient with COVID-19. Dual-target nucleic acid detection of COVID-19 ORF1ab and N genes was performed after the swab sample was heat inactivated at 56℃ for 30 minutes. After stored at 4℃, the throat swab sample and its extracted nucleic acid was re-detected at 24, 48, 72 and 96h. The stability of the swab sample and its extracted nucleic acid was analyzed. **Results** The throat swab sample from the patient with COVID-19 was found to be double positive for ORF1ab and N genes after heat inactivation at 56℃ for 30 min. The  $C_t$  values were 31.27 and 30.64 respectively. After the swab sample and its extracted nucleic acid were stored at 4℃ for 24, 48, 72 and 96h, the ORF1ab and N genes were detected again. The  $C_t$  values of the swab sample were as follows: 24h (31.41, 30.68), 48h (34.13, 34.28), 72h (34.06, 34.11) and 96h (36.22, 40.02), but the  $C_t$  values of the extracted nucleic acid were 24h (31.64, 30.06), 48h (31.62, 29.95), 72h (31.72, 29.75) and 96h (31.36, 30.09). After stored at 4℃ for 24 hours, there was no significant effect on the detection of COVID-19 nucleic acid of the swab sample (bias <1%). But when stored at 4℃ for 48~72h, the ORF1ab gene nucleic acid was degraded approximately 7 times, and the N gene was degraded about 11 times, stored at 4℃ for 96h, the degradation of ORF1ab and N gene nucleic acid was 30.91 times and 666.29 times, respectively. However, after the extracted nucleic acid was stored at 4℃ for 24 to 96 hours, no significant degradation was found on the nucleic acid detection (all biases <3%). **Conclusion** The results showed that the stability of the extracted nucleic acid was better than that of the raw swab sample after stored at 4℃. The heat-inactivated throat swab sample could be stored at 4℃ for 24h.

**Keywords:** COVID-19; heat-inactivation; throat swab samples; extracted nucleic acid; 4℃ storage

基金项目: 深圳市三名工程项目 (SZSM201812088)。

作者简介: 喻晶 (1967-), 女, 医学硕士, 主任技师, 主要从事临床分子生物学研究, E-mail: jing\_yu2004@aliyun.com。

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 自从 2019 年 12 月首次在湖北武汉发现以来, 短时间内在武汉暴发流行并蔓延至全国, 严重危害人民的生命健康, 影响人们的生活方式, 此病毒对人的传染性强, 目前尚无特效治疗, 最有效的方式是早发现、早隔离, 早治疗、尽早阻断传染源<sup>[1]</sup>。新冠病毒核酸检测可以为新型冠状病毒肺炎的早期诊断提供直接的实验室证据, 也是目前最新诊疗方案 (试行第八版) 中 COVID-19 的确诊依据<sup>[2]</sup>。由于此病毒传染性极强, 使实验室检测人员处于极大的感染风险中, 根据第五版新型冠状病毒肺炎防控方案<sup>[3]</sup>, 该病毒对热敏感, 56℃ 30 min 可有效灭活病毒, 本实验室在核酸检测前会对样本进行 56℃ 30min 热灭活处理。目前对热灭活后的新冠样本和提取核酸在 4℃ 保存的稳定性, 其对检测结果的影响尚未见报道, 样本保存是保证检验质量的重要环节, 直接影响检测的结果, 本研究把热灭活后的样本及提取的核酸保存在 4℃, 分别于 24, 48, 72 和 96h 再次检测样本及提取核酸中 SARS-CoV-2 核酸的含量 (*Ct* 值), 分析热灭活后样本和核酸在 4℃ 保存的稳定性, 为样本的合理保存提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2020 年 2 月 5 日在本院发热门诊就诊的 1 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性患者的咽拭子样本, 样本保存在 Hanks 液 (广州邦硕生物技术有限公司)。该患者为武汉人, 发热、咳嗽、肺部 CT 表现为病毒性肺炎, 最终诊断为新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)。

1.2 仪器与试剂 全自动核酸提取仪 (Stream SP96, 中山大学达安基因股份有限公司), 荧光定量 PCR 扩增仪 (ABI 7500, 美国 Thermofisher)。恒温水浴箱 (ED-19, 德国 JULABO), 核酸提取试剂盒及新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒均为中山大学达安基因股份有限公司产品。咽拭子

采样管和保存液为广州邦硕生物技术有限公司产品。

## 1.3 方法

1.3.1 核酸提取: COVID-19 患者咽拭子样本先采用 56℃ 水浴 30min 灭活病毒, 振荡混匀后取 200 μl 样本加入核酸提取试剂板, 按照说明书要求提取样本的核酸, 然后进行检测。将原始咽拭子样本和提取的核酸保存在 4℃ 冰箱, 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次对其进行 SARS-CoV-2 核酸 ORF1ab 和 N 基因检测。

1.3.2 基因扩增: 采用 RT-PCR 荧光定量 PCR 技术, 检测新型冠状病毒 ORF1ab 基因和 N 基因, 每管为 25 μl 反应体系, 其中 PCR 反应液体系 20 μl, 样本核酸或阴阳对照品 5 μl, 混匀后, 按下面程序在荧光 PCR 扩增仪中扩增: 50℃ 15 min, 95℃ 15 min, 94℃ 15 s, 55℃ 45 s, 共 45 个循环, 荧光收集在 55℃ 45 s。每次扩增时设置空白和阴阳性对照。以循环阈值 (cycle threshold, *Ct* 值) 来进行核酸检测差异的比较。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 采用 *t* 检验比较两组数据的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 咽拭子样本 4℃ 保存的稳定性分析 咽拭子样本检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性, *Ct* 值分别为 31.27 和 30.64, 咽拭子样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因, 结果见表 1。4℃ 保存 24h, 咽拭子检测结果与原始结果差异不大, ORF1ab 和 N 基因的  $\Delta Ct$  分别为 0.14 和 0.04 (偏倚均小于 1%), 但是 4℃ 保存 48, 72 和 96h 后, ORF1ab 和 N 基因的  $\Delta Ct$  明显增大, 4℃ 保存 48~72h, ORF1ab 基因核酸降解了大概 7 倍, N 基因降解了大概 11 倍, 4℃ 保存 96h, ORF1ab 和 N 基因核酸分别降解了 30.91 倍和 666.29 倍。

表 1 咽拭子样本 4℃ 保存不同时间的检测结果

保存时间 (h)	ORF1ab 基因 ( <i>Ct</i> 值)	$\Delta Ct$	降解倍数	偏倚 (%)	N 基因 ( <i>Ct</i> 值)	$\Delta Ct$	降解倍数	偏倚 (%)
0	31.27				30.64			
24	31.41	0.14	1.10	0.45	30.68	0.04	1.03	0.13
48	34.13	2.86	7.26	9.11	34.28	3.64	12.47	11.86
72	34.06	2.79	6.92	8.17	34.11	3.47	11.08	10.12
96	36.22	4.95	30.91	14.53	40.02	9.38	666.29	27.50

2.2 核酸样本 4℃ 保存的稳定性分析 核酸样本检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性, *Ct* 值分别为 31.27 和 30.64, 提取的核酸样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因, 结果见

表 2。核酸 4℃ 保存 24, 48, 72h 和 96h 后, 其检测结果与原始结果 *Ct* 值差异不大 (均在  $\pm 1$  以内, 偏倚均小于 3%), 表明核酸 4℃ 保存 24~96h 后, 无明显降解。



表2 提取的核酸4℃保存不同时间的检测结果

保存时间 (h)	ORF1ab 基因 (Ct 值)	$\Delta Ct$	降解倍数	偏倚 (%)	N 基因 (Ct 值)	Ct	降解倍数	偏倚 (%)
0	31.27				30.64			
24	31.64	0.37	1.29	1.18	30.06	-0.58	0.67	-1.89
48	31.62	0.35	1.27	1.11	29.95	-0.69	0.62	-2.30
72	31.72	0.45	1.37	1.42	29.75	-0.89	0.54	-2.97
96	31.36	0.09	1.06	0.28	30.09	-0.55	0.68	-1.85

2.3 咽拭子样本和提取核酸4℃保存不同时间结果  
 比对 采用  $t$  检验比较咽拭子和核酸4℃保存0, 24, 48, 72 和 96h 后, ORF1ab 和 N 基因检测的结果, 均具有显著性差异 ( $t_{\text{ORF1ab}}=2.023, P=0.039$ ;  $t_N=2.239, P=0.028$ )。核酸4℃保存24~96h 的稳定性更好。

### 3 讨论

新型冠状病毒为单链 RNA 病毒, 是一种新型  $\beta$  属冠状病毒, 基因特征与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 有明显区别<sup>[2]</sup>, 其传染性强, 人群普遍易感, 自2019年12月在武汉发现以来, COVID-19 的病例数快速上升, 引起了世界范围的关注, 给全球带来巨大挑战<sup>[4]</sup>。SARS-CoV-2 核酸检测可以为 COVID-19 的诊断提供确诊依据<sup>[2]</sup>, 但是由此病毒在检测过程中对人体的致病力和危害程度尚未明确, 使检测人员处于极大的感染风险中。根据最新的专家共识<sup>[5]</sup>, SARS-CoV-2 对热敏感, 56℃ 30 min 可有效灭活病毒, 实验室在检测前对病人样本进行热灭活处理, 降低检测中的感染风险。目前对热灭活后的样本和提取的核酸样本在4℃保存的稳定性尚未见报道, 本研究主要分析热灭活后样本和提取核酸在4℃保存24~96h 后的稳定性, 为制定合理的样本保存温度和时间提供实验室依据。

本研究发现保存在 hanks 液中的咽拭子样本, 在4℃保存24h, 其核酸无明显降解, 但是在4℃保存48~72h 后, 其核酸出现明显降解, 其中 N 基因降解比 ORF1ab 基因降解更明显 (11~12 倍 vs 7-8 倍), 样本4℃保存96h 后, 核酸降解更加明显, 其中 ORF1ab 基因降解30 倍, N 基因降解666 倍, 其 Ct 值为40.02, 处于检测的临界值。有趣的是, 我们发现提取的核酸样本4℃保存24~96h 后, 核酸无明显降解, 其  $\Delta Ct$  均在  $\pm 1$  以内, 偏倚均小于3%。核酸4℃保存的稳定性明显比咽拭子样本好, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。我们把核酸样本在4℃保存2 周, 再次检测发现核酸仍然无明显降解 (结果未显示), SARS-CoV-2 的 RNA 为什么会这么稳定? 这个问题值得我们进一步探讨。有研究表明<sup>[6]</sup>, COVID-19 非常稳定, 可在气溶胶中和物体表面上保持稳定数小时至数天的时间。

本研究的局限性在于: ①受阳性样本例数的限

制, 本研究的阳性样本的例数太少, 最好对处于高中低不同 Ct 值范围的阳性样本进行验证。②未对保存在不同类型保存液中的咽拭子阳性样本进行验证, 不同类型的保存液是否存在差异? ③本研究只采用了一家公司的试剂, 本文的结果是否适合于其他公司的试剂, 有待进一步验证。

### 参考文献:

- [1] LI Qun, GUAN Xuhua, WU Peng, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia(Review)[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(13):1199-1207.
- [2] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第八版) [EB/OL]. (2020-08-18) [2020-08-18]. <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-08/19/5535757/files/da89edf7cc9244fbb34ecf6c61df40bf.pdf>.
- [3] General Office for National Health Commission and National Administration of Traditional Chinese Medicine. Novel coronavirus pneumonia diagnosis and treatment plan (Trial Version 8) [EB/OL]. (2020-08-18) [2020-08-18]. <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-08/19/5535757/files/da89edf7cc9244fbb34ecf6c61df40bf.pdf>.
- [4] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒肺炎防控方案 (第五版) [EB/OL]. (2020-02-21) [2020-02-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/a5d6f7b8c48c451c87dba14889b30147/files/3514cb996ae24e2faf65953b4ecd0df4.pdf>.
- [5] General Office for National Health Commission. Prevention and control plan of COVID-19 (5th edition) [EB/OL]. (2020-02-21) [2020-02-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/a5d6f7b8c48c451c87dba14889b30147/files/3514cb996ae24e2faf65953b4ecd0df4.pdf>.
- [6] WANG Chen, HORBY P W, HAYDEN F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. Lancet, 2020, 395 (10223):470-473.
- [7] 中华医学会检验医学分会. 2019 新型冠状病毒核酸检测专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2020, 100(13):968-973.
- [8] Chinese Medical Association Laboratory Medicine Branch. Expert consensus on nucleic acid detection of COVID-19 [J]. Chinese Medical Journal, 2020, 100(13):968-973.
- [9] VAN DOREMALEN N, BUSHMAKER T, MORRIS D H, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1 (Letter) [J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(16):1564-1567.

收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2020-09-05

## miR-29b 对缺血损伤心肌细胞模型的自噬影响及分子机制研究

张 蕾<sup>1</sup>, 王 诚<sup>2</sup>(1. 陇县人民医院心血管内科, 陕西宝鸡 721200; 2. 宁强县天津医院心内科, 陕西宁强 724400)

**摘要:** **目的** 探讨与研究微RNA-29b (miR-29b) 对缺血损伤心肌细胞模型自噬的影响及分子机制。**方法** 将已经建立缺氧/复氧模型的心肌细胞系(H9C2)随机分为三组:空白组、对照组与实验组,以 life2000<sup>TM</sup> 为载体体外转染磷酸盐缓冲液(PBS), miRNA 对照质粒(miR-NC)与 miR-29b, 检测细胞自噬、增殖水平与氧化自由基等表达变化情况。**结果** 细胞转染后 24h 与 36h, 三组 miR-29b mRNA 表达水平, 细胞增殖指数相比差异有统计学意义( $F=9.284\sim81.871$ , 均  $P<0.05$ ), 其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 空白组与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。细胞转染后 24h 与 36h, 三组 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD 活力, MDA 含量相比差异具有统计学意义( $F=9.133\sim15.693$ , 均  $P<0.05$ ), 其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 空白组与对照组对比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** miR-29b 能通过正向调节 HIF-1 $\alpha$  和 LC-3 的相对表达量来提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 从而促进细胞自噬, 发挥对缺血损伤心肌细胞的保护作用。

**关键词:** miR-29b; 缺血再灌注损伤; 心肌细胞; 细胞自噬

**中图分类号:** R541; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-135-05

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.033

### Effects of miR-29b on Autophagy in Ischemic Myocardial Cells Models and Its Molecular Mechanism

ZHANG Lei<sup>1</sup>, WANG Cheng<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Longxian People's Hospital, Shaanxi Longxian 721200, China; 2. Department of Cardiology, Tianjin Hospital of Ningqiang County, Shaanxi Ningqiang 724400, China)

**Abstract:** **Objective** To explore and study the effect and molecular mechanism of miR-29b on autophagy in ischemic myocardial cells models. **Methods** The myocardial cell line (H9C2) with established hypoxia / reoxygenation model were randomly divided into three groups-blank group, control group and experimental group, and were transfected with PBS, miR-NC and miR-29b mimic in vitro by the life 2000<sup>TM</sup>. The changes of cell autophagy, proliferation level and expression of oxidative free radicals were detected. **Results** There were statistically significant differences in miR-29b mRNA expression level and cell proliferation index between the three groups 24h and 36h after cell transfection ( $F=9.284\sim81.871$ , all  $P<0.05$ ). There were statistically significant differences between the experimental group and the blank group and the control group ( $P<0.05$ ), while there were no statistically significant differences between the blank group and the control group ( $P>0.05$ ). At 24h and 36h after transfection, HIF-1, LC-3 protein expression level, SOD activity and MDA content in the three groups were significantly different ( $F=9.133\sim15.693$ , all  $P<0.05$ ). The differences between the experimental group and the blank group and the control group were statistically significant ( $P<0.05$ ), while the differences between the blank group and the control group were not statistically significant ( $P>0.05$ ). **Conclusion** MiR-29b can increase the SOD activity and decrease the MDA content by positively regulate the relative transcript level of HIF-1 $\alpha$  and LC-3, thereby promoting cell autophagy and protecting the ischemic myocardial cells.

**Keywords:** miR-29b; ischemia-reperfusion injury; cardiomyocytes; cell autophagy

心肌缺血再灌注损伤为常见的心血管病, 为心肌组织缺血导致局部心肌损伤, 由于机体自身的代偿机制实现缺血区域的再灌注, 从而导致组织器官的进一步损伤<sup>[1-2]</sup>。该病的发生机制还不明确, 涉及到免疫炎症损伤、线粒体损伤、细胞凋亡、氧化应激损伤、兴奋性氨基酸毒性等多种机制<sup>[3-4]</sup>。细

胞自噬是指受损细胞器、错误折叠蛋白质产生的废弃物被自噬小体包裹起来, 并运送到溶酶体中进行消化与降解。当细胞受到外界刺激处于应激状态时, 自噬流被激活, 可引起细胞内环境稳态紊乱, 从而诱发心血管疾病的发生。微 RNAs (microRNAs, miRNAs) 在机体心血管疾病中有特定的表达谱,

**作者简介:** 张蕾 (1975-), 女, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病, E-mail: lxrmyynw@163.com。

**通讯作者:** 王诚 (1968-), 男, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 心血管内科, E-mail: 15891061658@163.com。

大鼠大脑中动脉栓塞模型中有上百个 miRNAs 异常表达,说明 miRNA 与心肌缺血再灌注损伤密切相关<sup>[5]</sup>。微 RNA-29b(microRNA-29b, miR-29b)是一个与胚胎心血管系统的发育生长密切相关的 miRNA,在心肌梗死大鼠中表达下降并可调节缺血性心肌损伤<sup>[6]</sup>。因此,本文探讨与研究了 miR-29b 对缺血损伤心肌细胞模型自噬的影响及分子机制,旨在为缺血损伤心肌损伤的预防治疗提供新的途径和靶点。

## 1 材料与方法

1.1 实验细胞 研究时间为 2019 年 1~2019 年 12 月,心肌细胞系(H9C2)购自中国医学科学院基础医学研究所,在温度为 37℃,5% (v/v) CO<sub>2</sub>,湿润的细胞培养箱中孵育。

1.2 仪器与试剂 培养基为含 10ml/dl 胎牛血清(中国康源生物公司)的 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶购于美国 Millipore 公司;酶标仪购自美国 BD 公司;蛋白杂交与凝胶成像系统购自美国 Bio-rad 公司;蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所;兔抗  $\beta$ -actin, 乏氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ), 微管相关轻链蛋白-3(microtubule associated protein light chain3, LC-3) 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)与丙二醛(malondialdehyde, MAD)检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;miR-29b 与 miR-NC 购自上海吉玛生物技术有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 缺血损伤心肌细胞建立与分组:所有 H9C2 细胞先用 PBS(Gibco 公司)清洗细胞 2 次,加入用 95% (v/v) N<sub>2</sub>+5% (v/v) CO<sub>2</sub> 置换 30min 的无糖 DMEM,置于 37℃, 94%N<sub>2</sub>+1% (v/v) O<sub>2</sub>+5% (v/v) CO<sub>2</sub> 低氧培养箱中缺氧培养 8h,然后放入 37℃, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 细胞培养箱给予复氧 24h。将已经建立缺氧/复氧模型的 H9C2 细胞随机分为三组:空白组、对照组与实验组。

1.3.2 细胞转染方法:待细胞贴壁生长融合度达 80%~90% 时,空白组、对照组与实验组以

life2000™ 为载体体外转染 PBS, miR-NC 与 miR-29b 等,转染后终浓度均为 50nmol/L/孔,转染后 4~6h 换液。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测方法:收集心肌细胞用 Trizol 提取总 RNA,逆转录后采用 SYBR-Green 染料法进行定量 PCR,反应条件为:95℃ 2min; 95℃ 15s, 60℃ 32s, 40 个循环,检测结果以 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  值进行。

1.3.4 Western blot 检测方法:细胞收集后用 PBS 洗涤 2 次,加入 RIPA buffer 裂解细胞,蛋白样品定量后,于 10g/dl SDS-PAGE 上进行分离,并电转至 PVDF 膜上,采用 5g/dl 脱脂奶粉封闭过夜,加入稀释到合适浓度的一抗,4℃孵育过夜,清洗后加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗,37℃孵育 2h,清洗后采用化学发光检测底物,显影检测。

1.3.5 细胞增殖检测:将细胞消化后配成单个细胞悬液,调整好活细胞的浓度接种到 96 孔板,培养 24h 后每孔加入 100  $\mu$ l 不同浓度的样品,培养特定的时间以后,每孔加 MTT 溶液 20  $\mu$ l,继续孵育 4h 后吸弃上清液,每孔加 150  $\mu$ l DMSO,振荡培养 10min,选择 490nm 波长,在酶标仪上测定吸光度,计算细胞增殖指数。

1.3.6 SOD 活力与 MDA 含量检测:取细胞上清,采用酶联免疫法检测 SOD 活力与 MDA 含量。上述实验都重复 3 次,取平均值。

1.4 统计学分析 选择 SPSS20.00 软件对本研究所有数据进行分析,数据录入和处理均按照各个实验设计要求,符合正态分布的计量数据使用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两两对比采用 *t* 检验,多组间对比采用单因素方差分析等,非正态分布数据采用非参数检验方法,检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 miR-29b mRNA 表达及细胞增殖水平对比 见表 1。细胞转染后 24h 与 36h,三组 miR-29b mRNA 表达水平、细胞增殖指数相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),空白组与对照组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 转染后不同时间点 miR-29b mRNA 表达及细胞增殖指数水平对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标		实验组	对照组	空白组	<i>F</i>	<i>P</i>
miR-29b mRNA 表达水平	24 h	56.33 $\pm$ 10.11*	0.92 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.11	45.284	0.000
	36 h	78.34 $\pm$ 10.09 *	0.93 $\pm$ 0.12	0.96 $\pm$ 0.18	59.882	0.000
细胞增殖指数	24 h	1.33 $\pm$ 0.11	3.45 $\pm$ 0.13	3.44 $\pm$ 0.21	9.284	0.001
	36 h	1.34 $\pm$ 0.09	3.44 $\pm$ 0.12	3.48 $\pm$ 0.18	81.871	0.000

注: \*miR-29b mRNA 表达水平 24h vs 36h,  $t=59.566$ ,  $P=0.000$ , 差异有统计学意义。

2.2 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD, MDA 水平对比 见表 2。细胞转染后 24h 与 36h,

三组 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD 活力、MDA 含量相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),



其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表2 转染后不同时间点 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD, MDA 水平对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标		实验组	对照组	空白组	F	P
HIF-1 $\alpha$	24 h	4.54 $\pm$ 0.33*	1.09 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.09	13.493	0.000
	36 h	5.72 $\pm$ 0.44*	1.34 $\pm$ 0.16	1.21 $\pm$ 0.11	12.898	0.000
LC-3	24 h	4.51 $\pm$ 0.25 *	1.11 $\pm$ 0.17	1.13 $\pm$ 0.09	12.223	0.000
	36 h	5.70 $\pm$ 0.32*	1.37 $\pm$ 0.18	1.32 $\pm$ 0.09	15.693	0.000
SOD(U/mg)	24h	8.24 $\pm$ 0.66	2.33 $\pm$ 0.19	2.33 $\pm$ 0.11	9.133	0.001
	36h	8.56 $\pm$ 0.51	2.49 $\pm$ 0.18	2.28 $\pm$ 0.09	9.672	0.000
MDA( $\mu$ mol/g)	24h	44.59 $\pm$ 4.10	79.87 $\pm$ 3.17	80.22 $\pm$ 6.28	12.482	0.000
	36h	44.09 $\pm$ 4.41	80.09 $\pm$ 3.19	80.98 $\pm$ 5.67	10.093	0.000

注: \*HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量 24h vs 36h,  $t=7.048, 10.306, P=0.02, 0.009$ , 差异有统计学意义。

### 3 讨论

心血管疾病是严重危害人体健康的主要疾病之一, 具有死亡率高、发病危急、起病重和预后差等特点, 其中心肌缺血/再灌注损伤为主要的血管疾病<sup>[7]</sup>。当机体的心肌组织受到缺血等刺激时, 可启动内源性抗氧化与抗缺血机制, 保护濒临死亡的心肌细胞, 促进心功能的恢复<sup>[8]</sup>。而在缺血再灌注过程中, 损伤机制占绝对优势, 保护性介质水平与持续作用时间有限, 从而造成心肌组织的继发性损伤<sup>[9]</sup>。miRNAs 是一类长度约为 23nt 的保守的小 RNA, 能够在转录后水平调控基因的表达, 从而参与细胞生长、增殖、凋亡、分化的调控。miR-29b 定位于染色体 1q32.2, 是在心肌缺血再灌注损伤中出现明显上调表达的 miRNA 之一, 在成肌细胞的增殖和分化的调节过程中起着中心作用, 也可由各种各样的转录调节者和信号通路所调节<sup>[10-11]</sup>。有研究显示<sup>[12]</sup>, miR-29b 的过表达对心肌细胞具有保护作用, 而低表达更易导致心血管损伤。

本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 miR-29b mRNA 表达水平显著高于空白组与对照组, 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 SOD 活力显著高于对照组与空白组 ( $P < 0.05$ ), MDA 含量显著低于对照组与空白组 ( $P < 0.05$ ), 对照组与空白组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。SOD 活力增加不但能显著减轻心肌组织损害程度, 而且也具有重要的预防性脑保护作用, 以及改善相关并发症<sup>[13]</sup>。而 MDA 是细胞膜脂质被活性氧化后的副产物, MDA 含量降低可使得机体氧化应激损伤作用减少; 而提高 miR-29b 表达能清除心肌缺血再灌注损伤所产生的氧化应激产物, 并提高抗氧化酶活性<sup>[14]</sup>。高英英<sup>[15]</sup>的研究显示, miR-29b 表达上调可减少缺血再灌注损伤引起的心肌细胞凋亡, 与本研究结果一

致。miRNAs 通过 RNA 诱导的沉默复合体来调节靶基因的降解和/或翻译抑制。目前认为 miRNAs 直接调控哺乳动物基因组中 1/3 以上基因的表达, 特别是 miRNAs 的异常表达与心血管病的发生发展密切相关<sup>[16]</sup>。本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的细胞增殖指数显著低于空白组与对照组 ( $P < 0.05$ ), 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明促进 miR-29b 的表达能促进心肌细胞增殖。

氧化应激是心肌缺血再灌注损伤的最主要因素, 过度累积的氧自由基还可增加细胞通透性, 引起钙离子内流发生交换障碍, 诱发心律失常的发生。HIF-1 $\alpha$  是缺氧诱导因子家族的一员, 在缺氧时上调表达以适应缺氧环境<sup>[17-18]</sup>。正常的心脏组织保留着低水平的自噬, 保障细胞的能量与物质代谢。在心肌缺血再灌注过程中, 自噬可导致心肌细胞降解过度, 加重心肌损伤。过度激活的自噬流可加快心肌细胞的死亡, 如何控制细胞自噬处于平衡的状态, 使其向着保护心肌细胞的方向发展具有重要价值<sup>[19-20]</sup>。本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白相对表达量显著高于空白组与对照组  $P < 0.05$ , 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明 miR-29b 的过表达可以调控 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白的相对表达, 从而影响心肌细胞的自噬与氧化应激水平。不过本研究没有明确 miR-29b 的直接作用靶基因, 对信号通路的调控分析还不够深入, 下一步的实验将着重于相关信号通路分析。

总之, miR-29b 能通过正向调节 HIF-1 $\alpha$ , LC-3 蛋白的相对表达量来提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 从而促进细胞自噬, 发挥对缺血损伤心肌细胞的保护作用。

## 参考文献:

- [1] 刘叶, 潘玥, 郑魏, 等. miR-186-5p 在酒精诱导的心肌细胞中高表达并通过靶基因 XIAP 调控细胞凋亡水平 [J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(5): 53-62.  
LIU Ye, PAN Yue, ZHENG Wei, et al. MiR-186-5p is expressed highly in ethanol-induced cardiomyocytes and regulates apoptosis by target gene XIAP[J]. China Biotechnology, 2019, 39(5): 53-62.
- [2] 付勇, 毛亮, 李妙龄, 等. miR-1 调控靶基因 HCN4 在风湿性心脏病心房颤动中的作用 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(15): 2419-2423.  
FU Yong, MAO Liang, LI Miaoling, et al. Mechanism of miR-1 regulation target genes HCN4 in atrial fibrillation of rheumatic heart disease patients[J]. The Journal of Practical Medicine, 2019, 35(15): 2419-2423.
- [3] 周咏梅, 舒燕, 唐艺加, 等. microRNA-423-5p 调节 PI3K/AKT 通路在大鼠心力衰竭进展中的作用探究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(2): 128-133.  
ZHOU Yongmei, SHU Yan, TANG Yijia, et al. Study of the effect and mechanism of microRNA - 423 - 5p in heart failure through regulation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 18(2): 128-133.
- [4] 于慧, 杨晓敏, 屈双丽, 等. miR-139-3p 在低氧诱导凋亡的心肌细胞中的表达及其作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 667-672.  
YU Hui, YANG Xiaomin, QU Shuangli, et al. Expression and effect of miR-139-3p in apoptotic neonatal rat cardiomyocytes induced by hypoxia[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(4): 667-672.
- [5] 郑常龙, 符永玫, 詹浩洪, 等. miR-124 过表达对肺动脉高压大鼠右心重构的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1594-1599.  
ZHENG Changlong, FU Yongmei, ZHAN Hao-hong, et al. Effects of miR-124 over-expression on right ventricular remodeling in rats with pulmonary hypertension [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(9): 1594-1599.
- [6] WANG Tingxia, LI Yun, CHEN Juan, et al. TGF- $\beta$  1/Smad3 signaling promotes collagen synthesis in pulmonary artery smooth muscle by down-regulating miR-29b[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018, 11(12): 5592-5601.
- [7] 翁震, 何杨. 外泌体蛋白质组学分析在心血管疾病中应用的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4): 157-159.  
WENG Zhen, HE Yang. Research progress of proteomic analysis of exosomes and its application in cardiovascular disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4): 157-159.
- [8] 伍斌, 王军奎. 微 RNA 与急性心肌梗死关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(13): 2579-2582, 2587.  
WU Bin, WANG Junkui. Research progress in relationship between miRNA and acute myocardial infarction[J]. Medical Recapitulate, 2019, 25(13): 2579-2582, 2587.
- [9] 陈旭翔, 侯婧瑛, 龙会宝, 等. ELA/APJ 通过上调 miR-133a 抑制心肌细胞在缺血缺氧条件下凋亡的机制研究 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(15): 12-17, 封 3.  
CHEN Xuxiang, HOU Jingying, LONG Huibao, et al. Research on the mechanism of ELA/APJ inhibiting the apoptosis of cardiomyocyte under the condition of ischemia and hypoxia by up-regulating miR-133a[J]. China Medical Journal, 2019, 16(15): 12-17, Sealing 3.
- [10] 张苗苗, 毛雯, 仝其广, 等. 缺血后适应对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(7): 616-620.  
ZHANG Miaomiao, MAO Wen, TONG Qiguang, et al. Protective effect and mechanism of ischemic postconditioning in rats underwent myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2016, 44(7): 616-620.
- [11] 贾红梅. 微小 RNA-21/29a 和 D-二聚体对心肌缺血再灌注的诊断价值研究 [J]. 中国医师进修杂志, 2020, 43(5): 415-417.  
JIA Hongmei. Diagnosis value of microRNA-21/29a and D-dimer in myocardial ischemia-reperfusion [J]. Chinese Journal of Advanced Medical Practitioners, 2020, 43(5): 415-417.
- [12] ZHONG Fengying, HUANG Ting, LENG Jingxing. Serum miR-29b as a novel biomarker for glioblastoma diagnosis and prognosis.[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2019, 12(11): 4106-4112.
- [13] 李静, 武敏, 朱海慧, 等. miR-204 改善心肌缺血再灌注大鼠炎症及氧化应激 [J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(5): 414-421.  
LI Jing, WU Min, ZHU Haihui, et al. MiR-204 improves inflammation and oxidative stress in rats with myocardial ischemia-reperfusion[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2019, 16(5): 414-421.
- [14] 刘超群, 张新生, 许何丽, 等. 阿霉素对 H9C2 心肌细胞活力和 miRNA 表达水平影响 [J]. 社区医学杂志, 2019, 17(8): 450-452.  
LIU Chaoqun, ZHANG Xinsheng, XU Heli, et al. Effect of doxorubicin on viability and miRNA expression of H9C2 cardiomyocyte [J]. Journal of Community Medicine, 2019, 17(8): 450-452.
- [15] 高英英. 微 RNA-29b 在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制研究 [J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2463-2467, 后插 2 页.  
GAO Yingying. The role and mechanism of miR-29b in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2019, 23(12): 2463-2467, Insert 2 pages later.
- [16] 李家睿, 闫波. 抑制 LncRNA MALAT1 靶向促进 miR-200 a 表达减少心肌细胞凋亡 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(18): 4527-4530.  
LI Jiarui, YAN Bo. Inhibiting LncRNA MALAT1 targeting promoting the expression of miR-200 a and reducing cardiomyocyte apoptosis[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2019, 39(18): 4527-4530.
- [17] 王少霞. 长链非编码 RNA H19 靶向 miR-194-5p 抑制 LPS 诱导心肌细胞炎症反应 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(19): 4839-4842.

# 盐酸普萘洛尔对十二指肠溃疡模型大鼠的作用及其机制的实验研究

舒俊伟, 牛智平, 杜嘉原 (安康市人民医院普外科, 陕西安康 725000)

**摘要:** **目的** 探究盐酸普萘洛尔对十二指肠溃疡 (duodenal ulcer, DU) 大鼠的保护作用及其机制。**方法** 35只大鼠随机分为对照组、十二指肠溃疡模型组、低剂量盐酸普萘洛尔组、中剂量盐酸普萘洛尔组和高剂量盐酸普萘洛尔组, 每组7只。采用半胱胺构建DU大鼠模型, 采用Western Blot法测定蛋白浓度, 采用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin, HE) 评估各组大鼠的十二指肠黏膜损伤程度。分别比较各组间大鼠十二指肠中蛋白激酶B (protein kinase B, Akt), 胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) 和PTEN基因 (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 的表达, 黏膜的损伤程度, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平。**结果** 与对照组相比, 模型组Akt, PTEN和IGF-1的蛋白相对表达量显著降低。与模型组相比, 不同剂量盐酸普萘洛尔组Akt, PTEN和IGF-1的蛋白相对表达量显著升高, 其差异均具有统计学意义 ( $F=10.319$ ,  $P<0.01$ )。模型组的黏膜损伤程度显著高于对照组, 低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的十二指肠黏膜损伤程度均显著低于模型组, 其差异具有统计学意义 ( $F=3.703$ ,  $P=0.025$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的SOD水平均高于模型组, 高剂量组与模型组的差异具有统计学意义 ( $F=58.843$ ,  $P=0.000$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的GSH-Px水平均高于模型组, 高剂量组与模型组的差异具有统计学意义 ( $F=8.026$ ,  $P=0.001$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的MDA水平均低于模型组, 其差异无统计学意义 ( $F=14.519$ ,  $P=0.479$ )。**结论** 盐酸普萘洛尔通过IGF-1/PTEN/Akt信号通路对DU大鼠发挥保护作用, 并且其作用可能与抗氧化有关。

**关键词:** 盐酸普萘洛尔; 十二指肠溃疡; 半胱胺; IGF-1/PTEN/Akt信号通路

**中图分类号:** R332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-139-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.034

## Effects of Propranolol Hydrochloride on Duodenal Ulcer Rats and Its Mechanism

SHU Jun-wei, NIU Zhi-ping, DU Jia-yuan

(Department of General Surgery, Ankang People's Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between propranolol hydrochloride and duodenal ulcer (DU) in rats and its mechanism. **Methods** Thirty-five rats were randomly divided into the control group, the duodenal ulcer model group, the low-dose propranolol hydrochloride group, the middle-dose propranolol hydrochloride group and the high-dose propranolol hydrochloride group, with 7 rats in each group. Cysteamine was used to construct the DU model in rats, using Western Blot method for the determination of protein concentration, using Hematoxylin-eosin (HE) staining to evaluate each degree of duodenal mucosa damage in rats, respectively in the comparison between groups of rats duodenal protein kinase B (Akt), insulin growth factor-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) and the expression of gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (PTEN), mucosal damage degree and levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) have also been detected. **Results** The relative expression levels of Akt, PTEN and IGF-1 in the model group were significantly lower than those in the control group. Compared with the model group, the relative expression levels of Akt, PTEN and IGF-1 in the propranolol hydrochloride group with different doses were significantly increased, and the difference was statistically significant ( $F=10.319$ ,  $P<0.01$ ). The degree of mucosal injury in the model group was significantly higher than that in the control group, and the degree of duodenal mucosal injury in the neutral and high-dose propranolol hydrochloride group was significantly lower than that in the model group, and the difference was statistically significant ( $F=3.703$ ,  $P=0.025$ ). SOD levels of rats in the low and medium dose propranolol hydrochloride group were higher than those in the model group, and the difference between the high dose group and the model group was statistically significant ( $F=58.843$ ,  $P=0.000$ ). The GSH-Px level of rats in the low and medium dose propranolol hydrochloride group was higher than that in the

**作者简介:** 舒俊伟 (1983-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 微创技术在普外科的应用, E-mail: anwangfut@163.com。

**通讯作者:** 杜嘉原 (1982-), 男, 硕士, 主治医师, E-mail: 910932016@qq.com。



model group, the difference between the high dose group and the model group was statistically significant ( $F=8.026$ ,  $P=0.001$ ), and the MDA level of rats in the low and medium dose propranolol hydrochloride group was lower than that in the model group, the difference was not statistically significant ( $F=14.519$ ,  $P=0.479$ ). **Conclusion** Propranolol hydrochloride plays a protective role in duodenal ulcer rats through IGF-1/PTEN/Akt signaling pathway, and its effect may be related to oxidation resistance.

**Keywords:** propranolol hydrochloride; duodenal ulcer; cysteamine; IGF-1/PTEN/Akt signaling pathway

十二指肠溃疡 (duodenal ulcer, DU) 是一种消化系统多发病, 其病程较长且易反复发作, 严重影响患者日常生活。现代医学认为, DU 是侵袭力 (包括胃酸分泌过多和氧化压力过高) 高于防御力时导致十二指肠黏膜受损形成的溃疡<sup>[1-2]</sup>。目前 DU 治疗方法主要有非手术治疗和外科手术治疗两种, 但由于对 DU 的病因、发病机制缺乏认知, 在临床实践中常存在治疗效果不佳等问题。早期已有研究指出维拉帕米 (Verapamil, VR) 对半胱胺诱导的 DU 大鼠具有保护作用<sup>[3]</sup>, VR 和盐酸普萘洛尔均可在临床上用于心律失常和心绞痛等疾病的治疗。但是关于盐酸普萘洛尔在 DU 中应用的报道鲜有。盐酸普萘洛尔是非选择性  $\beta$ -肾上腺素能受体的抑制剂, 其具有阻断血管生成过程和诱导微血管内皮细胞凋亡等作用<sup>[4-5]</sup>。本研究选取经典的半胱胺致 DU 大鼠模型, 探究盐酸普萘洛尔对 DU 大鼠十二指肠黏膜的保护作用及其对抗氧化酶和 IGF-1/PTEN/Akt 信号通路的影响, 以期为临床诊疗提供新思路, 现具体报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 35 只, SPF 级, 雌雄各半, 体重为  $210 \pm 10$  g, 均购于西安交通大学医学院实验动物中心。大鼠适应 7 天后开始实验。饲养房湿度控制在 50% ~ 70%, 温度控制在 20 ~ 25℃, 噪音控制在 60 dB 以下。饲料为 60℃灭菌后的全营养饲料, 12 h 明暗交替循环照明。

1.2 仪器与试剂 显微镜购于尼康仪器 (上海) 有限公司, 盐酸普萘洛尔片购于山东健康药业有限公司, 半胱胺购自德国 Merck 公司。丙二醛 (malonaldehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、胰岛素样生长因子 -1 (insulin-like growth factors -1, IGF-1)、PTEN 基因 (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN) 和  $\alpha$ -tubulin 一抗及相应的二抗均购自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。

1.3 方法 实验分组与建模: 大鼠随机分为 5 组, 每组 7 只, 分别为对照组、十二指肠溃疡模型组 (模型组)、低剂量组 (模型组 +1 mg/kg 盐酸普萘洛尔)、中剂量组 (模型组 +3 mg/kg 盐酸普萘洛尔) 和高

剂量组 (模型组 +9 mg/kg 盐酸普萘洛尔), 其中对照组大鼠灌胃给予 1 ml/kg 生理盐水, 模型组大鼠灌胃给予 450 mg/kg 半胱胺, 低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠先用相应浓度的盐酸普萘洛尔预处理, 再灌胃给予 450 mg/kg 半胱胺<sup>[6]</sup>。24 h 后用脱颈法处死实验大鼠, 剖腹取出十二指肠, 观察其损伤情况并且对其进行检测分析。

Western Blot 检测: 分别取各组大鼠约 0.1 g 的组织并置于研钵中, 加入液氮快速充分研磨, 再加入裂解液, 用蛋白定量试剂盒定量测定蛋白浓度。取 50~100  $\mu$ g 总蛋白, 与上样缓冲液混合均匀 ( $\times 5$ ), 在沸水浴中加热 5 min, 使蛋白充分变性后上样。采用聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳 (分离胶 120V 和浓缩胶 80V), 转膜 2 h。用 TBST 配制含 5 g/dl 脱脂奶粉封闭缓冲液后加入一抗, 4℃过夜。TBST 漂洗液洗膜 3 次 15 min, 加入辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的二抗, 37℃振荡孵育 60 min。室温下将膜置于 ECL 发光液中振荡孵育 3 min, 最后应用 Image Pro Plus (IPP) 软件分析扫描图像目的条带的灰度。

大鼠的十二指肠黏膜损伤程度的评价: 对 5 组大鼠的十二指肠黏膜损伤程度采用改良的 moraes 方法进行评价, 具体是: 0 分表示十二指肠黏膜正常; 1 分表示黏膜出现充血、水肿; 2 分表示黏膜出现糜烂、出血; 3 分表示黏膜损伤发展为浅溃疡; 4 分表示黏膜损伤发展为深溃疡; 5 分表示黏膜出现溃疡穿孔。

组织病理学评价: 将动脉组织挑入包埋剂中, 置于烤箱中 40℃过夜。次日升温至 60℃, 48 h 后取出, 然后将动脉蜡块切成 5  $\mu$ m 的薄片, 用二甲苯进行脱蜡处理共 2 次, 再依次使用 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 的乙醇进行梯度脱水共 2 次, 3 min/次。蒸馏水漂洗后用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin, HE), 蒸馏水漂洗后依次用 100%, 90%, 80% 的乙醇梯度脱水 2 min, 二甲苯透明处理 10 min 后用中性树胶来封固, 染色成功后在光镜下观察切片的组织形态。

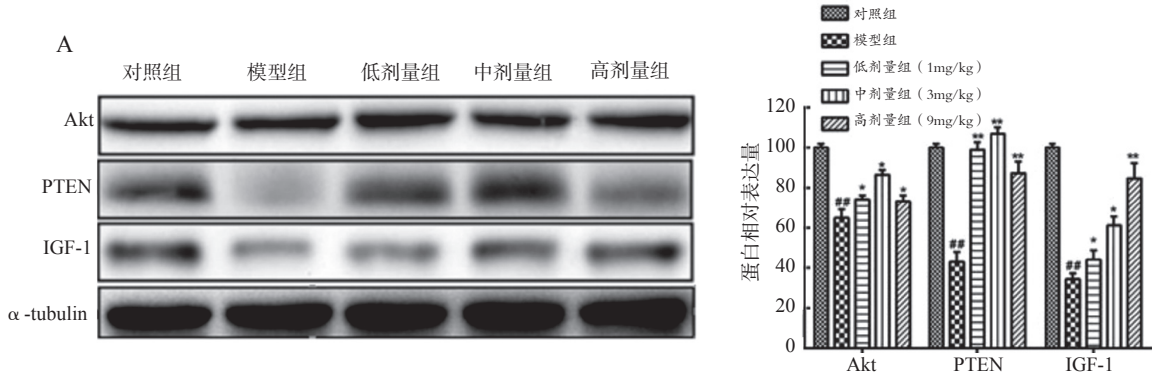
大鼠的抗氧化酶系的测定方法: 取十二指肠组织 0.5 g, 加入生理盐水 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液并保存在 -80℃备用。SOD, MDA 和 GSH-Px 的检测严格参照相应说明书操作。

1.4 统计学分析 运用 SPSS 11.5 统计学软件。对于符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并进行单因素方差分析 (ANOVA)  $F$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠十二指肠中 Akt, IGF-1 和 PTEN 的蛋白相对表达量 见图 1。采用 Western Blot 方法

检测各分组大鼠十二指肠中 IGF-1/PTEN/Akt 信号通路相关蛋白的表达水平。与对照组相比, 模型组 Akt, PTEN 和 IGF-1 的蛋白相对表达量显著降低。与模型组相比, 不同剂量盐酸普萘洛尔组 Akt, PTEN 和 IGF-1 的蛋白相对表达量显著升高, 其差异具有统计学意义 ( $F=10.319, P < 0.01$ )。



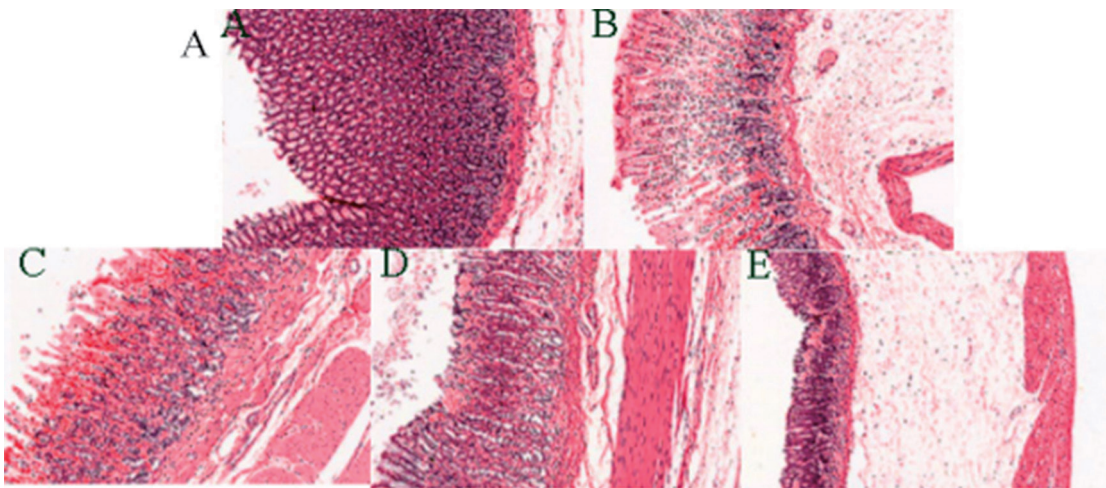
A. Western blot 检测各组大鼠 Akt, PTEN, IGF-1 蛋白的表达。B. 灰度定量分析各组大鼠 Akt, PTEN, IGF-1 蛋白相对表达量, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示 ( $n=7$ )。与对照组相比,  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组相比,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠十二指肠中 Akt, IGF-1 和 PTEN 的蛋白相对表达量

2.2 各组大鼠十二指肠黏膜损伤程度的比较 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和对照组大鼠肠黏膜损伤程度 ( $\bar{x} \pm s$ , 分) 依次为  $4.06 \pm 2.18$ ,  $2.08 \pm 1.67$ ,  $1.79 \pm 1.25$ ,  $1.50 \pm 1.03$  和 0。模型组大鼠的肠黏膜损伤程度显著高于对照组, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的十二指肠黏膜损伤程度依次降

低且均显著低于模型组, 其差异具有统计学意义 ( $F=3.703, P < 0.05$ )。

2.3 各组大鼠的 HE 染色结果 见图 2。模型组大鼠十二指肠黏膜及黏膜下层完全破坏, 随着盐酸普萘洛尔浓度的升高, 大鼠的十二指肠黏膜损伤程度逐渐降低。



A. 对照组, B. 模型组, C. 低剂量组, D. 中剂量组, E. 高剂量组

图 2 各组大鼠的 HE 染色结果

2.4 各组大鼠十二指肠的 SOD, GSH-Px 和 MDA 比较 见表 1。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的 SOD 均高于模型组, 高剂量组与模型组的差异具有统计学意义 ( $F=58.843, P=0.000$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的 GSH-Px 水平均高于

模型组, 高剂量组与模型组的差异具有统计学意义 ( $F=8.026, P=0.001$ )。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的 MDA 水平均低于模型组, 其差异无统计学意义 ( $F=14.519, P=0.479$ )。



表1 各组大鼠十二指肠的SOD、GSH-Px和MDA的比较

指标	对照组	模型组	低剂量组	中剂量组	高剂量组	F	P
SOD(U/mg)	4.80 ± 1.25	0.80 ± 0.25	1.12 ± 0.18	1.28 ± 0.14	3.98 ± 0.74	58.843	0.000
GSH-Px(U/mg)	7.06 ± 1.27	4.99 ± 0.98	5.21 ± 0.65	5.44 ± 0.31	7.16 ± 1.23	8.026	0.001
MDA(nmol/L)	1.43 ± 0.19	3.06 ± 0.70	3.04 ± 0.67	3.01 ± 0.52	2.97 ± 0.44	14.519	0.479

### 3 讨论

DU是消化系统的常见疾病,与胃酸分泌异常、幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染<sup>[7]</sup>、非甾体抗炎药、生活及饮食不规律、工作及外界压力、吸烟以及精神心理因素密切相关。近年来DU的发病率呈逐渐攀升趋势,严重影响患者的身体健康和生活质量。目前如何有效控制溃疡的发展、减轻溃疡的程度仍是DU临床和基础研究的壁垒。

本研究采用半胱胺建立DU大鼠模型,主要是由于半胱胺所致的溃疡存在部位选择性,一般情况下位于十二指肠近端,这种形态学上的变化与人类的DU类似<sup>[8]</sup>。因此基于此可作为药物药效和作用机制评价的有效基础。

IGF-1是由70个氨基酸组成的单肽,其在细胞增殖、凋亡以及肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。NGUYEN等<sup>[11]</sup>人发现IGF-1可通过激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)加强溃疡组织表皮细胞的再生作用。PTEN是第一个具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重活性的抑癌基因,其具有促进细胞凋亡、参与调控细胞周期、抑制血管生成和细胞黏附等作用<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示与模型组比较,不同剂量盐酸普萘洛尔组Akt, PTEN和IGF-1的蛋白相对表达量显著升高。

本研究比较各组大鼠十二指肠黏膜损伤程度结果说明模型组的黏膜损伤程度显著高于对照组,这就说明建模是成功且可用的。低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组的十二指肠黏膜损伤程度显著低于模型组,说明盐酸普萘洛尔可有效降低十二指肠黏膜的损伤程度,另外随着剂量的增加,黏膜损伤程度呈减轻趋势,另外HE染色再次验证了这一结论。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)会对蛋白质、核酸、多糖等生物大分子产生损伤作用。当ROS对细胞产生氧化损伤时,细胞内固有的一套抗氧化防御体系将被激活。常见的抗氧化酶有MDA,谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶等,MDA作为脂质过氧化损伤的重要标志,其可影响膜结构和功能。GSH-Px可催化GSH变为氧化型GSH,使有毒的过氧化物还原成为无毒的羟基化合物,同时促进过氧化氢的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的损害<sup>[14-15]</sup>。十二指肠抗

氧化酶系比较结果显示低、中和高剂量盐酸普萘洛尔组大鼠的SOD和GSH-Px水平显著升高,MDA水平降低,这就可以说明盐酸普萘洛尔对半胱胺致DU大鼠具有保护作用并且与抗氧化有关。

综上所述,盐酸普萘洛尔可降低半胱胺致DU大鼠十二指肠黏膜的损伤程度,并且随着剂量的增加,黏膜损伤程度逐渐减轻。盐酸普萘洛尔通过IGF-1/PTEN/Akt信号通路对DU大鼠发挥保护作用,并且其作用可能与抗氧化有关。

### 参考文献:

- [1] LEAUTE-LABREZE C, DE LA ROQUE E D, HUBICHE T, et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy[J]. 2008, 358(24):2649-2651.
- [2] DENOYELLE F, LEBOULANGER N, ENJOLRAS O, et al. Role of Propranolol in the therapeutic strategy of infantile laryngotracheal hemangioma [J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2009, 73(8):1168-1172.
- [3] LEE C K, YIM D S, KIM W H. The effect of verapamil on cysteamine-induced duodenal ulcer in the rat[J]. J Korean Med Sci, 1987, 2(4):247-253.
- [4] 刘扶平. 盐酸普萘洛尔治疗肝硬化并发消化道出血患者的临床效果及安全性评价[J]. 临床医学工程, 2020, 27(4):445-446.  
LIU Fuping. Evaluation on the clinical effect and safety of propranolol hydrochloride in the treatment of patients with liver cirrhosis complicated with gastrointestinal hemorrhage [J]. Clinical Medical & Engineering, 2020, 27(4):445-446.
- [5] 孙保华, 卢世云, 陈登登, 等. 胃、十二指肠溃疡幽门螺杆菌感染及相关病因回顾性分析 204 例[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(6): 628-630.  
SUN Baohua, LU Shiyun, CHEN Dengdeng, et al. *Helicobacter pylori* infection and other risk factors associated with peptic ulcers: an analysis of 204 cases [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2011, 19(6): 628-630.
- [6] SAGHAEI F, KARIMI I, JOUYBAN A, et al. Effects of captopril on the cysteamine-induced duodenal ulcer in the rat [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(4):373-377.
- [7] 杨海斌, 周贤斌. 雷贝拉唑钠肠溶片在幽门螺杆菌阳性十二指肠溃疡中的疗效、安全性及优势分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(23):2123-2126.  
YANG Haibin, ZHOU Xianbin. Analysis of the therapeutic effects, safety and advantages of rabeprazole sodium enteric-coated tablets in patients with *Helicobacter pylori* positive duodenal ulcer [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2015, 35(23):2123-2126.



- [8] 刘绍能, 赵凤志, 田德录, 等. 愈疡灵对大鼠诱发性十二指肠溃疡的保护作用及机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(5): 24-26.  
LIU Shaoneng, ZHAO Fengzhi, TIAN Delu, et al. Study on the protective effect and mechanism of Yuyingling on rat induced duodenal ulcer[J]. Chinese Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine, 1998, 4(5): 24-26.
- [9] HIGASHI Y, SUKHANOV S, ANWAR A, et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection [J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(4): 245-254.
- [10] 王俊慧, 宋爽, 王德平. 血清 IGF-1 和 IGFBP-3 水平检测在评价基因重组人生长激素治疗特发性身材矮小儿童的疗效分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 105-108.  
WANG Junhui, SONG Shuang, WANG Deping. Effects of recombinant human growth hormone on serum IGF-1 and IGFBP-3 in children with adolescent and late adolescent idiopathic short stature[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 105-108.
- [11] NGUYEN T, CHAI Jianyuan, LI Aihua, et al. Novel roles of local insulin-like growth factor-1 activation in gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelialization, and induces cyclooxygenase-2 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner [J]. Am J Pathol, 2007, 170(4): 1219-1228.
- [12] GOEL A, ARNOLD C N, NIEDZWIECKI D, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers [J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 3014-3021.
- [13] WU Chengying, CHEN Rong, WANG Xin, et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of phenolic extract from the seed coat of euryale ferox salisb and identification of three phenolic compounds by LC-ESI-MS/MS[J]. Molecules, 2013, 18(9): 11003-11021.
- [14] 王金湖, 鞠少卿, 王惠民. 抑癌基因 PTEN 与人类肿瘤的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18(1): 57-59.  
WANG Jinhu, JU Shaoqing, WANG Huimin. Advances in the study of tumor suppressor gene PTEN and human tumors[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2003, 18(1): 57-59.
- [15] CHEN Yeshan, ZHANG Sheng, PENG Gang, et al. Endothelial NO synthase and reactive oxygen species mediated effect of simvastatin on vessel structure and function: Pleiotropic and dose-dependent effect on tumor vascular stabilization[J]. International Journal of Oncology, 2013, 42(4): 1325-1336.

收稿日期: 2020-05-22 修回日期: 2020-08-11

#### (上接第 105 页)

- GUO Shuli, LI Juan, GOU Rong. Detection and analysis of serum immunoglobulin in patients with *Brucellosis*[J]. China Tropical Medicine, 2016, 16(3): 288-289.
- [7] 刘志科, 杨宁宁, 徐明国, 等. 鸡白痢沙门氏菌胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制及初步应用[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2018, 46(1): 39-48.  
LIU Zhike, YANG Ningning, XU Mingguo, et al. Development and primary application of colloidal gold immunochromatography test strip for rapid detection of *Salmonella pullorum* [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 2018, 46(1): 39-48.
- [8] RAN Xuhua, CHENG Jiajia, WANG Miaomiao, et al. *Brucellosis* seroprevalence in dairy cattle in China during 2008-2018: A systematic review and meta-analysis[J]. Acta Tropica, 2019, 189: 117-123.
- [9] COLOMBE S, WATANAPALACHAIGOOL E, EKGA-TAT M, et al. Cross-sectional study of *Brucellosis* and Q fever in Thailand among livestock in two districts at the Thai-Cambodian border, Sa Kaeo province[J]. One Health (Amsterdam, Netherlands), 2018, 6(1): 37-40.
- [10] SMIRNOVA E A, VASIN A V, SANDYBAEV N T, et al. Current methods of human and animal *Brucellosis* diagnostics[J]. Advances in Infectious Diseases, 2013, 3(3): 177-184.
- [11] 吕辰, 杨蒙雅, 隋秀文, 等. 胶体金免疫层析方法检测肺炎链球菌细胞壁多糖抗原[J]. 天津科技大学学报, 2018, 33(6): 16-19, 34.  
LÜ Chen, YANG Mengya, SUI Xiuwen, et al. Gold immunochromatography assay for *Streptococcus pneumoniae* C-polysaccharide[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2018, 33(6): 16-19, 34.
- [12] 刘亚东, 王慧煜, 刘佳佳, 等. 基于牛源布氏杆菌重组膜蛋白的胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(7): 805-810.  
LIU Yadong, WANG Huiyu, LIU Jiajia, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic assay based upon the combined recombinant of *Brucella* outer membrane proteins [J]. Veterinary Science in China, 2018, 48(7): 805-810.
- [13] 孔玉方, 郑家昊, 王慧煜, 等. 布鲁氏菌病快速检测试纸条的探索[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(5): 460-464.  
KONG Yufang, ZHENG Jiahao, WANG Huiyu, et al. Exploration of a rapid test strip for *Brucellosis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(5): 460-464.
- [14] 陈珍珍, 赵越, 王占黎, 等. 自制胶体金试剂盒对布鲁氏菌病的诊断效果评价[J]. 现代预防医学, 2016, 43(15): 2802-2805.  
CHEN Zhenzhen, ZHAO Yue, WANG Zhanli, et al. Diagnostic value of *Brucellosis* colloidal gold reagent kit and study on influencing factors of human chronic brucellosis[J]. Modern Preventive Medicine, 2016, 43(15): 2802-2805.
- [15] WU Lei, JIANG Tao, LU Zengjun, et al. Development and validation of a prokaryotically expressed foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C'3AB-based immunochromatographic strip to differentiate between infected and vaccinated animals[J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 186.

收稿日期: 2020-01-20 修回日期: 2020-06-10

# 儿童慢性 ITP 外周血 CD3<sup>+</sup>T 细胞活性氧的检测及临床意义

宋丽<sup>1</sup>, 杜宁超<sup>2</sup>, 李富荣<sup>1</sup> (1. 深圳市人民医院转化医学协同创新中心, 广州 深圳 518020;  
2. 深圳市第二人民医院肛肠外科, 广州 深圳 518035)

**摘要:**目的 探讨儿童慢性特发性血小板减少性紫癜 (Idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 外周血 CD3<sup>+</sup>T 细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量及其与血小板的关系, 为临床诊断和治疗提供依据。方法 随机收集 30 例慢性 ITP 患儿外周血为试验组, 30 例健康儿童外周血为对照组, 用流式细胞术检测外周血 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 ROS 平均荧光强度, 进行统计学分析。结果 试验组 CD3<sup>+</sup>T 细胞 ROS 平均荧光强度 (15.98 ± 5.78) 明显高于对照组 ROS 平均荧光强度 (4.65 ± 1.03), 两组间 ROS 的差异有统计学意义 ( $t=2.956$ ,  $P<0.05$ ); 试验组 CD3<sup>+</sup>T 细胞 ROS 与血小板成负性相关关系。结论 慢性 ITP 患儿外周血 CD3<sup>+</sup>T 细胞的 ROS 明显高于对照组, 说明 ROS 可以为儿童慢性 ITP 的诊断及治疗提供一定的参考依据。

**关键词:** 儿童; 特发性血小板减少性紫癜 (ITP); CD3<sup>+</sup>T 细胞; 活性氧 (ROS)

中图分类号: R725.5; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-144-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.035

## Detection and Clinical Significance of CD3<sup>+</sup> T Cell Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood of Children with Chronic ITP

SONG Li<sup>1</sup>, DU Ning-chao<sup>2</sup>, LI Fu-rong<sup>1</sup>

(1. Collaborative Innovation Center of Translational Medicine, Shenzhen People's Hospital, Guangzhou Shenzhen 510020, China; 2. Anorectal Surgery, the Second People's Hospital of Shenzhen, Guangzhou Shenzhen 518035, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the content of reactive oxygen species (ROS) in peripheral blood CD3<sup>+</sup> T cells of children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and its relationship with platelets, so as to provide basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Peripheral blood from 30 children with chronic ITP was randomly collected as the experimental group and 30 healthy children as the control group. The mean fluorescence intensity of CD3<sup>+</sup> T cells and ROS in peripheral blood was detected by flow cytometry and analyzed statistically. **Results** The mean fluorescence intensity of ROS in CD3<sup>+</sup> T cells in chronic ITP group (15.98 ± 5.78) was significantly higher than that in normal control group (4.65 ± 1.03), and the difference in ROS between the two groups was statistically significant ( $t=2.956$ ,  $P<0.05$ ). There was a negative correlation between ROS of CD3<sup>+</sup> T cells and platelet formation in the experimental group. **Conclusion** The ROS of CD3<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of children with chronic ITP was significantly higher than that of control group, indicated that ROS can provide some reference for the diagnosis and treatment of chronic ITP in children.

**Keywords:** children; idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP); CD3<sup>+</sup> T cells; reactive oxygen species (ROS)

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种原因不明的自身免疫病, 以血小板和巨核细胞自身抗体产生及成熟血小板破坏增多为主要病理特征, 以及因此引起的皮肤、黏膜或内脏出血为主要临床症状的一类血液系统疾病<sup>[1]</sup>。ITP 患儿体内有 T 细胞、B 细胞等的激活, 白细胞分化抗原如 CD3<sup>+</sup> (cluster differentiation, CD) T 细胞等。细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 主要在线粒体中产生<sup>[2]</sup>, 具有较强的氧化能力<sup>[3]</sup>。总之, 大量产生的 ROS 对许多先天免疫细胞杀死吞噬的病原体至关重要<sup>[4]</sup>。在病理因素的诱导下这些吞噬细胞可以产生大量的 ROS, 吞噬细胞

产生的 ROS 可以到达 T 细胞并导致氧化应激。在儿童慢性 ITP 中, CD3<sup>+</sup> T 细胞的 ROS 含量及其与儿童慢性 ITP 的关系尚不明确。本研究以慢性 ITP 患儿及正常儿童的外周血为研究对象, 分离外周血 CD3<sup>+</sup> T 细胞来检测其 ROS 的表达含量及 ITP 与 ROS 的关系, 并探讨了 ROS 作为 ITP 潜在诊断靶标的应用价值。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 见表 1。收集我院 2018 年 1 月 ~ 2019 年 12 月 30 例慢性 ITP 患儿外周血为试验组, 其中男童 14 例, 女童 16 例, 年龄 5.3 ± 2.6 岁, 诊断标准参考 2016 年版 ITP 诊治的中国专家共识指南;

**作者简介:** 宋丽 (1979-), 女, 医学硕士, 中级检验医师, 研究方向: 血液病及肠道菌群的相关生化和临床的研究, E-mail: 158987215@qq.com。

**通讯作者:** 李富荣 (1962-), 男, 医学博士, 研究员, 主任技师, 博士生导师, 研究方向: 干细胞与细胞治疗工程技术的研发, E-mail: ffr62@163.com。

杜宁超 (1978-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肠道菌群与结直肠相关疾病的研究, E-mail: dncn12008@163.com。

对照组为同期经临床和实验室检查,证明无疾病的健康体检儿童外周血30例,其中男童13例,女童17例,年龄 $5.4 \pm 2.0$ 岁。

表1 儿童慢性ITP组和对照组一般资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

类别	慢性ITP组 (n=30)	正常对照组 (n=30)	P
体重指数(kg/m <sup>2</sup> )	18.3 ± 1.7	17.6 ± 2.2	0.32
心率(次/min)	85 ± 7	81 ± 8	0.27
体温(℃)	37.2 ± 0.6	37.1 ± 0.8	0.85
呼吸频率(次/min)	17 ± 3	18 ± 2	0.67

1.2 主要试剂和仪器 人CD3<sup>+</sup>T Cell Enrichment Column(美国BD公司), anti-CD3-FITC, MsIgG1-FITC, D-Hanks缓冲液(美国Sigma公司), 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司), 2g/dl 台盼蓝染液、PBS缓冲液(pH7.2~pH7.6)(自配), 红细胞裂解液(美国ThermoFisher公司), 胎牛血清(FBS)(杭州四季清公司), BD-LSRFortessa(BD Biosciences), LD5-2A型低速水平离心机(北京医用离心机厂), 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂), 微量加样器(德国Eppendorf公司)。

### 1.3 研究方法

1.3.1 外周血CD3<sup>+</sup>T细胞纯度和活性检测:为了验证所提取的CD3<sup>+</sup>T细胞的活性和纯度<sup>[5]</sup>,我们按如下方法操作:①取慢性ITP患儿及对照组静脉血4ml抗凝, Hanks液稀释1倍,再加入淋巴细胞分离液中。②2000 r/min离心30min,液体分为三层,吸取上层和中间液界面处乳白色液体即为单核细胞。③该单核细胞37℃孵育30min,淋巴细胞悬浮,单核细胞贴壁,吸取悬浮液为纯化的淋巴细胞。④Hanks液稀释此淋巴液5倍,1500 r/min离心10min,弃上清液再裂解红细胞,弃上清。⑤经T淋巴细胞分离柱(CD3<sup>+</sup>T cell enrichment column)过滤,得到纯化的T淋巴细胞悬液。⑥1500 r/min离心10min, Hanks液重悬并细胞计数,计数后加入FBS调整CD3<sup>+</sup>T细胞浓度至 $2 \times 10^6$ /ml。

CD3<sup>+</sup>T细胞纯度检测:取细胞悬液100 μl,加2 μl FITC标记的CD3<sup>+</sup>T细胞单克隆抗体,充分混匀,4℃避光60 min, PBS洗涤并离心2次,加入200 μl 缓冲液,上流式细胞仪检测。

CD3<sup>+</sup>T细胞活性检测:取20 μl细胞悬液加入20 μl 2g/dl 台盼蓝染液,轻轻吹打均匀,加盖玻片,高倍显微镜镜检,正常活细胞不着色,折光强;死亡细胞被台盼蓝染成蓝色,体积膨大,据此计数判断CD3<sup>+</sup>T细胞的活性。

1.3.2 流式细胞术(flow cytometry, FC)检测外周血CD3<sup>+</sup>T细胞ROS:按试剂盒说明书操作,用FC检测CD3<sup>+</sup>T细胞ROS<sup>[6]</sup>。具体操作步骤如下:①荧光探针检测;②样品处理;③DCFH-DA(活性氧检测试剂)标记及检测;④上流式机检测分析。DCFH-DA的荧光光谱和FITC非常相似,用FITC的参数设置检测DCFH-DA。

1.4 统计学分析 所有数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用GraphPad Prism 5.0软件作图, SPSS 21.0(SPSS Inc, Chicago, IL)软件进行统计学分析。组间计量资料比较采用双尾Students *t*检验,组间性别差异比较用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患儿血细胞检测结果 见表2。两组患儿的血细胞检测,发现除血小板有明显差异外( $t=3.58$ ,  $P<0.05$ ),其他血细胞检测指标差异均无统计学意义( $t=0.89\sim1.20$ , 均 $P>0.05$ )。

表2 儿童慢性ITP组和对照组血常规比较( $\bar{x} \pm s$ )

检测指标	慢性ITP组 (n=30)	正常对照组 (n=30)	P
白细胞( $\times 10^9$ /L)	6.1 ± 2.0	6.7 ± 2.8	0.24
红细胞( $\times 10^{12}$ /L)	4.5 ± 0.4	6.7 ± 0.7	0.11
血红蛋白(g/L)	133 ± 11	156 ± 9	0.09
血小板( $\times 10^9$ /L)	25.5 ± 12.2	186.1 ± 14.7	0.007

2.2 T细胞存活率和纯度检测结果 我们运用FC检测CD3<sup>+</sup>T细胞悬液纯度,镜下计数测得两组T细胞悬液试验组和对照组外周血T细胞纯度分别为 $95.6\% \pm 2.4\%$ ,  $96.5\% \pm 1.3\%$ ;两组的T细胞的存活率分别为 $97.3\% \pm 1.6\%$ ,  $96.0\% \pm 1.8\%$ 。两组的T细胞纯度和存活率之间无统计学意义。

2.3 外周血CD3<sup>+</sup>T细胞及其ROS 与正常对照组相比,试验组外周血CD3<sup>+</sup>T细胞数量明显增加,差异有统计学意义( $t=2.70$ ,  $P < 0.05$ ),见图1。运用FC检测CD3<sup>+</sup>T细胞的ROS水平,与正常对照组相比,慢性ITP患者外周血相同数量CD3<sup>+</sup>T细胞ROS的水平明显增高,差异有统计学意义( $t=2.45$ ,  $P < 0.05$ ),见图2。FC检测CD3<sup>+</sup>T细胞ROS的变化试验组平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)为 $15.98 \pm 5.78$ ,对照组为 $4.65 \pm 1.03$ ,差异有统计学意义( $t=2.956$ ,  $P=0.003$ )。见图3。



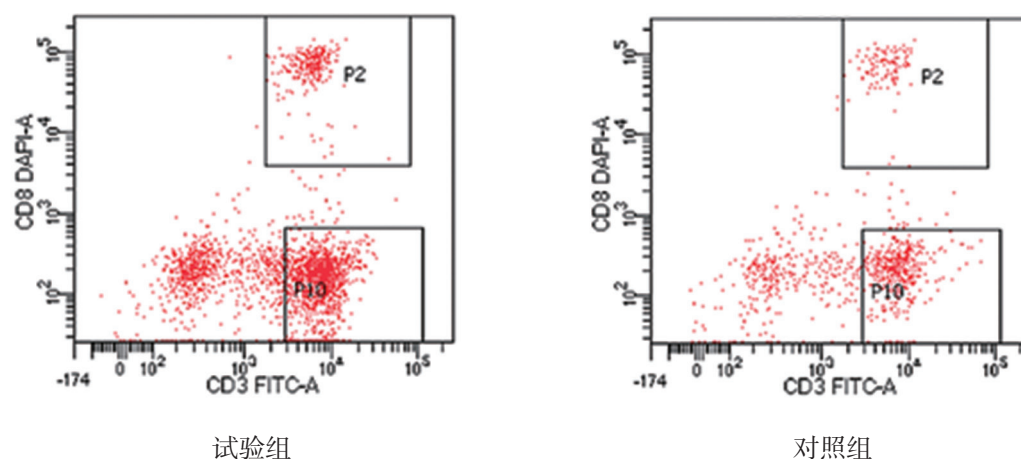
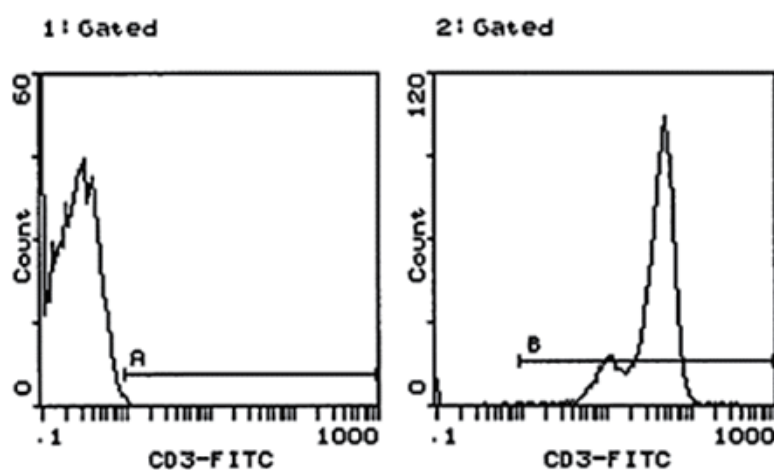
图1 CD3<sup>+</sup>T细胞流式图

图2 FITC-CD3单抗设门检测ROS

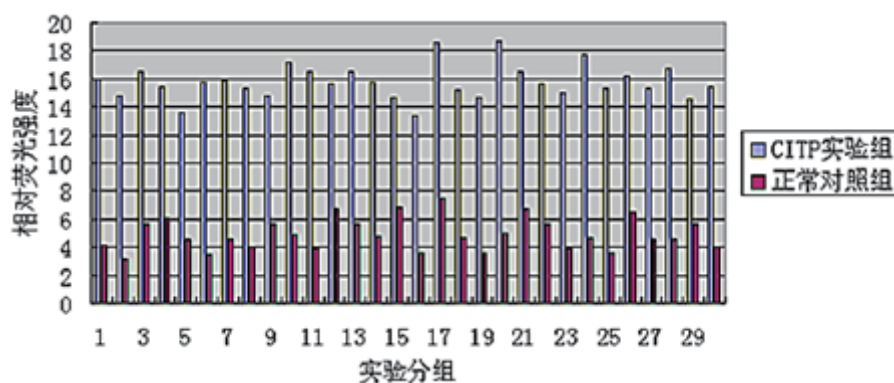


图3 ROS荧光强度定量分析柱状图(CITP:慢性ITP)

2.4 慢性ITP组外周血CD3<sup>+</sup>T细胞ROS水平与血小板的相关性分析 基于试验组ROS明显升高和血小板降低,我们对二者的关系进行了分析。见图4所示,慢性ITP组外周血CD3<sup>+</sup>T细胞ROS的水平明显增高,而血小板数量明显降低,二者有相关性,呈负性相关( $r^2=-0.8601$ ,  $P<0.05$ )。

### 3 讨论

ITP是一种自限性疾病,患儿大多在6个月内

可以痊愈,约10%~20%发展为慢性。ITP高发年龄为4~5岁<sup>[7]</sup>,无明显性别和季节差异。ITP血小板的破坏与淋巴细胞等的激活以及与抗血小板自身抗体的产生有关。研究也表明ITP患者存在细胞免疫的异常,尤其与T细胞功能改变有关,如CD3<sup>+</sup>T细胞等。也有研究表明T细胞识别人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)表位,进而活化产生细胞因子,激活B淋巴细胞产生自身抗体<sup>[8]</sup>

破坏自身血小板。

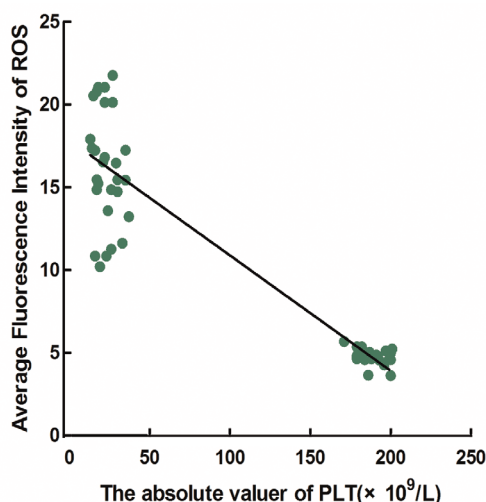


图4 慢性ITP组与ROS与血小板的相关性分析

研究发现ROS与ITP,炎症、肿瘤、自身免疫病等有关<sup>[9]</sup>。ROS介导的信号传导涉及多个过程,如细胞生长、死亡<sup>[10-11]</sup>等。ROS可以细胞调控活化信号,进而影响血小板功能<sup>[12]</sup>。ST段抬高型心肌梗死患者血小板中趋化因子CCL2表达增高,通过NF- $\kappa$ B信号通路影响血小板功能参与血栓形成<sup>[13]</sup>;ROS在NF- $\kappa$ B信号通路上游发挥作用激活I $\kappa$ B激酶复合物(IKK),从其抑制剂(I $\kappa$ B)中释放NF- $\kappa$ B,激活细胞相关的信号通路<sup>[14]</sup>。国内有研究表明T细胞CD4<sup>+</sup>Th亚群功能改变、异常激活和凋亡等,参与了ITP血小板的破坏机制<sup>[15]</sup>。但CD3<sup>+</sup>T细胞的ROS与儿童慢性ITP的关系尚不明确。

本研究发现慢性ITP患儿外周血CD3<sup>+</sup>T细胞数量增加,其ROS含量明显升高,同时伴有血小板数量的明显降低,发现ROS和血小板二者之间存在负性相关关系,提示ROS可能参与了慢性ITP血小板的破坏。根据我们的实验结果,可以推断在慢性ITP中T细胞特别是CD3<sup>+</sup>T细胞可能被激活且产生大量ROS,ROS作用在血小板的靶点可能是NF- $\kappa$ B的通路如I $\kappa$ B, P65或磷酸化P65等,通过其氧化作用影响磷酸化或乙酰化作用,进而激活NF- $\kappa$ B通路,加速了血小板的凋亡或坏死,最终导致患儿慢性ITP的发生或发展。但ROS可能抑制CD3<sup>+</sup>T细胞的凋亡使其数量增加,这与我们的研究结果一致,但其机理需要进一步研究。B细胞和中性粒细胞的ROS可能也参与慢性ITP的发展,在多种因素的共同作用下决定了ROS对血小板的生成及破坏的影响,最终决定了慢性ITP的转归与结局。

综上所述,慢性ITP患儿外周血CD3<sup>+</sup>T细胞的ROS对血小板的破坏关系密切,可以作为慢性

ITP的诊断和治疗的潜在靶点,为临床工作提供一定的参考价值。同时,后续研究需进一步扩大样本量,研究ROS对血小板信号通路及其结合位点的影响,以期更深入的研究ROS对慢性ITP血小板的破坏机制。

#### 参考文献:

- [1] LAMBERT M P, GERNESHEIMER T B. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia[J]. Blood,2017,129(21):2829-2835.
- [2] SHOUKAT B A, ALI O, KUMAR D, et al. Hypogammaglobulinemia observed one year after rituximab treatment for idiopathic thrombocytopenic purpura[J].Case Rep Med,2018, 2018:2096186.
- [3] FUKUDA H, TAKATA K, KITAGUCHI T, et al. Autoimmune hepatitis with concomitant idiopathic thrombocytopenic purpura diagnosed by transjugular liver biopsy[J].Case Reports Hepatol,2018,2018:5305691.
- [4] HOLMSTROM K M, FINKEL T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2014,15 6):411-421.
- [5] MONIKA R. T Cell: Primary culture from peripheral blood[J].Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.),2019, 2020:17-31.
- [6] 赵凯,陈琦,王利,等.流式细胞术在检测细胞内活性氧中的应用[J].现代检验医学杂志,2012,27(1):99-100,103.  
ZHAO Kai, CHEN Qi, WANG Li,et al.Application of flow cytometry in detection of cellular reactive oxygen species[J].Journal of Modern Laboratory Medicine,2012,27 (1):99-100,103.
- [7] RODEGHIERO F, STASI R, GERNESHEIMER T,et al.Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group [J].Blood,2009,113(11):2386-2393.
- [8] KALPATTHI R, BUSSEL J B. Diagnosis, pathophysiology and management of children with refractory immune thrombocytopenic purpura[J].Curr Opin Pediatr,2008,20(1):8-16.
- [9] TAYSI S, POLAT F, GUL M, et al.Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int,2002,21(5):200-204.
- [10] AUGSBURGER F, FILIPPOVA A, RASTI D, et al. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors[J].Redox Biol,2019,26:101272.
- [11] BEDARD K, KRAUSE K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J].Physiol Rev,2007,87(1):245-313.
- [12] SANTORO M M. Fashioning blood vessels by ROS signalling and metabolism [J].Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 35-42.
- [13] 曹禹,张效林,田孝祥,等.STEMI患者血浆和血小板CCL2水平及其对血小板NF- $\kappa$ B信号通路的影响

- 响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(1): 62-65.
- CAO Yu, ZHANG Xiaolin, TIAN Xiaoxiang, et al. Levels of chemokine CCL2 in the plasma and platelets of patients with ST elevation myocardial infarction and its effect on the signal pathway of nuclear factor kappa B in the platelets[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(1): 62-65.
- [14] NOPPARAT C, SINJANAKHOM P, GOVITRAPONG P. Melatonin reverses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced senescence in SH-SY5Y cells by enhancing autophagy via sirtuin 1 deacetylation of the RelA/p65 subunit of NF-κ B [J]. J Pineal Res, 2017, 63(1): 1-13.
- [15] 唐玉蓉, 王际亮, 孙婷婷, 等. 儿童特发性血小板减少性紫癜 Th 亚群细胞因子的测定及意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 143-145.
- TANG Yurong, WANG Jiliang, SUN Tingting, et al. Determination and clinical significance of Th subsets cytokines in ITP of children[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30 (5): 143-145
- 收稿日期: 2020-02-13 修回日期: 2020-06-18
- 
- (上接第94页)
- [5] 姚丽, 张梅, 郭先成. 孕妇巨细胞病毒感染载量与胎儿宫内感染的相关性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(15): 3550-3552.
- YAO Li, ZHANG Mei, GUO Xiancheng. Correlation between cytomegalovirus infection load of pregnant women and intrauterine fetal infection[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25(15): 3550-3552.
- [6] 徐婉芳, 刘彦慧. 弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒病原体检测与自然流产的相关性研究 [J]. 当代医学, 2013, 19(9): 22-23.
- XU Wanfang, LIU Yanhui. Toxoplasma, rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus pathogen detection and the correlation between spontaneous abortion[J]. Contemporary Medicine, 2013, 19(9): 22-23.
- [7] 中华医学会儿科学分会感染学组, 全国儿科临床病毒感染协作组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性疾病诊断和防治的建议 [J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(4): 290-292.
- The Subspecialty Group of Infectious Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, National Pediatric Clinical Viral Infection Collaboration Group, The Editorial Board, *Chinese Journal of Pediatrics*. Recommendations for diagnosis and prevention of childhood cytomegalovirus diseases[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2012, 50 (4): 290- 292.
- [8] 刘震忠, 吴凤琪, 闫静, 等. 2015 ~ 2016 年天津地区新生儿 TORCH 血清学筛查及感染特点 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32 (4) :133-136.
- LIU Zhenzhong, WU Fengqi, YAN Jing, et al. TORCH serological screening and infection characteristic in neonate in tianjin area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(04): 133-136.
- [9] 宋丹, 梅花. 新生儿先天性巨细胞病毒感染的诊断、预防及治疗进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(22): 4453-4457.
- SONG Dan, MEI Hua. Research progress of congenital cytomegalovirus infection in newborns[J]. Medical Recapitulate, 2017, 23(22): 4453-4457.
- [10] 刘邈珩, 钱继红, 朱天闻, 等. 围生期巨细胞病毒感染 5 年临床总结 [J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(2): 99-104.
- LIU Liwei, QIAN Jihong, ZHU Tianwen, et al. A 5-year retrospective clinical study of perinatal cytomegalovirus infection[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2016, 18(2): 99-104.
- [11] HAMPRECHT K, MASCHMANN J, JAHN G, et al. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation[J]. Journal of Clinical Virology, 2008, 41(3): 198-205.
- [12] MEIER J, LIENICKE U, TSCHIRCH E, et al. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(3): 1318-1324.
- [13] MOYLAN D C, SUNIL K P, SHANNON A R, et al. Breast milk human cytomegalovirus (CMV) viral load and the establishment of breast milk CMV-pp65-Specific CD8 T cells in human CMV infected mothers[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 216(9): 1176-1179.
- [14] OMARSDOTTIR S, CASPER C, WIRGART B Z, et al. Transmission of cytomegalovirus to extremely preterm infants through breast milk[J]. Acta Paediatrica, 2007, 96(4): 492-494.
- [15] ROMERO-GÓMEZ M P, MARTA C, MONTES-BUENO M T, et al. Evaluation of cytomegalovirus infection in low-birth weight children by breast milk using a real-time polymerase chain reaction assay[J]. Journal of Medical Virology, 2015, 87(5): 845-850.
- [16] 谢康, 刘艳秋, 阳彦, 等. 母乳、小儿血液及尿液标本中检测巨细胞病毒对诊断小儿 HCMV 感染的临床应用 [J]. 实验与检验医学, 2017, 35(3): 340-343.
- XIE Kang, LIU Yanqiu, YANG Yan, et al. Clinical application of cytomegalovirus detection in breast milk, pediatric blood and urine specimens for diagnosis of HCMV infection in children[J]. Experiment and Laboratory Medicine, 2017, 35(3): 340-343.
- [17] 赖源, 朱纯华, 覃亚斌, 等. 人巨细胞病毒感染母婴传播与母乳喂养 [J]. 实用预防医学, 2012, 19(9): 1406-1408.
- LAI Yuan, ZHU Chunhua, QIN Yabin, et al. Mother-to-child HCMV transmission and breast-feeding[J]. Practical Preventive Medicine, 2012, 19(9): 1406-1408.
- [18] 赵巍松, 刘伶, 杨飞. 母乳及婴儿血液、尿液人巨细胞病毒 DNA 检测在婴儿 HCMV 感染中的应用 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(6): 1059-1061.
- ZHAO Weisong, LIU Ling, YANG Fei. Clinical significance of fluorescent quantitative PCR in pregnant women and infants HCMV-DNA determination [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(6): 1059-1061.
- [19] TANIMURA Kenji, YAMADA H. Maternal and neonatal screening methods for congenital cytomegalovirus infection[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2019, 45(3): 514-521.
- 收稿日期: 2020-04-16 修回日期: 2020-06-03



# 福建省泉州地区健康成人UF5000尿沉渣分析仪 相关参数参考范围调查

周静琪<sup>1</sup>, 陈雅斌<sup>2</sup>, 王婉妮<sup>2</sup>, 黄丽燕<sup>3</sup>, 张志珊<sup>2</sup>

(1. 泉州市传染病防治医院检验科, 福建泉州 362100; 2. 福建医科大学附属泉州第一医院检验科, 福建泉州 362000; 3. 希森美康医用电子(上海)有限公司, 上海 200120)

**摘要:** 目的 调查泉州地区健康成人UF5000尿沉渣分析仪相关参数参考范围。方法 选取2019年7月~2020年1月于泉州市第一医院进行体检的健康成人1120例随机新鲜中段尿液标本,在UF5000尿沉渣分析仪进行检测,记录红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、上皮细胞(EC)、管型(CAST)和细菌(BACT)等结果。将标本按照不同性别、不同年龄组(青年组、中年组、老年组)进行划分,参考CLSI C28-A3文件的研究方法,建立泉州地区UF5000尿沉渣分析仪上述检测参数的参考范围。非参数检验用于不同性别、不同年龄组间的差异性比较。结果 参考范围:男性RBC: 0.0~8.1 (/μl), WBC: 0.0~7.2 (/μl), EC: 0.0~3.3 (/μl), CAST: 0.0~0.70 (/μl), BACT: 0.0~44.8 (/μl); 女性RBC: 0.0~12.9 (/μl), WBC: 0.0~13.1 (/μl), EC: 0.0~24.9 (/μl), CAST: 0.0~0.42 (/μl), BACT: 0.0~698.0 (/μl)。男女之间比较,各参数差异均有统计学意义( $Z=-21.217\sim-2.982$ , 均 $P<0.05$ )。男性RBC各年龄组间比较、BACT青年组和中年组间比较,差异均有统计学意义( $Z=-4.720\sim-2.268$ , 均 $P<0.05$ ); 女性EC和BACT各年龄组间比较、WBC青年组和中年组、老年组间比较均有统计学意义( $Z=-10.691\sim-2.649$ ,  $P$ 均 $<0.05$ )。结论 研究对UF5000尿沉渣分析仪的参考范围进行了调查,明确了不同性别、不同年龄的参考范围,为目前各地区调查UF5000尿沉渣分析仪相关参数参考范围提供了临床资料。

**关键词:** UF5000; 健康成人; 尿沉渣; 参考范围

中图分类号: R446.12 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-149-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.036

## Investigation on the Reference Range of UF5000 Urinary Sediment Analyzer for Healthy Adults in Quanzhou Area of Fujian Province

ZHOU Jing-qi<sup>1</sup>, CHEN Ya-bin<sup>2</sup>, WANG Wan-ni<sup>2</sup>, HUANG Li-yan<sup>3</sup>, ZHANG Zhi-shan<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Quanzhou Infectious Disease Hospital, Fujian Quanzhou 362100, China;  
2. Department of Laboratory Medicine, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fujian Quanzhou 362000, China; 3. Sysmex Medical Electronics (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 200120, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the reference range of UF5000 urine sediment analyzer for healthy adults in Quanzhou. **Methods** The fresh urine samples of 1120 healthy adults who had physical examination in Quanzhou First Hospital from July 2019 to January 2020 were selected and tested by UF5000 urinary sediment analyzer. The results of RBC, WBC, EC, CAST and BACT were recorded. According to the research methods of CLSI C28-A3, the reference range of the above parameters of UF5000 urinary sediment analyzer in Quanzhou Area was established. Non-parametric test was used to compare the differences between different genders and different age groups. **Results** The reference range in men was RBC: 0.0~8.1 (/μl), WBC: 0.0~7.2 (/μl), EC: 0.0~3.3 (/μl), CAST: 0.0~0.70 (/μl), BACT: 0.0~44.8 (/μl). The reference range in women was RBC: 0.0~12.9 (/μl), WBC: 0.0~13.1 (/μl), EC: 0.0~24.9 (/μl), CAST: 0.0~0.42 (/μl), BACT: 0.0~698 (/μl). The differences of parameters between men and women were statistically significant ( $Z=-21.217\sim-2.982$ , all  $P<0.05$ ). In men, there were statistically significant differences among the age groups of RBC, youth group and middle-aged group of BACT ( $Z=-4.720\sim-2.268$ , all  $P<0.05$ ). In women, there were statistically significant differences between the age groups of EC and BACT, youth group, middle-aged group and old-age group of WBC ( $Z=-10.691\sim-2.649$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** The reference range of UF5000 urinary sediment analyzer was investigated, and the reference range of different gender and age was defined. The results provide clinical data for other regions to investigate the reference range of UF5000 urinary sediment

作者简介: 周静琪(1991-), 女, 本科, 技师, 研究方向为临床检验和微生物, E-mail: 394278581@qq.com。

通讯作者: 张志珊(1973-), 女, 博士, 主任技师, E-mail: 554882707@qq.com。

analyzer.

**Keywords:** UF5000; healthy adults; urinary sediment; reference range

尿沉渣分析是临床常规检测之一,对于显微镜下有形成分镜检,如RBC, WBC等,国内已经制定了明确的参考范围<sup>[1]</sup>。但仪器检测有形成分的参考范围,由于仪器种类繁多,且检测原理不一,尚未有统一的参考范围。因此针对不同地区不同实验室,应根据实际情况制定合适的尿液有形成分参考范围。Sysmex UF5000是日本Sysmex公司新近推出的尿沉渣分析仪,虽然在国内各实验室已得到了推广应用,但参考范围的相关研究较少,引用验证尚需一定的时间。因此,为了研究适用于泉州地区,符合本实验室的参考范围,本实验对1 120例于本院体检的健康成人进行了尿液检测分析,以建立合适的尿液有形成分参考范围。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2019年7月~2020年1月于泉州市第一医院进行体检的健康成人1 120例,其中男性580例,女性540例,年龄18~89岁,中位年龄45岁。按照年龄划分为3组,分别为青年组(18~44岁,男性278例,女性263例,中位年龄35岁);中年组(45岁~59岁,男性171例,女性156例,中位年龄51岁);老年组( $\geq 60$ 岁,男性131例,女性121例,中位年龄66岁)。健康人群的纳入标准为:实验和影像学、体格检查等均正常,无泌尿系统疾病、高血压、糖尿病、肝炎、风湿等全身系统疾病史,无重大手术史、近一个月内未有服用药物,女性处于非月经期。仪器检测排除标准:①干化学检测:隐血、白细胞酯酶、蛋白、亚硝酸盐、葡萄糖等任意一项出现阳性;②镜检复查显示存在明显干扰因素,如结晶、细菌对红细胞计数、粘液丝对管型计数的干扰,以上均排除,不纳入研究对象。

**1.2 仪器与试剂** UC3500尿干化学分析仪和UF5000尿液有形成分分析仪由日本Sysmex公司提供。仪器已进行校准,对精密度、携带污染率、可报告范

围等方面进行了性能验证,结果符合厂家要求和ISO 15189规定后方可正式启用。所用试剂、校准品、质控品均为原厂配套,且都在有效期内使用,每日质控结果均在控,符合ISO 15189规定的 $1_{3S}$ 、 $2_{2S}$ 质控规则。离心机为上海卢湘仪离心仪器有限公司的TD4N型号低速尿液离心机;显微镜采用日本Olympus光学工业株式会社生产的CX23(升级版)双目显微镜。

**1.3 方法** 研究对象均随机留取新鲜中段尿液标本,且在留取前不可大量饮水造成尿液标本稀释。取10 ml于干净一次性容器中,在Sysmex UC3500尿干化学分析仪和UF5000尿液有形成分分析仪上同时进行检测,记录每份尿液标本的红细胞(red blood cell, RBC)、白细胞(white blood cell, WBC)、上皮细胞(epithelial cells, EC)、管型(cast)、细菌(Bacteria, BACT)等结果。对于检测结果显示存在明显干扰因素的标本,进行显微镜复查:400 g离心力离心5 min,由2名主管技师采用双盲法进行显微镜镜检,检验干扰因素是否存在。整个检测过程在2 h内完成。

**1.4 统计学分析** SPSS18.0软件进行数据分析。正态性检验显示RBC, WBC, EC, CAST, BACT等研究数据均为非正态分布,因此,参考CLSI C28-A3文件<sup>[2]</sup>,剔除研究数据中的离群值后,检测结果用中位数(M)[四分位数( $P_{25} \sim P_{75}$ )]表示,采用( $0 \sim P_{95}$ )作为参考范围。非参数检验用于不同性别、不同年龄组间的差异性比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 健康成人RBC, WBC, EC, CAST, BACT检测结果** 健康成人男、女不同参数检测结果参考范围见表1,非参数检验显示,不同性别之间各参数检测结果差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。

表1 健康成人男女RBC, WBC, EC, CAST, BACT检测结果及参考范围

参数(/ $\mu$ l)	检测结果[M( $P_{25} \sim P_{75}$ )]		参考范围( $P_0 \sim P_{95}$ )			
	男(n=580)	女(n=540)	男(n=580)	女(n=540)	Z	P
RBC	2.1(0.9~3.8)	3.3(1.6~6.0)	0.0~8.1	0.0~12.9	-8.068	0.000
WBC	1.8(1.0~3.1)	2.4(1.2~5.1)	0.0~7.2	0.0~13.1	-5.089	0.000
EC	0.7(0.4~1.3)	3.7(1.6~8.4)	0.0~3.3	0.0~24.9	-19.059	0.000
CAST	0.00(0.00~0.14)	0.00(0.00~0.14)	0.00~0.70	0.00~0.42	-2.982	0.003
BACT	4.5(2.2~10.3)	119.5(65.5~238.0)	0.0~44.8	0.0~698.0	-21.217	0.000

2.2 男、女性不同年龄组检测结果的比较 见表2, 表3。非参数检验显示男性 RBC 各年龄组间比较、BACT 青年组和中年组间比较, 差异均有统计学意义 ( $Z=-4.720\sim-2.268$ , 均  $P<0.05$ ) ; 女性 EC,

BACT 各年龄组间比较、WBC 青年组和中年组、老年组间比较差异均有统计学意义 ( $Z=-10.691\sim-2.649$ , 均  $P<0.05$ ) 。

表2 男性各年龄组 RBC, WBC, EC, CAST, BACT 检测结果 [M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]

参数 (/μl)	青年组 (n=278)	中年组 (n=171)	老年组 (n=131)	青年组 vs 中年组		青年组 vs 老年组		中年组 vs 老年组	
				Z <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	P <sub>3</sub>
RBC	1.6(0.8~3.1)	2.1(0.9~4.0)	2.6(1.6~4.7)	-2.268	0.023	-4.720	0.000	-2.473	0.013
WBC	1.7(1.0~3.0)	1.9(1.0~3.4)	1.6(0.8~3.0)	-0.938	0.348	-0.853	0.393	-1.450	0.147
EC	0.7(0.3~1.3)	0.7(0.4~1.5)	0.7(0.3~1.3)	-1.475	0.140	-0.363	0.717	-0.909	0.363
CAST	0.0(0.0~0.14)	0.0(0.0~0.28)	0.0(0.0~0.14)	-1.377	0.168	-2.363	0.793	-0.841	0.400
BACT	4.5(2.2~9.1)	5.7(2.2~13.7)	4.5(2.2~9.2)	-3.111	0.002	-1.667	0.096	-1.074	0.283

表3 女性各年龄组 RBC, WBC, EC, CAST, BACT 检测结果 [M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>)]

参数 (/μl)	青年组 (n=263)	中年组 (n=156)	老年组 (n=121)	青年组 vs 中年组		青年组 vs 老年组		中年组 vs 老年组	
				Z <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	P <sub>3</sub>
RBC	3.6(1.6~6.7)	2.9(1.8~5.3)	3.2(1.2~4.9)	-1.381	0.167	-1.642	0.101	-0.544	0.586
WBC	2.7(1.3~5.5)	1.9(1.0~4.6)	1.8(0.7~4.2)	-2.649	0.008	-2.869	0.004	-0.761	0.447
EC	5.4(2.7~11.9)	3.0(1.1~7.3)	1.6(0.4~2.5)	-4.985	0.000	-9.118	0.000	-4.621	0.000
CAST	0.0(0.0~0.14)	0.0(0.0~0.14)	0.0(0.0~0.14)	-0.911	0.363	-0.700	0.484	-0.017	0.987
BACT	137.9(50.5~336.9)	39.0(13.7~134.4)	10.3(4.5~29.8)	-6.326	0.000	-10.691	0.000	-5.902	0.000

2.3 健康成人不同性别、不同年龄尿沉渣参考范围 泉州地区健康成人, 男、女性不同年龄段参考范围见表4、表5。

表4 泉州地区健康男性不同年龄段 UF5000 尿沉渣分析仪参考范围 [M(P<sub>0</sub>~P<sub>95</sub>)]

参数 (/μl)	青年组	中年组	老年组
RBC	0.0~7.0	0.0~8.0	0.1~8.8
WBC	0.0~7.0	0.0~8.4	0.0~6.1
EC	0.0~3.1	0.0~3.4	0.0~3.4
CAST	0.0~0.56	0.0~0.70	0.0~0.70
BACT	0.0~29.8	0.0~44.8	0.0~42.5

表5 泉州地区健康女性不同年龄段 UF5000 尿沉渣分析仪参考范围 [M(P<sub>0</sub>~P<sub>95</sub>)]

参数 (/μl)	青年组	中年组	老年组
RBC	0.0~12.9	0.1~12.2	0.1~10.4
WBC	0.0~15.1	0.0~11.4	0.0~11.7
EC	0.1~30.5	0.0~17.8	0.0~8.1
CAST	0.0~0.28	0.0~0.42	0.0~0.28
BACT	1.1~801.4	1.1~549.6	0.0~135.5

### 3 讨论

Sysmex UF5000 和同公司不同型号的 UF1000i 相比, 虽然都是以流式细胞计数法为检测原理, 但其在检测通道进行了较大的改进, 新增加的消偏振侧向散射光 (depolarized side scatter light) 使其检测结果具有更好的精密度<sup>[3]</sup>。目前已在国内得到了逐步的推广应用, 虽有不少学者对仪器的性能进行了研究, 但较多地集中于筛查尿路感染上<sup>[4-5]</sup>, 参考范围研究较少, 尚未进行明确地建立验证。因此, 为了更好地将仪器运用于临床检测, 为目前各地区调查 UF5000 尿沉渣分析仪相关参数参考范围提供临床资料, 本实验依据《WS/T 402-2012 临床实验室检验项目参考区间的制定》和 CLSI C28-A3 文件, 建立适合于本地区本实验室的 UF5000 尿沉渣分析仪相关参数, 包括 RBC, WBC, EC, CAST, BACT 等检测参数的参考范围。

由于男、女性生理构造上的不同, 加上目前国内相关研究均是按照性别分开进行比较<sup>[6-7]</sup>, 因此本研究将 1 120 例健康成人的检测结果按照不同性别进行分析比较。检测结果显示男、女性 RBC, WBC, EC, CAST, BACT 比较差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。根据 CLSI C28-A3, 并以闫利明等<sup>[7-8]</sup>建立 UF1000i, UF5000 参考范围的相关文献



作为参考,本研究选取检测结果的95%分位作为参考范围上限,结果显示UF5000参考范围:男性RBC: 0.0~8.1 ( $/\mu\text{l}$ ), WBC: 0.0~7.2 ( $/\mu\text{l}$ ), EC: 0.0~3.3 ( $/\mu\text{l}$ ), CAST: 0.0~0.70 ( $/\mu\text{l}$ ), BACT: 0.0~44.8 ( $/\mu\text{l}$ ); 女性RBC: 0.0~12.9 ( $/\mu\text{l}$ ), WBC: 0.0~13.1 ( $/\mu\text{l}$ ), EC: 0.0~24.9 ( $/\mu\text{l}$ ), CAST: 0.0~0.42 ( $/\mu\text{l}$ ), BACT: 0.0~698.0 ( $/\mu\text{l}$ )。目前UF5000尚未建立明确的参考范围,因此大多数实验室沿用UF-1000i或厂家提供的参考范围。而UF-1000i参考范围以马骏龙等<sup>[9]</sup>的研究结论为基础,该参考范围中男、女性的RBC上限分别为15  $/\mu\text{l}$ , 18  $/\mu\text{l}$ ; WBC上限分别为18  $/\mu\text{l}$ , 23  $/\mu\text{l}$ ; CAST均为2.25  $/\mu\text{l}$ 。本研究结论中上述3项检测参数的区间上限均出现了明显降低。和王刚强等<sup>[10]</sup>西安地区UF1000i的同类型研究相比较,在RBC, WBC, EC, BACT等参数上,无论男女性,泉州地区参考区间均略低于西安地区,但CAST则区间明显缩窄。由此可见,UF5000的参考范围和UF1000i的参考范围可能有差异,特别是CAST差异明显,因此有必要建立UF5000自己的参考范围。和Wang等研究所得的北京地区多中心实验室UF5000的参考范围相比较,二者均提示除CAST外,其余4项参考范围均窄于女性。进一步分析发现除细菌外,本研究中RBC, WBC, EC的参考范围上限均只是WANG等<sup>[8]</sup>研究所得上限的一半。考虑可能与地域不同,或仪器的不同状态条件有关,更印证了不同地域不同实验室应建立属于自己的UF5000参考范围。

不同性别内进一步进行各年龄组间的比较,结果显示男性RBC各年龄组间比较、BACT青年组和中年组间比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); 女性EC, BACT各年龄组间比较、WBC青年组和中年组、老年组间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。从表4、表5参考范围上可以看出,特别是女性从青年组到中年组到老年组,其RBC, WBC, EC, BACT 4项参数检测结果逐渐降低,参考范围逐渐缩窄。研究认为出现此结论可能与不同年龄,特别是女性随着年龄增长,体内激素水平改变有一定关系。由于目前国内外UF5000尿沉渣分析仪年龄组间参考范围调查的研究较少,因此本研究无从分析讨论。

综上,本研究对本实验室的UF5000尿沉渣分析仪的参考范围进行了调查研究,明确了不同性别、不同年龄的参考范围。得出的实验结论应只供本实验室,或者本地区其他实验室调查参考范围的参考。不同的地区、仪器、实验条件下应建立适合于自己实验室的参考范围。值得注意的是,本研究在筛查

标本过程中,将明显具有干扰因素,如存在结晶、细菌对红细胞的干扰,粘液丝对管型的干扰的标本进行了剔除,因此得出的参考范围可能偏窄。在临床工作中遇到此类标本,应进一步进行离心镜检,以显微镜下的有形成分数量明确标本是否异常。

#### 参考文献:

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[S].4版. 北京:人民卫生出版社,2015: 171.  
SHANG Hong, WANG Yusan, SHEN Ziyu. National code of practice for clinical examination [S]. 4th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015:171.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute .CLSI C28-A3: Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline- third edition[S]. Wayne: PA, CLSI C28-A3 C, 2010.
- [3] PREVITALI G, RAVASIO R, SEGHEZZI M, et al. Performance evaluation of the new fully automated urine particle analyser UF-5000 compared to the reference method of the Fuchs-Rosenthal chamber[J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 472: 123-130.
- [4] 张喜钦,龚彩平,王蔚莎,等. 快速尿道感染检测的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2019,42(5):375-380.  
ZHANG Xiqin, GONG Caiping, WANG Weisha, et al. Clinical application in the rapid diagnosis of urinary tract infection[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2019,42(5):375-380.
- [5] KIM S Y, PARK Y, KIM H, et al. Rapid screening of urinary tract infection and discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative bacteria by automated flow cytometric analysis using sysmex UF-5000[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(8): e02004-e02017.
- [6] 张林,莫丽亚,聂波丽,等. UF-500i检测长沙地区儿童尿液有形成分参考范围[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(4):435-436.  
ZHANG Lin, MO Liya, NIE Boli, et al. Reference range of urine formed elements in children of Changsha detected by UF-500i[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013,34(4):435-436.
- [7] 闫利明,马骏龙. 巴彦淖尔市健康人群UF-1000i尿沉渣分析仪参考区间调查[J]. 检验医学, 2018,33(2):124-126.  
YAN Liming, MA Junlong. Investigation on reference interval of UF-1000i urinary sediment analyzer for healthy people in Bayannur City[J]. Laboratory Medicine, 2018,33(2):124-126.
- [8] WANG Li, GUO Ye, HAN Jiang, et al. Establishment of the intelligent verification criteria for a routine urinalysis analyzer in a multi-center study[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019, 57(12): 1923-1932.
- [9] 马骏龙,丛玉隆,陆玉静,等. 尿干化学与流式细胞术联合用于尿液有形成分镜检筛选的研究与应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011,34(6):494-500.

(下转第175页)

# ROC 曲线设置流式细胞术检测 HLA-B27 的临界值在强直性脊柱炎诊断和鉴别诊断中的应用

张 静<sup>a</sup>, 董松武<sup>b</sup>, 孙 峰<sup>a</sup>

(亳州市人民医院 a. 检验科; b. 心内科, 安徽亳州 236800)

**摘要:** **目的** 应用 ROC 曲线设定诊断强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 的人类白细胞抗原 (Human leukocyte antigen, HLA-B27) 荧光临界值, 评价其在 AS 诊断和鉴别诊断中的效能。**方法** 利用流式细胞术对 40 例 AS 患者和 169 例与 AS 患者症状相近的其他关节病患者及健康对照进行 HLA-B27 荧光表达强度检测, 比较各组荧光值差异, 并进行 ROC 曲线分析, 根据 Youden 指数计算出临界值, 并与原设定临界值的诊断效能进行比较。**结果** AS 组的荧光检测值、阳性率和对照组比较差异均具有统计学意义 ( $F=40.45$ ,  $P<0.05$ ), 以试剂盒给定的荧光临界值 146 为临界值, ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.92, 诊断 AS 的敏感度、特异度、漏诊率、误诊率和准确度分别为 90.00%, 91.72%, 10.00%, 8.28% 和 91.39%, 阳性预测值、阴性预测值和 Youden 指数分别为 72.00%, 97.48% 和 0.82。根据 Youden 指数确定最佳诊断临界值为 151.50, 其诊断敏感度、特异度、漏诊率、误诊率和准确度分别为 90.00%, 93.49%, 10.00%, 6.51% 和 92.82%, 阳性预测值、阴性预测值和 Youden 指数分别为 76.60%, 97.53% 和 0.83。**结论** 进口试剂盒设置的诊断临界值略低, 实验室可在不影响诊断敏感度的前提下调整临界值, 提高诊断 AS 的特异度。

**关键词:** 强直性脊柱炎; 类风湿关节炎; 临界值; HLA-B27; 流式细胞术

**中图分类号:** R539.23; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-153-03

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.037

## Application of ROC Curve of Setting HLA-B27 Critical Value in the Diagnosis and Differential Diagnosis of Ankylosing Spondylitis

ZHANG Jing<sup>a</sup>, DONG Song-wu<sup>b</sup>, SUN Feng<sup>a</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Cardiology, Bozhou People's Hospital, Anhui Bozhou 236800, China)

**Abstract:** **Objective** To set the threshold value of HLA-B27 fluorescence detection level by using the ROC curve and evaluate its efficiency in the diagnosis and differential diagnosis of ankylosing spondylitis (AS). **Methods** Used flow cytometer from American BD company to detect the fluorescence intensity express levels of HLA-B27 from 40 patients with AS and 169 non-AS patients (as control group). According to the corresponding Youden index, obtained cut-off level by using the ROC curve analysis, comparing the diagnostic efficiency with the kit set. **Results** The difference of the fluorescence intensity express levels of HLA-B27 and the positive rate between the two groups were statistically significant ( $F=40.45$ ,  $P<0.05$ ). According to the cut-off level of BD company (146), the area under the ROC curve, the sensitivity, the specificity, the missed diagnosis rate, the misdiagnosis rate, Youden index and the accuracy were 0.92, 90.00%, 91.72%, 10.00%, 8.28%, 0.82 and 91.39%, respectively. The positive predictive value, negative predictive value and Youden index were 72.00%, 97.48% and 0.82, respectively. According to Youden index of determine, the optimal diagnostic critical value, the corresponding diagnostic sensitivity, the specificity, the missed diagnosis rate, the misdiagnosis rate, the accuracy, the positive predictive value, the negative predictive value and Youden index were 151.50, 90.00%, 93.49%, 10.00%, 6.51%, 92.82%, 76.60%, 97.53% and 0.83, respectively. **Conclusion** The diagnostic threshold of the imported kit reagent was slightly lower. The laboratory can raise the threshold without affecting the diagnostic sensitivity, the specificity of the diagnose of AS could be raised, and flow cytometer could be more useful for the clinical diagnosis and differential diagnosis.

**Keywords:** ankylosing spondylitis; rheumatoid arthritis; the critical value; HLA-B27; flow cytometry

BREWERTON 等人<sup>[1]</sup>于 1937 年提出 HLA-B27 抗 AS) 的发病高度相关, 90% 以上 AS 患者携带原的表达与强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, HLA-B27 基因, 且不同种族的人群表达阳性率不

**作者简介:** 张静 (1986-), 女, 硕士, 副主任检验师, 主要从事分子生物学和免疫学研究, E-mail: zhangjingdongsongwu@163.com。

**通信作者:** 董松武 (1981-), 男, 硕士, 副主任医师, E-mail: dongsongwu@163.com。

同, HLA-B27 的检测对于没有明显症状的早期 AS 的辅助诊断有较高的应用价值。目前我院使用 BD 公司的流式细胞仪检测 HLA-B27, 其诊断临界点是以白种人的表达水平建立的, 国内较少报道以国人的表达水平建立的临界值, 本文将经临床确诊的 AS 患者作为研究组, 与 AS 患者症状相近的类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 患者、骨性关节炎患者 (osteoarthritis, OA)、腰椎间盘突出 (Lumbar Intervertebral disc Herniation, LIDH)、痛风 (gout) 患者和健康体检者 (healthy controls, HC) 合并作为对照组, 对其进行 HLA-B27 的荧光值检测, 分析探讨流式细胞术 (flow cytometer, FCM) 检测 HLA-B27 临界值的设置及对诊断和鉴别诊断 AS 的影响。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 本院 2016 年 1 月 ~ 2019 年 7 月收治的符合诊断要求<sup>[2]</sup> 的 AS 患者 40 例作为研究组, 男性 32 例, 女性 8 例, 年龄 15 ~ 72 岁; RA 患者 40 例, 男性 4 例, 女性 36 例, 年龄 32 ~ 73 岁; OA 患者 22 例, 男性 3 例, 女性 19 例, 年龄 47 ~ 79 岁; LIDH 等腰痛病患者 26 例, 男性 11 例, 女性 15 例, 年龄 26 ~ 78 岁; 痛风患者 31 例, 男性 29 例, 女性 2 例, 年龄 18 ~ 75 岁; 健康体检者 50 例, 男性 22 例, 女性 28 例, 年龄 13 ~ 74 岁, 此五组合并为对照组。

1.2 仪器和试剂 仪器为 BD FACSCalibur 双激光四色分选流式细胞仪, 试剂盒为 HLA-B27 检测试剂盒 (BD 公司)。

1.3 方法 所有研究对象均空腹抽取 2ml 静脉血, 乙二胺四乙酸二钾抗凝, 由检验师按照规定操作程序进行检测并记录结果。

1.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理, 正态分布检验采用 SW 检验, 符合正态分布的数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 率的比较采用卡方检验, 采用 ROC 曲线分析检测指标的诊断效能, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组间 HLA-B27 的检测荧光值比较 见表 1。

表 2 不同临界值诊断 AS 的效能

临界值	敏感度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)	漏诊率 (%)	误诊率 (%)	Youden 值	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
146.00	90.00	91.72	91.39	10.00	8.28	0.82	72.00	97.48
151.50	90.00	93.49	92.82	10.00	6.51	0.83	76.60	97.53

## 3 讨论

AS 是一种主要累及骶髂关节和脊柱关节、主要与遗传因素有关的病因未明的自身免疫性慢性炎症疾病, 目前 AS 的诊断标准<sup>[2]</sup> 是以临床表现和影像学检查为主要依据, 该病早期症状与 LIDH, RA 和 OA 等相似, 有一定的漏诊误诊率, 明确诊断时

AS 组和其余各组进行单因素方差分析, 各组荧光值比较差异具有统计学意义 ( $F=40.45$ ,  $P < 0.05$ ), 进一步行两两比较, AS 患者与 RA 组、OA 组、LIDH 组和痛风组比较荧光值差异均具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 其余各组之间两两比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组检测 HLA-B27 荧光值比较

组别	n	荧光值 ( $\bar{x} \pm s$ )	阳性率 [n (%)]
AS	40	159.27 $\pm$ 22.04	36(90.00)
RA	40	102.60 $\pm$ 20.99	3 (7.50)
OA	22	110.95 $\pm$ 31.96	3 (13.64)
LIDH	26	105.50 $\pm$ 23.67	2 (7.69)
GOUT	31	105.29 $\pm$ 26.94	5(16.13)
HC	50	98.88 $\pm$ 14.34	1(2.00)

2.2 ROC 曲线分析 见图 1。以 AS 为研究组, 所有非 AS 患者合并为对照组, 以临床诊断为金标准, 做 ROC 曲线, 评价 HLA-B27 诊断 AS 的效能, AUC 为 0.92。根据 Youden 指数确定最佳诊断临界点为 151.50。

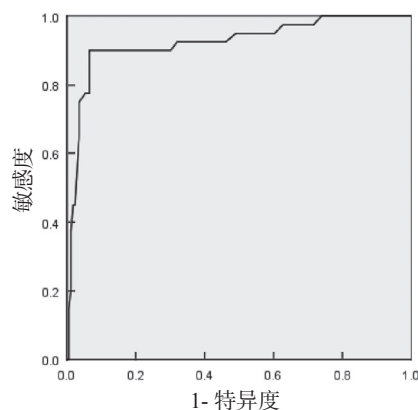


图 1 流式细胞术检测 HLA-B27 的 ROC 曲线

2.3 不同临界值诊断 AS 的效能 原装试剂盒设定荧光强度界值为 146, 根据 Youden 指数确定的诊断临界点为 151.50, 以两个不同临界值标准计算出的诊断效能详, 见表 2。

患者病程往往已进入中期阶段<sup>[3]</sup>, 延误早期治疗, 故而对疑为 AS 的患者进行 HLA-B27 抗原检测是很有必要的。

我院检测 HLA-B27 采用美国 BD 公司的流式细胞仪及配套试剂盒, FCM 检测 HLA-B27 抗原的荧光强度与 T 淋巴细胞表面 HLA-B27 表达水平有



关,其表达存在人种和个体差异,而且HLA-B27具有高度多态性,亚型众多,并非所有亚型都与AS相关<sup>[4]</sup>,不同地区、民族和人种之间HLA-B27基因亚型分布有差异<sup>[5]</sup>。我国是一个多民族国家,不同民族间HLA-B27的基因型与AS的相关性也有差异,陈亚豪等<sup>[6-7]</sup>研究表明汉族人和维吾尔族人诊断AS的临界值有差距,蒙古族和汉族AS的阳性检出率也不同<sup>[8]</sup>,因此进口试剂盒所设置的临界值是否对我国AS的诊断和鉴别诊断有最高的诊断效率有待斟酌。本研究发现,AS组的荧光检测值、阳性率和所有非AS组比较差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),用试剂盒设定的临界值146作为判断标准,敏感度为90.00%,特异度为91.72%,误诊率为8.28%,漏诊率为10.00%,Youden指数为0.82,ROC曲线下面积为0.92;根据Youden指数确定最佳诊断临界点为151.50,根据新的临界点诊断AS的敏感度为90.00%,特异度为93.49%,漏诊率为10.00%,误诊率为6.51%,Youden指数为0.83。应用新的临界值诊断的敏感度不变,特异度有所提高,但两者较为接近,差异无统计学意义,说明试剂盒所设定的界值较为可靠,和肖琳琳等<sup>[9]</sup>人研究结果不一致,肖琳琳<sup>[9]</sup>等人研究认为试剂盒设定的临界值对于诊断研究组的假阴性率过高,原设定临界值对于在国内的应用价值有待斟酌。在本研究中,由于AS起病隐匿,采用病例均为经过临床确诊的住院病人,有大量AS病人是门诊病人,或病例资料不完善而无法采用,是否会导致数据有所偏颇?后续我们会加大研究样本量,加大和风湿免疫科合作,将反应性关节炎、银屑病关节炎等与AS症状类似的其他脊柱关节病纳入非AS对照组做更为精确的验证。临床上早期诊断AS可以降低致残率,在本研究中根据新界值在敏感度不变的前提下提高特异度,对于临床更有指导意义。目前的诊断标准主要根据临床症状和影像学检查结果,巫翠萍等<sup>[10]</sup>人研究确诊的AS患者和可疑AS患者HLA-B27检测结果与X线结果比较,HLA-B27检测结果与X光片在AS组时差异无统计学意义,但可疑AS组HLA-B27的阳性率明显高于X线结果,认为在AS的早期诊断中,检测HLA-B27有着重要的价值,因此若患者有腰骶疼痛等症状,影像学检查阴性,而HLA-B27阳性,在排除其他引起腰骶部疼痛疾病的情况下,需考虑AS早期。

我国是一个多民族国家,不同民族遗传背景、地区分布、生活习惯不同,在后续研究中我们会加大样本量,将更多的与AS症状相近的其他脊柱关节疾病组纳入研究,做更为精确的分析,HLA-B27在疑似AS患者的早期筛查中有不可替代的作用,应引起医患高度重视。

## 参考文献:

- [1] BREWERTON D A, HART F D, NICHOLLS A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. Lancet, 1973, 1(7809): 904-907.
- [2] VAN DER LINDEN S, Valkenburg H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing aproposal for modification of the New York criteria[J]. Arthritis and Rheumatism, 1984, 27(4): 361-368.
- [3] 艾金伟, 刘盈, 关向飞, 等. HLA-B27 对中国人群强直性脊柱炎诊断价值的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2016, 16 ( 7 ) : 802-808.  
AI Jinwei ,LIU Ying, GUAN Xiangfei ,et al. Diagnostic value of HLA-B27 tests for ankylosing spondylitis in Chinese population: A meta-analysis[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2016, 16(7): 802-808.
- [4] PALADINI F, TACCARI E, FIORILLO M T, et al. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies[J]. Arthritis and Rheumatism, 2005, 52(10): 3319-3321.
- [5] RANA M K, LUTHRA-GUPTASARMA M. Differences in conformational stability of the two alpha domains of the disease-associated and non-disease-associated subtypes of HLA-B27[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 94(A): 233-245.
- [6] 陈亚豪, 刘洋, 曹玲, 等. HLA-B27 对维吾尔族与汉族强直性脊柱炎的诊断性能评价 [J]. 新疆医学, 2018, 48 ( 4 ) : 393-394, 398.  
CHEN Yahao, LIU Yang, CAO Ling, et al. Evaluation of HLA-B27 in the diagnosis of ankylosing spondylitis in Uygur and Han nationalities [J]. Xinjiang Medical Journal, 2018, 48(4): 393-394, 398.
- [7] 李晓征, 白玉盛, 项欣, 等. 新疆维汉民族人类白细胞抗原 B27 阳性表达分布特点的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4): 107-109.  
LI Xiaozheng, BAI Yusheng, XIANG Xin, et al. Study on the distribution of human leukocyte antigen B27 positive expression in uygur and han nationalities in Xinjiang[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(4): 107-109.
- [8] 闫艳, 彭慧敏, 曹永艳. 流式细胞仪检测强直性脊柱炎患者的 HLA-B27 100 例 [J]. 河北联合大学学报 ( 医学版 ), 2012, 14(1): 63.  
YAN Yan, PENG Huimin, CAO Yongyan, et al. Flow cytometry tests for HLA-B27 in 100 patients with ankylosing spondylitis[J]. Journal of Hebei United University ( Health Sciences), 2012, 14(1): 63.
- [9] 肖林林, 王璐璐, 赵卫卫, 等. ROC 曲线在 HLA-B27 界值设置中的应用 [J]. 检验医学, 2016, 31 ( 4 ) : 338-339.  
XIAO Linlin , WANG Lulu , ZHAO Weiwei , et al. Application of ROC curve in HLA-B27 threshold setting[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 338-339.
- [10] 巫翠萍, 覃西, 赵莲. HLA-B27 在诊断早期强直性脊椎炎中的应用价值 [J]. 海南医学, 2011, 22 ( 23 ) : 19-21.  
WU Cuiping, QIN Xi, ZHAO Lian, et al. Value of HLA-B27 detection for the early diagnosis of ankylosing spondylitis[J]. Hainan Medical Journal, 2011, 22(23): 19-21.

收稿日期: 2020-03-20 修回日期: 2020-06-17

# 静脉血真空采血管预稀释法校正 EDTA 依赖性假性血小板减少的效果探讨

汪学耀<sup>1</sup>, 荆成宝<sup>2</sup>, 张倩<sup>1</sup>, 王禅<sup>3</sup>

(1. 安康市汉滨区第三人民医院, 陕西安康 725018; 2. 安康市中心医院, 陕西安康 725000;  
3. 安康市中医医院, 陕西安康 725000)

**摘要:**目的 探讨静脉血真空采血管预稀释法在校正 EDTA 依赖性假性血小板减少症 (ethylene diamine tetraacetic acid-dependent thrombocytopenia, EDTA-PTCP) 的血小板 (platelet, PLT) 计数中的应用。方法 对 47 例 EDTA-PTCP 病例血样分别使用 EDTA 法、静脉血真空采血管预稀释法在不同时间段测得的 PLT 计数进行方差分析和 *t* 检验。结果 1, 2 和 3h 组内 PLT 计数值, EDTA 法分别为  $(173.69 \pm 78.33) \times 10^9/L$ ,  $(144.37 \pm 71.49) \times 10^9/L$  和  $(128.45 \pm 70.17) \times 10^9/L$ , 结果差异有统计学意义 ( $F=4.79, P=0.01$ ); 而静脉血真空采血管预稀释法分别为  $(206.76 \pm 71.75) \times 10^9/L$ ,  $(203.35 \pm 70.31) \times 10^9/L$  和  $(190.92 \pm 75.37) \times 10^9/L$ , 结果差异无统计学意义 ( $F=0.65, P=0.53$ ), 稳定性高。对 1, 2 和 3h 静脉血真空采血管预稀释法与 EDTA 法所测得的 PLT 计数之差进行分析, 结果分别为  $(33.06 \pm 55.21) \times 10^9/L$ ,  $(58.98 \pm 59.30) \times 10^9/L$ ,  $(72.47 \pm 71.90) \times 10^9/L$ , 差异有统计学意义 ( $t=4.19 \sim 6.92$ , 均  $P < 0.001$ ), 且  $\bar{d} > 0$ , 说明静脉血真空采血管预稀释法可以校正 EDTA-PTCP 的 PLT 计数结果。结论 静脉血真空采血管预稀释法的 PLT 计数结果在 3h 内稳定性高, 可以运用于 EDTA-PTCP 血小板检测结果的校正。

**关键词:** EDTA 依赖性假性血小板减少症; 预稀释真空采血管; 血小板计数

中图分类号: R446.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-156-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.038

## Discussion on the Efficacy of Prediluted Vacuum Blood Collection Tube Method to Correct EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia

WANG Xue-yao<sup>1</sup>, JING Cheng-bao<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, WANG Chan<sup>2</sup>

(1. the Third People's Hospital of Hanbin District, Shaanxi Ankang 725018, China; 2. Ankang Central Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China; 3. Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Ankang 725000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application of prediluted vacuum blood collection tube in correcting platelet (PLT) count in EDTA-dependent thrombocytopenia (EDTA-PTCP). **Methods** Analysis of variance and *t*-test were performed for the PLT counts of 47 EDTA-PTCP blood samples measured by EDTA method and prediluted vacuum blood collection tube method at different time points. **Results** The PLT counts of the EDTA method of 1, 2 and 3h groups were  $(173.69 \pm 78.33) \times 10^9/L$ ,  $(144.37 \pm 71.49) \times 10^9/L$ , and  $(128.45 \pm 70.17) \times 10^9/L$ , respectively, and the results were statistically significant ( $F=4.79, P=0.01$ ). Correspondingly, the results measured by the prediluted vacuum blood collection tube method were  $(206.76 \pm 71.75) \times 10^9/L$ ,  $(203.35 \pm 70.31) \times 10^9/L$ , and  $(190.92 \pm 75.37) \times 10^9/L$ , respectively, and the results were not statistically significant ( $F=0.65, P=0.53$ ) with high stability. The difference between the PLT counts measured by the prediluted vacuum blood collection tube method and EDTA method at 1h, 2h, and 3h were analyzed. The results were  $(33.06 \pm 55.21) \times 10^9/L$ ,  $(58.98 \pm 59.30) \times 10^9/L$  and  $(72.47 \pm 71.90) \times 10^9/L$ , respectively, with statistical significance ( $t=4.19 \sim 6.92$ , all  $P < 0.001$ ), and  $\bar{d} > 0$ , indicating that the prediluted vacuum blood collection tube method can correct the PLT count results of EDTA-PTCP. **Conclusion** The PLT count results of prediluted vacuum blood collection tube method remain stable within 3 hours and can be applied to the correction of EDTA-PTCP platelet test results.

**Keywords:** EDTA-dependent thrombocytopenia; prediluted vacuum blood collection tube; platelet count.

EDTA 依赖性假性血小板减少症 (EDTA-PTCP) 是指临床检测中血样的血小板数目原本正常, 但其检测结果却显示假性减少的现象, 其原因是血样应

用 EDTA-K<sub>2</sub> 来作为抗凝剂抗凝而导致血小板聚集, 使血液细胞分析仪不能正确识别血小板, 在假性血小板减少症中占比高达九成以上<sup>[1]</sup>。临床工作中若

作者简介: 汪学耀 (1980-), 男, 在读研究生, 副主任检验技师, 主要从事细胞形态学研究, E-mail: wxygqzz@163.com。

通讯作者: 王禅, E-mail: 2275659679@qq.com。

不能及时鉴别 EDTA-PTCP 而采取不必要的医疗措施,不但增加患者痛苦,还会引起医疗纠纷。

目前校正 EDTA-PTCP 的方法有:稀释模式法、更换抗凝剂法、微量离心法、药物稳定法<sup>[2]</sup>,但稀释模式法、微量离心法和药物稳定法在实际应用中存在着操作不便,更换抗凝剂法虽然操作简单但是存在校正不彻底的缺陷<sup>[3]</sup>。本次实验采用由笔者发明的预稀释真空采血管(实用新型名称:预稀释真空采血管专利号 ZL 2017 20335701.X)。此方法是建立在稀释模式法的基础上,但又解决原稀释模式法采集末梢血不方便、标本不可靠,操作环节多、血小板计数稳定时间短、计数不可靠等问题,可操作性强,便于在临床上推广。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 2015年3月~2018年12月汉滨区第三人民医院门诊及住院确诊的假性血小板减少症患者(PTCP)共60例,依据实验室复检标准筛选出47例患者作为研究对象,其中男性22例,女性25例,年龄9~86岁,平均年龄 $57 \pm 20.34$ 岁。

1.2 仪器与试剂 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 BC-5300 血液细胞分析仪及原厂配套试剂,三力医用科技发展有限公司 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管,日本

奥林巴斯 BX41 双目显微镜,重庆天海医疗设备有限公司骨髓图像分析管理系统,珠海贝索生物技术有限公司瑞氏-吉姆萨复合染色液。

1.3 方法 采集静脉血 2ml 到 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管中,倒置放正混匀 8 次后,使用全自动血细胞分析仪 BC-5300 在全血模式下进行 PLT 检测。采静脉血 1 ml 于预稀释真空采血管(内含稀释倍数为 10 倍的氯化钠稀释液)<sup>[4]</sup>中,倒置放正混匀 8 次后,使用全自动血细胞分析仪 DxH800 在稀释模式下进行 PLT 检测。分别记录患者 1, 2 和 3 h 的 PLT 检测数据。

1.4 统计学分析 统计分析软件使用 SPSS19.0, 计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 及差值的均数  $\pm$  差值的标准差 ( $\bar{d} \pm Sd$ ) 表示,采用方差分析及配对  $t$  检验对数据进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同采血管各时间组 PLT 计数比较 见表 1。47 例 EDTA-PTCP 患者不同采血管各时间 PLT 计数值的方差分析结果差异有统计学意义 ( $F=4.79, P=0.01$ ); 而静脉血真空采血管预稀释法组内 PLT 计数值各时间分析结果无统计学意义 ( $F=0.65, P=0.53$ ), 3h 内整体的 PLT 计数值结果稳定。

表 1 不同采血管各时间组 PLT 计数值比较 [ $(\bar{x} \pm s) \times 10^9/L$ ]

项 目	1h	2h	3h	F	P
EDTA 法	173.69 $\pm$ 78.33	144.37 $\pm$ 71.49	128.45 $\pm$ 70.17	4.79	0.01
静脉血真空采血管预稀释法	206.76 $\pm$ 71.75	203.35 $\pm$ 70.31	190.92 $\pm$ 75.37	0.65	0.53

2.2 不同时间下静脉血真空采血管预稀释法 见表 2。静脉血真空采血管预稀释法不同时间测得的 PLT 计数值与 EDTA 真空采血管法所测得 PLT 计数值之差的结果差异有统计学意义 ( $t=4.19 \sim 6.92, P < 0.001$ ), 且  $\bar{d}$  均远大于 0, 证明静脉血真空采血管预稀释法可以校正 EDTA-PTCP 的计数结果。

表 2 不同时间下静脉血真空采血管预稀释法与 EDTA 法 PLT 计数值之差分析结果

时间	两法 PLT 计数值之差		
	$(\bar{d} \pm Sd) \times 10^9/L$	t	P
1h	33.06 $\pm$ 55.21	4.19	0.00
2h	58.98 $\pm$ 59.30	6.92	0.00
3h	72.47 $\pm$ 71.90	6.08	0.00

## 3 讨论

EDTA-PTCP 是指因使用 EDTA-K<sub>2</sub> 作为抗凝剂而导致临床检测血样中的 PLT 数目原本正常,其检测结果却显示假性减少的现象。虽然 EDTA-PTCP 发病概率为 0.03%~1.9%<sup>[5]</sup>,但若就诊患者人数多,加之血细胞检测是临床检验的常规项目,如不加以

鉴别而导致误诊,不仅加重患者负担,还会引起医疗纠纷。

本文实验结果表明,采用 EDTA 法对 EDTA-PTCP 患者的血样进行检测,组内 PLT 计数结果在采样后 3h 内降低较为明显,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而采用静脉血真空采血管预稀释法检测 EDTA-PTCP 患者的血样,3h 内整体的 PLT 计数结果稳定,虽 PLT 计数结果随着血样放置时间 (1h, 2h, 3h) 而稍有降低,但差异无统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 证明静脉血真空采血管预稀释法对临床 EDTA 依赖性假性血小板减少的 PLT 计数结果有较好的校正作用。不同时间段 (1h, 2h, 3h) 的静脉血真空采血管预稀释法测得的 PLT 值与 EDTA 真空采血管法所得 PLT 计数值之差的结果差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且  $\bar{d}$  均远大于 0, 证明静脉血真空采血管预稀释法对血小板具有保护作用,这是由于此次实验使用不含抗凝剂的非溶血性稀释液来稀释患者的静脉血,稳定血小板膜表面糖蛋白 GPIIb/IIIa, 防止出现隐蔽抗原的暴露,同时通过固定比例 (1:10) 的稀释来降低抗体的滴度,以此



来有效地拮抗抗凝剂诱发的血小板聚集。

静脉血真空采血管预稀释法解决了抗凝管带来的血液聚集问题。以其结构简单,具有精准的刻度线,用来稀释静脉全血,防止抗凝剂(钙离子螯合剂)诱发暴露血小板膜上糖蛋白 GPIIb 中的自身抗原(Ag);预稀释真空采血管内血溶液中所有凝血因子的浓度因大比例稀释静脉血液而降低,增大凝血因子之间的距离,阻断凝血因子之间的链式激活,从而阻止预稀释真空采血管内血溶液的凝固<sup>[6]</sup>;通过采血管上的精密刻度,保证采集静脉血液血量的准确可靠;采集静脉血,防范采集末梢血时,组织液及皮肤表面残留物质对血液的稀释和干扰、对血小板及凝血因子的活化;以往开放式采集血液由于操作者和环境的污染,导致血液样本的再现性受到影响,现通过真空采血的方式,采用预稀释真空采血管,实现血液采集、制样保存为一体,简化操作,保证血小板数目的准确可靠;且采用预稀释真空采血管进行临床采集血样,综合了采血、稀释、抗凝、血样保存一步完成,降低临床操作难易度,增加血液样本的再现性,且静脉采血已在临床广泛应用,使此法更易于推广。

综上所述,使用静脉血真空采血管预稀释法校正 EDTA-PTCP 患者的血小板计数减少问题,具有简单、有效、彻底、可靠的优点,避免临床误诊误治。

#### 参考文献:

- [1] 欧洋华. 乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(11): 1942-1944.  
OU Yanghua. Research Progress in pathogenesis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia [J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(11): 1942-1944.
- [2] 姜树朋, 李艳. 纠正 EDTA 依赖性假性血小板减少的方法学研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(17): 3194-3195.  
JIANG Shu-peng, LI Yan. Research development of correction methodology of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia [J]. Medical Recapitulate, 2015, 21(17): 3194-3195.
- [3] FARHI DC. Pathology of bone marrow and blood cells [M]. 2nd Ed. Wolter kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [4] 关向前, 陈发珍. EDTA 依赖性血小板聚集及其对血小板计数的影响 [J]. 临床输血与检验, 2015, 17(3): 239-242.  
GUAN Xiangqian, CHEN Fazhen. Influence of EDTA dependent platelet aggregation of platelet counting [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2015, 17(3): 239-242.
- [5] SAKURAI S, SHIOJIMA I, TANIGAWA T, et al. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia [J]. British Journal of Haematology, 1997, 99(4): 817-823.
- [6] 邵永生, 张嵩. 阻抗法稀释模式在 EDTA 依赖性假性血小板减少症中的研究 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(2): 303-305.  
SHAO Yongsheng, ZHANG Song. Study on impedance dilution mode in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia [J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(2): 303-305.

收稿日期: 2020-06-29

修回日期: 2020-07-17

(上接第 113 页)

- [9] 袁利, 程明刚, 刘香萍, 等. 深圳地区健康育龄妇女血清中 AMH 水平现况及其在 PCOS 和 POF 诊疗中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(5): 141-144.  
YUAN Li, CHENG Minggang, LIU Xiangping, et al. Status of AMH in serum of healthy women age in Shenzhen area and its value in the diagnosis and treatment of PCOS and POF treatment [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5): 141-144.
- [10] 毛维维, 伊桂叶. 不同肥胖类型患者血清代谢指标与内脏脂肪指数的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 1-3, 8.  
MAO Weiwei, Yi Guiye. Correlation adiposity between serum metabolic indexes and different obesity types visceral adiposity index of [J]. J Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(5): 1-3, 8.

- [11] 马清光, 李慧敏, 程晓超, 等. 超重孕妇肥胖抑制素、炎症因子水平及相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6): 65-68.  
MA Qing-guang, LI Hui-min, CHENG Xiao, et al. Study on the correlation between obestatin and inflammatory factors in prepregnancy overweight women [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(6): 65-68.
- [12] 莫军, 杨丽珍, 李景, 等. 化学发光法检测妇女血清睾酮及其临床应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 105-106.  
MO Jun, YANG Lizhen, LI Jing, et al. Chemiluminescence assay of serum testosterone in women and its clinical application [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2007, 22(2): 105-106.

收稿日期: 2020-11-03

修回日期: 2020-11-17

# 全自动酶免分析仪和酶标板快速孵育器联合进行 ELISA 检测操作其时间流程优化的实用性探讨

韩小娟<sup>1</sup>, 赵 玥<sup>2</sup>, 田洪伦<sup>1</sup>, 何 军<sup>1</sup>

(1. 贵州省第二人民医院检验科, 贵阳 550004; 2. 温州医科大学检验医学院生命科学学院, 浙江温州 325035)

**摘要:** **目的** 采用全自动酶免分析仪和酶标板快速孵育器相结合, 优化酶联免疫吸附操作流程, 缩短检测时间, 提高工作效率。**方法** 收集化学发光法检测结果为高 ( $\geq 250$  IU/ml)、中 (101~250 IU/ml)、低 (0.05~100 IU/ml) 值的 HBsAg 阳性标本及阴性对照各 50 例, 分别用全自动酶免分析仪, 以及全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器设置孵育时间为常规时间的 1/2, 1/3, 1/4 进行检测, 比较与化学发光检测结果的差异性。**结果** 与化学发光检测相比较, 全自动酶免分析仪对 HBsAg 的检测结果差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.053$ ,  $P>0.05$ ), 全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器分别缩短孵育时间至常规 1/2, 1/3 和 1/4 对 HBsAg 检测结果差异均无统计学意义 ( $\chi^2=0 \sim 0.323$ , 均  $P>0.05$ )。各方法比较差异均无统计学意义, 但其中将快速孵育时间缩短至试剂盒规定时间的 1/2 时的总样本符合率和敏感度最高。**结论** 全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器缩短孵育时间至常规的 1/2 时, 显著提高检测结果准确度, 同时提高工作效率, 在临床标本检测中具有较高的推广应用价值。

**关键词:** 酶联免疫吸附法; 酶标板快速孵育; 联合检测; 时间优化

**中图分类号:** R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-159-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.039

## Discussion on the Practicability of the Time Optimization of ELISA Detection Operation with the Combination of Automatic Enzyme Immunoassay Analyzer and Enzyme Plate Rapid Incubator

HAN Xiao-juan<sup>1</sup>, ZHAO Yue<sup>2</sup>, TIAN Hong-lun<sup>1</sup>, HE Jun<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, China; 2. School of Life Sciences, School of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325035, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the method of optimizing the operation flow of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), shortening incubation time and improving work efficiency by using the combination of rapid incubation method and automatic enzyme immunoassay analyzer. **Methods** Collected 50 HBsAg negative specimens and positive specimens with high ( $\geq 250$  IU/ml), medium (101~250 IU/ml), and low (0.05~100 IU/ml) values by chemiluminescence method, respectively. Detection with automatic enzyme immunoassay analyzer and combined detection with automatic enzyme immunoassay analyzer and rapid incubator combined were carried out simultaneously. At the same time, the rapid incubation time was shortened to 1/2, 1/3 and 1/4 of the kit's prescribed time. And then compared the results with the chemiluminescence method. **Results** Compared with chemiluminescence detection, the results of HBsAg detection by the automatic enzyme free analyzer were not statistically significant. The results of HBsAg detection by the automatic enzyme free analyzer combined with the rapid incubator of enzyme label plate reduced the incubation time to 1/2, 1/3 and 1/4, respectively, the difference were not statistically significant. There were no statistically significant differences among the methods, but the total sample coincidence rate and sensitivity were the highest when the rapid incubation time was reduced to 1/2 of the time specified by the kit. **Conclusion** When the automatic enzyme-free analyzer combined with the rapid incubator of enzyme-label plate shorted the incubation time to 1/2 of the routine, the detection accuracy and work efficiency were significantly improved, which had a high value of popularization and application in clinical specimen detection.

**Keywords:** enzyme-linked immunosorbent; enzyme-labeled rapid incubator; joint detection; time optimization

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 具有简便、快速、成本低等优点而被临床广泛运用<sup>[1-3]</sup>。近年来, 由于全自动酶免分析仪能减少人工成本及人为操作误差, 使检测

作者简介: 韩小娟 (1980-), 女, 学士, 主管技师, 主要从事临床免疫学检验, E-mail: 51031171j@qq.com。

通讯作者: 何军 (1978-), 男, 硕士, 主任技师, 从事临床免疫学研究, E-mail: gzghyjjj@163.com。

流程更加标准和规范,提高检测结果的精确性和可溯源性,因此在临床检验中受到广泛应用。但全自动酶免仪样本孵育时间长,影响临床样本检测效率。酶标板快速孵育器因能缩短孵育时间,提高工作效率,在临床检验中的应用越来越多,但快速孵育法仍需要人工加样,增加了人工参与造成的误差。本实验通过利用全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器检测乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg),探讨优化 ELISA 操作流程在临床检验中的实用性。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月~2019 年 9 月经化学发光法定量检测 HBsAg 阳性高值( $\geq 250$  IU/ml)、中值(101~250 IU/ml)、低值(0.05~100 IU/ml)样本各 50 例,HBsAg 阴性样本 50 例。其中男性 112 例,女性 88 例,年龄 4~93 岁,平均年龄 46 岁。

1.2 仪器与试剂 四川迈克 i3000 化学发光免疫分析仪,嘉兴科瑞迪全自动酶联免疫分析仪(HB-500E),成都盖森酶标板快速孵育器(MKF-6)。迈克生物股份有限公司化学发光法乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒,北京万泰生物药业有限公司酶联免疫法乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒。

## 1.3 方法

1.3.1 所有收集的血清样本均保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中直至分析。取出待检样本置于室温至完全融化混匀,待测。

1.3.2 化学发光法定量检测 HBsAg (C 法):按照迈克生物股份有限公司乙型肝炎病毒表面抗原检测试剂盒说明书和仪器 SOP 操作,并严格执行质控标准。

1.3.3 ELISA 定性检测 HBsAg:试剂盒室温放置 30min 后分别用四种实验方法检测,A 法:使用全自动酶免分析仪进行孵育检测;B1, B2, B3 法:均使用全自动酶免分析仪加样、加试剂、洗板、比色,孵育时转移到酶标板快速孵育器进行孵育,其中 B1 法孵育时间为说明书规定时间的 1/2, B2 法孵育时间为说明书规定时间的 1/3, B3 法孵育时间为说明书规定时间的 1/4,具体孵育时间见表 1,其他操作步骤严格遵守试剂盒说明书和仪器 SOP 进行。

1.3.4 计算每份样本的 S/CO 值:以 S/CO 值 $\geq 1$ 时判断为样本 HBsAg 阳性, S/CO 值 $< 1$ 时判断为样本 HBsAg 阴性。A, B1, B2, B3 法分别与化学发光法(C 法)进行差异比较,同时计算各方法的总样本符合率、敏感度和特异度。

表 1 各方法实验孵育时间

方法	孵育时间 1 (min)	孵育时间 2 (min)	显色时间 (min)	总反应时间 (min)
A	60	30	30	120
B1	30	15	15	60
B2	20	10	10	40
B3	15	7.5	7.5	30

1.3.5 精密度评价实验:选用试剂盒配套的 HBsAg 阴阳性对照及第三方弱阳性质控品,使用 ELISA (A, B1, B2, B3 法)方法进行检测,每个质控品连续重复测定 20 次,计算变异系数(CV%)。

1.4 统计学分析 使用 SPSS19.0 统计软件对实验结果进行统计学处理,多组间差异的比较采用卡方( $\chi^2$ )检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各方法检测 HBsAg 精密度结果 见表 2。根据说明书要求,阴性对照结果吸光度值 $<0.10$ 、阳性对照结果吸光度值 $>0.80$ 时实验结果有效,第三方弱阳性质控 S/CO 值为 2~5 有效。20 次质控实验中,阴性对照结果吸光度均值 0.008,阳性对照结果吸光度均值 3.68,第三方弱阳性质控 S/CO 均值为 3.98,实验结果有效。A, B1, B2, B3 法批内重复性实验(精密度)判断标准为说明书要求的精密度变异系数(CV%) $\leq 15\%$ ,均在要求以内。

表 2 各方法对 HBsAg 的精密度检测 (CV%)

方法	A 法	B1 法	B2 法	B3 法	判断标准
阴性质控	3.89	3.58	4.12	4.56	$\leq 15$
阳性质控	2.23	1.89	2.11	2.67	$\leq 15$
弱阳性质控	2.74	2.31	2.70	2.86	$\leq 15$

2.2 各方法检测 HBsAg 定性结果 见表 3。各方法与化学发光法(C 法)检测结果进行比较,只有全自动酶免仪联合酶标板快速孵育器孵育时间缩短 1/2 (B1 法)时的阴阳性检测结果与化学发光法完全一致,全自动酶免仪单独检测(A 法)时阴性结果一致,阳性结果有 2 例不一致。但所有结果差异均无统计学意义( $\chi^2=0\sim 0.323$ ,均 $P>0.05$ )。

2.3 各方法检测 HBsAg 总样本符合率、敏感度、特异度情况 见表 4。



表3 各方法检测 HBsAg 定性结果 (n=200)

方法		C法		$\chi^2$	P
		+(150)	-(50)		
A法	+	148	0	0.053	0.819
	-	2	50		
B1法	+	150	0	0.000	1.000
	-	0	50		
B2法	+	149	0	0.130	0.908
	-	1	50		
B3法	+	145	0	0.323	0.570
	-	5	50		

表4 各方法检测 HBsAg 总样本符合率、敏感度、特异度情况 (%)

方法	结果符合 (n)	总样本符合率	敏感度	特异度
A	198	99.00	98.67	100.00
B1	200	100.00	100.00	100.00
B2	199	99.50	99.33	100.00
B3	195	97.50	96.67	100.00

### 3 讨论

基于 ELISA 具有成本低、简便、灵敏等优点,因而 ELISA 的临床检验项目在各级医院都得到广泛开展。近年来,同一 ELISA 检测方法在不同检测系统间的阳性符合率也越来越得到人们关注<sup>[4]</sup>。在 ELISA 实验中,孵育是检测中影响检测成败的最关键因素之一<sup>[5]</sup>,因此,在确保检测结果准确性的前提下,优化检测流程和缩短检测时间对临床检验实际工作有重要的参考意义。

本研究以化学发光法作为检测的金标准,本次实验收集所有样本的乙肝血清学模式均为 HBsAg, HBeAg 和 HBcAb 阳性或 HBsAg, HBeAb 和 HBcAb 阳性。本次实验采用全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器新流程。新流程在缩短 1/2 时间的情况下,其检测 HBsAg 项目的敏感度比单纯的全自动酶免分析仪敏感度更高。由此可见,新流程极大地缩短了检验项目的时长,减少了临床医生和患者的等待时间。当新流程将孵育时间缩短为原规定时间的 1/3 和 1/4 时,虽然和化学发光法检测结果比较差异无统计学意义,但敏感度相对较低,有阳性漏检的可能,所以不推荐将孵育时间缩短为原时间的 1/3 和 1/4。

本研究还发现,全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器检测一些低滴度阳性标本中的敏感度高于全自动酶免分析仪,其原因可能为酶标板快速孵育器的升温原理不一样。酶标板快速孵育器的原理主要是通过发热模块产生空气循环加热,使用多个方向风扇旋转使孵育腔内形成流动气体,保证温度

的均匀性,且孵育全过程中结合振荡,促进抗原抗体结合,能一定程度上增加试剂的灵敏度<sup>[6]</sup>。而全自动酶免孵育室只有微孔板金属载架加温,反应板孔受热不均匀,孵育室整体空间比较大,升温曲线较慢,温度不准确,以及反应板周围环境可达到预期温度而孔内温度不能达到预期温度<sup>[7-8]</sup>。因此,在孵育过程中其实有大量的时间是用于升温过程,而最佳孵育段的时间并没有那么长。由此,金属底板单面加热可能是 ELISA 自动化仪器的缺陷<sup>[9]</sup>。

研究中,HBsAg 含量越低,快速孵育缩短的时间越短,ELISA 漏检率越高。本文结果与刘丽等<sup>[6]</sup>人的研究结果相比,缩短 1/3 时间敏感度略有不同,可能与本文所选取的低值样本较多和仪器试剂的敏感度不同有关。且本实验除孵育环节不一致外,其它步骤均由同一仪器操作完成,减少了实验的系统误差和偶然误差,使结果更具可比性。

通过本研究证实,优化后的全自动酶免分析仪联合酶标板快速孵育器的方法检测 HBsAg,将孵育时间缩短至规定时间的 1/2,在确保结果准确性的同时,缩短了整个检验项目的检测时间,提高了工作效率,这对临床标本的检测具有重要的应用价值。

### 参考文献:

- [1] 邓安彦,蔡艳娟,周守容,等. ELISA 法检测 HBsAg (CMIA) 低值血清样本的结果分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2015,30 (2): 123-125.  
DENG Anyan, CAI Yanjuan, ZHOU Shourong, et al. Analysis of the results of ELISA by detecting low quantitative HBsAg(CMIA) in serums [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015,30 (2): 123-125.
- [2] 辛晓阳,徐立群,潘峰. 化学发光免疫分析技术和酶联免疫吸附试验在乙肝病毒血清学检验中的价值分析 [J]. 中国现代医生, 2018,56 (10): 127-130.  
XIN Xiaoyang, XU Liqun, PAN Feng. Analysis on the value of chemiluminescence immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in serological detection of hepatitis B virus [J]. China Modern Doctor, 2018,56 (10): 127-130.
- [3] WILLIAMS S, SCHULZ P, SIERKS M R. A sensitive phage-based capture ELISA for sub-femtomolar detection of protein variants directly from biological samples [J]. Biotechnology Progress, 2015, 31(1): 289-298.
- [4] 李娅,章迪,张赞,等. 罗氏 cobas e602 与 modular e170 电化学发光分析仪检测血清 HBsAg 阳性低值结果的对比分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2017,32 (3): 123-125.  
LI Ya, ZHANG Di, ZHANG Yun, et al. Study on the low positive results of detecting HBsAg in serum specimens with Roche Cobase602 and Modular e170 electrochemical luminescence analyzer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017,32 (3): 123-125.
- [5] 李晓霞,迟伟群,姚玉虹,等. 温湿度对高通量 ELISA 检测系统检测梅毒螺旋体抗体影响的分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2015,22 (1): 46-51.  
LI Xiaoxia, CHI Weiqun, YAO Yuhong, et al. Influence of temperature and humidity on detection of treponema pallidum antibodies with high-throughput ELISA

- system[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2015,22 (1):46-51.
- [6] 刘丽,何露,孔凡虹,等.应用快速孵育法优化酶联免疫吸附实验过程探讨-以乙型肝炎病毒表面抗原检测为例[J].标记免疫分析与临床,2016,23 (9):1073-1076.
- LIU Li, HE Lu, KONG Fanhong, et al. Evaluation of rapid incubation optimization process of enzyme-linked immunosorbent assay on hepatitis B surface antigen detection[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2016,23 (9): 1073-1076.
- [7] 赵彤.全自动酶免疫分析仪温育时间对系统检测的影响[J].内蒙古医学杂志,2013,45 (2): 225-226.
- ZHAO Tong. Effect of incubation time on the detection of enzyme in automated enzyme immunoassay system [J]. Inner Mongolia Medical Journal, 2013,45 (2): 225-226.
- [8] 李媛,谭艳,韩晓芳.ELISA检测血清HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV灰区设定的探讨[J].国际检验医学杂志,2017,38 (6):810-812.
- LI Yuan, TAN Yan, HAN Xiaofang, et al. Detection of HBsAg, anti-HCV, anti-TP and anti-HIV in sera by ELISA [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017,38 (6):810-812.
- [9] 徐国锋,徐飞,任碧琼,等.不同温育模式对全自动酶联免疫分析仪检测结果的影响[J].临床检验杂志,2015,33 (9):657-658.
- XU Guofeng, XU Fei, REN Biqiong, et al. Effects of different incubation modes on the results of ELISA [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2015,33 (9):657-658.
- 收稿日期:2020-02-21 修回日期:2020-07-31
- (上接第71页) young adults: A registry-based study [J]. Journal of the American Heart Association, 2016,5(5):e003158.
- [10] 杨欢,张珊珊,钱海洲,等.年轻型缺血性脑血管病的特点及病因分析[J].中国继续医学教育,2020,12(4):101-103.
- YANG Huan, ZHANG Shanshan, QIAN Haizhou, et al. Characteristics and etiology of ischemic cerebrovascular disease in young adults[J]. China Continuing Medical Education, 2020,12(4):101-103.
- [11] 赵忠新,张照环.分别从临床与细胞水平看睡眠障碍与脑血管病之间的联系[J].中国卒中杂志,2015,10(1):15-19.
- ZHAO Zhongxin, ZHANG Zhaohuan. Association between sleep disorders and cerebrovascular disease at clinical and cellular levels[J]. Chinese Journal of Stroke, 2015,10(1):15-19.
- [12] 徐琰.益肾活血法治疗缺血性脑卒中后失眠(肾阴虚兼血瘀型)的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2011.
- XU Yan. The clinical study of nourishing kidney yin and promoting blood circulation on treating aypnia after ischemic stroke (combination of blood stasis and kidney yin deficiency [D]. Haerbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [13] 吴乐昌.血浆同型半胱氨酸、超敏C反应蛋白与颈动脉粥样硬化的相关性分析[J].青岛医药卫生,2019,51 (4):277-279.
- WU Lechang. Clinical correlation analysis between plasma homocysteine, high-sensitivity C-reactive protein and carotid atherosclerosis[J]. Qingdao Medical Journal, 2019,51(4):277-279.
- [14] 于玉英.瑞舒伐他汀钙片对缺血性脑血管病患者颈动脉硬化性狭窄伴斑块改变及超敏C-反应蛋白的影响[J].中国医药指南,2019,17(26):70-71.
- YU Yuying. Effect of rosuvastatin calcium tablets on carotid artery sclerosing stenosis with plaque changes and hypersensitive c-reactive protein in patients with ischemic cerebrovascular disease [J]. Guide of China Medicine, 2019,17(26):70-71.
- [15] 刘赵东.观察银杏二萜内酯葡胺注射液对动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期患者血液流变学的影响[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(74):156-157.
- LIU Zhaodong. Observation of the effect of ginkgo di-terpenoid lactone glucamine injection on hemorheology in patients with convalescent atherosclerotic thrombotic cerebral infarction [J]. Journal of Clinical Medical Literature (Electronic Edition), 2019,6(74):156-157.
- [16] KAMATH J, PRPICH G, JILLANI S. Sleep disturbances in patients with medical conditions[J]. The Psychiatric Clinics of North America, 2015, 38(4): 825-841.
- [17] GREISENEGGER S, ZEHETMAYER S, FERRARI J, et al. Clinical predictors of death in young and middle-aged patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: long-term results of the Vienna Stroke Registry: clinical predictors of ischemic stroke mortality in patients <60 years[J]. Journal of Neurology, 2011, 258(6): 1105-1113.
- [18] 魏蒙.太极推拿治疗慢性失眠的临床观察及对血清CRP、IL-6的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- WEI Meng. The clinical observation of Taichi Tuina in the treatment of chronic insomnia and its effect on serum CRP and IL-6[D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [19] 耿彪,宋婷阁,张鹏举,等.血清炎症因子与老年急性脑梗死颈动脉粥样硬化及预后的关系[J].现代检验医学杂志,2019,34(4):120-123, 127.
- GENG Biao, SONG Tingge, ZHANG Pengju, et al. Relationship between inflammatory factors in serum and carotid atherosclerosis and prognosis in elderly patients with acute cerebral infarction[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(4):120-123, 127.
- [20] 杨静,戚志强,周红,等.中性粒-淋巴细胞比值对急性脑梗死患者颅内外动脉狭窄的预测研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(6):890-893.
- YANG Jing, QI Zhiqiang, ZHOU Hong, et al. Prediction of intracranial and extracranial stenosis in patients with acute cerebral infarction by neutrophil to lymphocyte ratio [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science edition), 2019,39(6):890-893.
- [21] SCHNEIDER S, KORNEJEVA A, VIBO R, et al. Risk factors and etiology of young ischemic stroke patients in Estonia[J]. Stroke Research and Treatment, 2017, 2017: 8075697.
- [22] THIMGAN M S, GOTTSCHALK L, TOEDEBUSCH C, et al. Cross-translational studies in human and Drosophila identify markers of sleep loss[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61016.
- 收稿日期:2020-07-22 修回日期:2020-10-09

# 体外受精 - 胚胎移植 (IVF-ET) 胚胎培养液中 HLA-G 检测在预测胚胎发育潜能和临床结局中的应用价值研究

罗 平, 沈开元, 卢 娜, 罗江霞, 黄 芬, 刘刚毅 (柳州市人民医院生殖医学科, 广西柳州 545006)

**摘要:** **目的** 探讨培养液中可溶性人类白细胞抗原 G (HLA-G) 表达水平在预测胚胎发育潜能、评估临床结局中的应用价值。**方法** 选取 2017 年 12 月~2019 年 8 月在柳州市人民医院生殖医学科接受体外受精 - 胚胎移植 (IVF-ET) 治疗的不孕不育夫妇共 156 对, 收集其胚胎培养第三天 (D3) 或第五天 (D5) 的培养上清液, 检测培养液中 HLA-G 浓度。根据移植临床结局分为临床妊娠组和未妊娠组, 根据移植胚胎培养液 HLA-G 浓度按 D3 卵裂期胚胎  $\geq 2.5$  U/ml 或 D5 囊胚  $\geq 6.8$  U/ml 分为高浓度组和低浓度组分别进行比较, 同时对 D3 胚胎继续培养形成囊胚情况及不同级别囊胚培养液 HLA-G 含量进行比较分析。**结果** 临床妊娠组和未妊娠组间的平均年龄、不孕年限、抗苗勒管激素 (AMH)、子宫内膜厚度、平均获卵数、受精率、优质胚胎率比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), HLA-G 浓度分别为  $7.38 \pm 4.12$  U/ml 和  $2.46 \pm 1.69$  U/ml, 两组比较差异有统计学意义 ( $t=3.628$ ,  $P < 0.01$ ); 形成优质囊胚、可用囊胚和不可用囊胚培养液中的 HLA-G 浓度分别为  $12.36 \pm 5.27$ ,  $8.15 \pm 3.69$  和  $5.62 \pm 3.10$  U/ml, 三组比较差异有统计学意义 ( $t=2.856$ ,  $P < 0.05$ ); HLA-G 高浓度组临床妊娠率和胚胎种植率分别为 69.41% (59/85) 和 49.60% (62/125), 均高于 HLA-G 低浓度组 46.05% (35/76) 和 26.78% (30/112), 差异有统计学意义 ( $\chi^2=9.011$ , 12.946, 均  $P < 0.01$ ), 两组之间的生化妊娠率和流产率比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.527$ , 0.368, 均  $P > 0.05$ )。**结论** 检测胚胎培养液中 HLA-G 水平可作为胚胎发育潜能的预测指标, 联合形态学评分进行胚胎移植可获得较好的临床结局。

**关键词:** 体外受精 - 胚胎移植; 胚胎培养上清液; 可溶性人类白细胞抗原 G; 发育潜能; 临床结局

**中图分类号:** R394-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-163-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.040

## Correlation between HLA-G Detection in (IVF-ET) Embryo Culture Medium and Embryonic Development Potential and Clinical Outcome Abstract

LUO Ping, SHEN Kai-yuan, LU Na, LUO Jiang-xia, HUANG Fen, LIU Gang-yi

(Reproductive Medicine Center, Liuzhou People's Hospital, Guangxi Liuzhou 545006, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application value of soluble human leucocyte antigen G (sHLA-G) expression in culture medium in predicting embryo development potential and evaluating clinical outcome. **Methods** 156 infertile couples treated with in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the Department of Reproductive Medicine of Liuzhou People's Hospital from December 2017 to August 2019 were selected to collect the culture supernatant from the third (D3) or fifth (D5) day of embryo culture and to detect the HLA-G concentration in the culture medium. The clinical pregnancy or non-pregnant group was divided according to the clinical outcome of transplantation. According to the HLA-G content in medium, HLA-G  $\geq 2.5$  U/ml from day 3 embryo culture medium or HLA-G  $\geq 6.8$  U/ml from day 5 blastocyst was regarded as HLA-G high group. HLA-G  $< 2.5$  U/ml from day 3 embryo culture medium or HLA-G  $< 6.8$  U/ml from day 5 blastocyst was regarded as HLA-G low group. The blastocyst formation rates and the HLA-G contents in culture medium from different grade blastocyst were compared. **Results** There was no significant difference in the mean age, infertile years, AMH, endometrial thickness, average number of oocytes retrieved, fertilization rate and high quality embryo rate between clinical pregnancy and non-pregnant groups (all  $P > 0.05$ ), but was statistically significant difference in HLA-G concentration from culture medium ( $t=3.628$ ,  $P < 0.01$ ,  $7.38 \pm 4.12$  U/ml and  $2.46 \pm 1.69$  U/ml, respectively). The HLA-G concentration in the culture medium from high quality blastocyst, available blastocyst and unavailable blastocyst groups were  $12.36 \pm 5.27$ ,  $8.15 \pm 3.69$  and  $5.62 \pm 3.10$  U/ml, respectively, which were significant differences ( $t=2.856$ ,  $P < 0.05$ ). The clinical pregnancy rate and embryo implantation rate in HLA-G high group were 69.4% (59/85) and 49.6% (62/125), respectively, which significantly higher than those in HLA-G low group 46.05% (35/76) and 26.78% (30/112), respectively ( $\chi^2=9.011$ , 12.946,  $P < 0.01$ ). No significant difference was found in biochemical pregnancy rate and abortion rate between HLA-G high and HLA-G low groups ( $\chi^2=0.527$ , 0.368, all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Combined

**基金项目:** 广西自然科学基金青年基金项目 (2018GXNSFBA281048); 广西壮族自治区卫健委课题 (Z20170677)。

**作者简介:** 罗平 (1971-), 男, 学士学位, 副主任技师, 研究方向: 人类辅助生殖, E-mail: LUOP521@163.com。



with morphological score, the detection of HLA-G content in the embryo culture medium can be used as a predictor of embryo development potential for a better clinical outcome in embryo transplantation.

**Keywords:** IVF-ET; supernatant of embryo culture medium; soluble HLA-G; developmental potential; clinical outcome

体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术的诞生为广大不孕不育患者解决了生育难题,虽然该技术的临床妊娠率已达到40%~60%,但因为追求妊娠率而导致的多胎妊娠已成为最常见的并发症之一,其带来的孕产期风险及后代安全隐患越来越明显,因此选择具有发育潜能的单胚胎移植以避免多胎妊娠已经成为趋势。目前评价胚胎质量的主要方法是形态学评估法,但该方法具有一定的局限性<sup>[1]</sup>,不能很好地预测胚胎的发育潜能。人类白细胞抗原 HAL-G (human leukocyte antigen G, HLA-G) 基因在1987年被成功克隆,它是组织主要相容性抗原(major histocompatibility complex, MHC) Ib 类家族成员,与其他 HLA I 基因具有同源的分子结构<sup>[2]</sup>, HLA 家族蛋白广泛应用于癌症以及一些遗传疾病的诊断<sup>[3]</sup>,是一类敏感性较高的疾病标记物。HLA-G 已被证实存在未受精的卵母细胞及早期胚胎的二细胞至囊胚阶段均有表达,其表达水平在每个发育阶段的胚胎中都有着不同的变化<sup>[4]</sup>,在早期胚胎的培养液中也检测到可溶性 HLA-G 的存在并且证实其蛋白表达浓度可能与妊娠结局密切相关<sup>[5-6]</sup>。本研究通过检测胚胎培养上清液中的 HLA-G 含量,探讨 HLA-G 在评估早期胚胎质量、预测胚胎发育潜能中的应用价值,为临床实施选择性单胚胎移植提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 2017年12月~2019年8月在我院生殖医学科接受辅助生殖技术 IVF-ET 治疗的不孕不育夫妇共156对,女方平均年龄34.25岁,平均不孕年限 $3.56 \pm 1.89$ 岁,入组标准:女方年龄 $\leq 37$ 岁,基础激素水平正常,排除标准:①子宫内异位症或子宫畸形、腺肌症;②输卵管积水或宫腔积液;③盆腔黏连;④有家族遗传病史;⑤夫妇染色体核型分析异常。

1.2 试剂和仪器 胚胎培养液购自瑞典 Vitrolife 公司,胚胎冷冻液、解冻液购自日本 KITAZATO 公司,HLA-G 检测试剂盒购自捷克 Exbio 公司,胚胎培养箱(型号:C200)购自德国 Labotect 公司,酶标仪(型号:MK-3)购自美国 ThermoFisher 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 促排卵及取卵:严格按本中心超促排卵方案促排卵,当有2个或以上卵泡直径达到18mm时注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)扳机启动,36h后通过阴道B超引导下穿刺取卵,所获得卵冠丘复合

物清洗干净后置于受精培养液内继续培养2~4h后授精。

1.3.2 胚胎培养:授精后18~20h将已拆除颗粒细胞的受精卵转入卵裂培养基微滴(G1, Vitrolife, 瑞典)置于6ml/dl CO<sub>2</sub>, 5ml/dl O<sub>2</sub>, 37℃培养箱继续培养,标记正常受精卵。受精后第3天(D3)对胚胎进行形态学(细胞发育速度、卵裂球数目、均一性及碎片率)评分,胚胎评分I、II级为优质胚胎,III级以上为可用胚胎,IV级为不可用胚胎丢弃。本中心优质胚胎标准:卵裂球6~10个,大小均一,碎片率 $\leq 20\%$ ,胞质均匀。根据患者情况选取评分最高的2个优质胚胎移植或冷冻,剩余可用胚胎(III级以上正常受精胚胎)继续培养至第5天(D5)观察囊胚形成情况,采用单个培养法(每个液滴放一个胚胎)培养。用Gardner评分系统<sup>[7]</sup>进行囊胚评分,D5评分 $\geq 3BB$ 或D6 $\geq 4BB$ 视为优质囊胚,优质囊胚、可用囊胚移植或冷冻保存,不可用囊胚知情沟通后丢弃。

1.3.3 临床结局:胚胎移植14天后测尿HCG或血 $\beta$ -HCG,移植后4周B超检测孕囊及胎心搏动以确定是否临床妊娠。

1.3.4 实验室检测:分别收集第3天优质胚胎及第5天囊胚移植或冷冻后其对应的培养上清液30~35 $\mu$ l,保存于0.5ml的EP管中,标记后-20℃冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养液中HLA-G浓度,所有检测步骤均严格按照说明书操作。

1.4 统计学分析 用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 $t$ 检验;计数资料用率(%)表示,各组间率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同妊娠结局患者基本情况和HLA-G检测结果比较 本研究共纳入156对助孕患者总计194个新鲜胚胎(D3胚胎和D5囊胚)移植周期,根据妊娠结局分为临床妊娠组和未妊娠组,两组患者情况见表1。数据显示两组患者的平均年龄、不孕年限、抗苗勒氏管激素(AMH)、促性腺激素(Gn)天数、子宫内膜厚度、平均获卵数、受精率、优质胚胎率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),妊娠组胚胎培养液中的HLA-G表达水平显著高于未妊娠组和生化妊娠组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表1 胚胎移植临床结局各组间基本情况及 HLA-G 浓度的比较

项目	未妊娠组 (n=76)	生化妊娠组 (n=15)	临床妊娠组 (n=103)	$\chi^2/t$	P
平均年龄 (岁)	34.66 ± 4.78	34.44 ± 5.12	32.63 ± 4.25	0.956	0.347
不孕年限 (年)	3.93 ± 1.52	3.56 ± 1.72	3.76 ± 1.59	0.258	0.845
AMH (ng/ml)	2.79 ± 0.86	3.08 ± 1.15	2.93 ± 0.95	-0.759	0.453
获卵数 (枚)	12.95 ± 3.45	11.29 ± 2.98	13.12 ± 3.86	2.453	0.625
受精率 % (n)	81.32 (766/942)	79.57 (148/186)	82.34 (1119/1359)	1.028	0.598
优胚率 % (n)	47.34 (303/640)	46.28 (56/121)	48.61 (436/897)	0.384	0.825
囊胚形成率 % (n)	55.33 (301/544)	53.77 (57/106)	56.43 (443/785)	0.352	0.838
内膜厚度 (mm)	11.22 ± 1.85	10.84 ± 2.08	11.32 ± 2.24	0.745	0.568
HLA-G (U/ml)	2.46 ± 1.69	4.15 ± 2.64	7.38 ± 4.12	3.628	0.006

2.2 D3 胚胎继续培养囊胚形成情况及 HLA-G 在不同级别囊胚中的表达 根据 D3 继续培养胚胎级别分为 8 细胞优质胚胎组、其它优质胚胎组、8 细胞Ⅲ级胚胎组及其他可用胚胎组, 比较各组囊胚形成情况, 并分别检测形成囊胚培养液中 HLA-G 含量。结果显示 8 细胞优质胚胎组优质囊胚率、可用

囊胚率及囊胚形成率显著高于其他各组, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 形成优质囊胚、可用囊胚及不可用囊胚培养液的 HLA-G 均值分别为  $12.36 \pm 5.27$ ,  $8.15 \pm 3.69$  和  $5.62 \pm 3.10$  U/ml, 三组之间的差异有统计学意义 ( $t=2.856$ ,  $P < 0.05$ )。

表2 D3 胚胎继续培养形成囊胚情况的比较 [% (n)]

项目	8C 优胚组 (n=86)	优胚组 (n=115)	8C 三级胚组 (n=62)	可用胚胎组 (n=158)	$\chi^2$	P
优质囊胚形成率	30.23 (26)	21.74 (25)	20.96 (13)	5.06 (8)	29.008	<0.001
可用囊胚形成率	34.88 (30)	19.13 (22)	24.19 (15)	18.35 (29)	9.856	0.02
不可用囊胚形成率	10.47 (9)	15.65 (18)	12.90 (8)	24.05 (38)	8.88	0.031
合计	75.58 (65)	56.52 (65)	58.06 (36)	47.47 (75)	18.026	<0.001

2.3 HLA-G 浓度和胚胎移植临床结局的比较 见表 3。根据移植胚胎培养液 HLA-G 浓度, 按 D3 卵裂期胚胎  $\geq 2.5$  U/ml 或 D5 囊胚  $\geq 6.8$  U/ml 分为高浓度组和低浓度组, 比较两组胚胎移植后临床结

局。结果显示 HLA-G 高浓度组临床妊娠率、胚胎种植率显著高于低浓度组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 两组之间的生化妊娠率和流产率比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表3 HLA-G 浓度与胚胎移植临床结局的相关性比较 [% (n)]

项目	HLA-G 高浓度组	HLA-G 低浓度组	$\chi^2$	P
临床妊娠率	69.41 (59/85)	46.05 (35/76)	9.011	0.003
胚胎种植率	49.60 (62/125)	26.79 (30/112)	12.946	0.001
生化妊娠率	5.08 (3/59)	11.43 (4/35)	0.527	0.468
流产率	3.39 (2/59)	8.57 (3/35)	0.368	0.544

### 3 讨论

自 JURISICOVA A<sup>[4]</sup> 等首次在培养液中检出 HLA-G 后, 随着研究的深入 HLA-G 被认为对人类胚胎的发育和成功植入具有重要意义, 多篇报道也指出 sHLA-G 可以作为评价体外受精胚胎质量的指标并且能够获得更好的移植效果<sup>[8-10]</sup>。检测培养上清液 HLA-G 用来筛选更具发育潜能的优质胚胎进行移植, 有利于降低多胎妊娠的风险并能获得很好的临床结局。HLA-G 对人类早期胚胎植入影响的机理为 HLA-G 能够阻止由母源毒性淋巴细胞引起的同种识别以及保护目标细胞免受自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK-cell) 介导的溶解<sup>[11]</sup>, 抑制

子宫自然杀伤细胞的细胞毒作用和诱导细胞凋亡活化的 CD8 细胞中表达的因子, 从而保护胎儿滋养层细胞免受 NK 细胞杀伤<sup>[12]</sup>。通过诱导细胞因子的释放在胚胎与母体免疫耐受机制之间建立相应的“化学对话”以确保胎儿在母体内能安全发育<sup>[13-14]</sup>。

本研究结果显示, 胚胎移植临床妊娠组培养液中 HLA-G 浓度均值显著高于未妊娠组和生化妊娠组, 形成囊胚组培养液中 HLA-G 的浓度高于非囊胚组, 优质囊胚组高于非优质囊胚组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。证实 HLA-G 蛋白特异表达于囊胚滋养层细胞内并促使其往胎盘发育, 通过调控滋养层细胞的侵入能力并且促使子宫螺旋动脉血

管的重塑为胚胎的成功着床和妊娠维持做好准备,其表达水平和临床结局密切相关,可作为评价胚胎发育潜能的客观指标,为挑选单个胚胎移植避免多胎妊娠提供依据。对于全胚冷冻或冷冻周期,选择HLA-G表达水平高的胚胎(囊胚)移植,中心的临床妊娠率可由55%左右提高到69%,生化妊娠率和流产率降低至5%和3%。对于表达较高浓度HLA-G的胚胎仍有31%左右未能成功妊娠,除与患者本身的机体状态、子宫内膜容受性有关外,有研究<sup>[15]</sup>显示培养至第3日的胚胎种植前遗传学诊断(PGD)染色体显示异常时其培养液中仍可检测到HLA-G表达,提示染色体的异常可能影响了这部分胚胎的植入。同时我们还观察到对于第三天8细胞Ⅲ级胚胎其囊胚形成率、HLA-G水平与第三天非8细胞优质胚胎相比差异并无统计学意义,显示其亦具有较好的发育潜能,8细胞优胚的囊胚形成率、HLA-G含量与其他各组差异有统计学意义,提示我们在今后的胚胎形态学评分中应以胚胎的发育速度和卵裂球的均一性为主要评分依据。即往的文献报道大多为检测第三天胚胎上清液HLA-G表达水平,本研究中168枚可用囊胚培养上清液HLA-G均值显著高于第三天优质胚胎。证实HLA-G随着胚胎的不断分化而升高,可作为胚胎发育潜能的独立预测指标。

本研究的局限在于仅纳入≤37岁、卵巢功能正常患者且检测例数有限,对于卵巢低反应或高龄尤其是≥40岁患者,由于卵子的数量和质量下降,胚胎的发育潜能有限形成囊胚的几率也随之降低<sup>[16]</sup>,进行囊胚培养失败的几率升高而导致移植周期取消<sup>[17]</sup>,给患者造成较大的经济和心理上的压力,检测D3胚胎培养液HLA-G水平也许更有利于选择有发育潜能的胚胎移植。本研究结果真正应用于临床还需要更多的数据和扩大检测范围来证实。同时由于ELISA方法的局限性,培养液中杂质的干扰及检测的特异度、敏感度都会影响到检测值的真实性,而且检测尚未具备上机自动化操作,因此对于移植前HLA-G水平的检测仅限于冷冻胚胎移植周期而不适用于新鲜胚胎移植周期。

综上所述胚胎形态学评分结合HLA-G值可较好预测胚胎发育潜能,改善临床结局,为实施单胚胎移植策略提供客观依据。相较于其他侵入性检测方法而言,不仅能避免对胚胎的损害,同时也为评价早期胚胎的发育潜能提供客观依据。虽然在检测的时间点、检测标准以及灵敏度上仍然存在不少的争议,但不可否认利用HLA-G作为生物学标记预测早期胚胎发育潜能仍具有巨大的应用前景。

## 参考文献:

- [1] SJÖBLOM P, MENEZES J, CUMMINS L, et al. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics[J]. Fertility and Sterility, 2006, 86(4): 848-861.
- [2] ELLIS S A, SARGENT I L, REDMAN C W, et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line[J]. Immunology, 1986, 59(4): 595-601.
- [3] 林帝金, 刘纯岳, 方俊粤, 等. 乳腺肿瘤患者外周血中T淋巴细胞表面活化分子和Tregs的表达研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5):31-34,37.  
LIN Dijin, LIU Chunyue, FANG Junyue, et al. Expression of T lymphocyte surface activating molecules and tregs in peripheral blood of patients with breast neoplasia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5):31-34,37.
- [4] JURISICOVA A, CASPER R F, MACLUSKY N J, et al. HLA-G expression during preimplantation human embryo development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(1): 161-165.
- [5] 阳艳, 章汉旺, 魏玉兰, 等. 第3天移植的胚胎培养液sHLA-G表达与妊娠率和种植率的关系[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(4): 510-512.  
YANG Yan, ZHANG Hanwang, WEI Yulan, et al. Relationship between sHLA - G expression of culture media and pregnancy or implantation rates from day 3 embryo transfer[J]. Maternal & Child Health Care of China, 2008, 23(4): 510-512.
- [6] MOSAFERI E, MAJIDI J, MOHAMMADIAN M, et al. HLA-G expression pattern: reliable assessment for pregnancy outcome prediction[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2013, 3(2): 443-446.
- [7] GARDNER D K, LANE M, STEVENS J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. Fertility and Sterility, 2000, 73(6):1155-1158.
- [8] 樊桂玲, 王莉, 王春艳, 等. 胚胎培养液中sHLA-G的表达及其对IVF-ET妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(28):4629-4631.  
FAN Guiling, WANG Li, WANG Chunyan, et al. Expression of sHLA-G in embryo culture medium and its impact on pregnancy outcome of IVF-ET[J]. Maternal & Child Health Care of China, 2014, 29(28):4629-4631.
- [9] 郝天羽, 崔永魁, 刘晓雁, 等. 卵泡液和卵裂期胚胎培养液可溶性人类白细胞抗原G(sHLA-G)的表达与IVF-ET结局的相关性研究[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(6):387-393.  
HAO Tianyu, CUI Yongkui, LIU Xiaoyan, et al. Relationship between the expression of sHLA-G in follicular fluid and embryo culture fluid and the IVF-ET outcome[J]. Journal of Reproduction and Contraception, 2013, 33(6):387-393.

(下转第186页)



# 孕妇葡萄糖耐量和血清胰岛素及C-肽释放水平检测对妊娠糖尿病的诊断研究

任丽芬<sup>1</sup>, 张志平<sup>1</sup>, 徐蓓<sup>1</sup>, 陈建康<sup>1</sup>, 黄晓燕<sup>2</sup>

(1. 空军军医大学西京医院检验科, 西安 710032; 2. 陕西省人民医院中心实验室, 西安 710068)

**摘要:**目的 研究孕妇葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素、C-肽释放曲线特点, 探讨其对妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)的诊断价值。方法 选取2017年12月~2019年6月在西京医院进行产前检查的孕妇420例, 平均年龄 $30.6 \pm 4.5$ 岁, 根据OGTT测定结果将妊娠妇女分为妊娠糖尿病(GDM)组55例, 正常妊娠者(对照组)365例。分析各组OGTT、胰岛素和C-肽释放曲线特点, 比较各组胰岛素抵抗和胰岛分泌功能情况。结果 ① GDM组空腹、1h和2h血糖水平高于对照组( $t=5.599, 19.253, 5.486$ , 均 $P<0.05$ ), 3h血糖水平与对照组比较, 差异无统计学意义( $t=1.543, P>0.05$ ); GDM组和对照组空腹胰岛素、C肽水平比较差异无统计学意义( $t=1.698, 2.12$ , 均 $P>0.05$ ), 1h, 2h和3h胰岛素和C肽水平高于对照组( $t=2.662\sim 6.909$ , 均 $P<0.05$ )。胰岛素抵抗程度(HOMA-IR) GDM组高于对照组( $t=2.2, P<0.05$ ); 胰岛分泌功能(HOMA- $\beta$ ) GDM组低于对照组( $t=2.235, P<0.05$ )。② 约17.8%的孕妇葡萄糖耐量曲线、胰岛素释放曲线及C肽释放曲线呈“N字型”, 3h血糖、胰岛素及C肽未恢复至正常水平。③ GDM孕妇胰岛素、C肽释放出现峰值延迟。结论 OGTT正常孕妇中有部分存在N字形双峰, 胰岛素和C肽峰值后移, 表明存在胰岛功能受损; GDM孕妇较正常孕妇胰岛素抵抗更严重, 同时有胰岛 $\beta$ 细胞功能受损。

**关键词:** 孕妇; 葡萄糖耐量; 胰岛素; C肽; 胰岛素抵抗

中图分类号: R714.256; R446.112 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)06-167-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.041

## Study on Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus by Detection of Glucose Tolerance, Serum Insulin and C-peptide Release Levels in Pregnant Women

REN Li-fen<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-ping<sup>1</sup>, XU Bei<sup>1</sup>, CHEN Jian-kang<sup>1</sup>, HUANG Xiao-yan<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital Affiliated to the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the characteristics of glucose tolerance(OGTT), insulin and C-peptide(C-P) release curves of pregnant women, and explore the clinical value in the diagnosis of the gestational diabetes mellitus(GDM). **Methods** A total of 420 pregnant women with an average age ( $30.6 \pm 4.5$ ) who underwent prenatal examination at Xijing Hospital from December 2017 to June 2019 were recruited. Based on the OGTT measurement results, the included pregnant women were divided into gestational diabetes mellitus(GDM) group (55), and control group(365). The insulin resistance, insulin secretion of cell and the insulin and C-P release were compared among the three groups. **Results** ① The level of the fasting blood glucose, 1 hour and 2 hour glucose of group GDM were higher than the normal group( $t=5.599, 19.253, 5.486$ , all  $P<0.05$ ), and there was no statistical difference between 3 hour glucose levels of GDM and normal group ( $t=1.543, P>0.05$ ). The level of 1 hour, 2 hour and 3 hour INS and C-P of group GDM were higher than the normal group( $t=2.662\sim 6.909$ , all  $P<0.05$ ), and there was no statistical difference between 1 hour INS and C-P levels of GDM and normal group ( $t=1.698, 2.12$ , all  $P>0.05$ ). The insulin resistance(HOMA-IR) of women in GDM group was higher than the normal group( $t=2.2, P<0.05$ ). Insulin secretion of cell (HOMA- $\beta$ ) of women in GDM group was lower than the normal group( $t=2.235, P>0.05$ ). ② About 17.8% of pregnant women's glucose tolerance curve, insulin release and C-peptide release curve were "N-shape", 3 hour glucose, insulin and C-peptide levels were not return to normal level. ③ Delayed peak of insulin release and C-P release was found in GDM patients. **Conclusion** There were some N-shaped double peaks in normal pregnant women, delayed peak of insulin release and C-P release is one of the proof of  $\beta$ -cell dysfunction caused in normal pregnant women. The insulin resistance in GDM pregnant women were more severe than normal OGTT pregnant women, and there is dysfunction of islet  $\beta$  cells.

**Keywords:** pregnant women; glucose tolerance test; insulin; C-peptide; insulin resistance

作者简介: 任丽芬(1982-), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向: 主要从事临床检验及内分泌相关疾病研究, E-mail: renlifeng2004@163.com。

通讯作者: 黄晓燕, 女, 硕士, 研究方向: 胃癌早期诊断及干细胞治疗, E-mail: huangxy08@163.com。

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 是妊娠期最常见的并发症之一, 其发病率呈明显升高趋势<sup>[1]</sup>。GDM 对母婴的健康及生命安全都会有一定的威胁, 因此为保证母婴健康, 应及时发现并接受治疗。为保证临床诊断的准确性, 在 GDM 的筛查诊治中, 葡萄糖耐量、胰岛素、C 肽释放是常用检测项目<sup>[2]</sup>。对血中 C 肽、胰岛素浓度进行检测, 能够了解胰岛  $\beta$  细胞贮备功能。由于 C 肽的抗干扰性和稳定性, 还能弥补测定胰岛素的不足。本次研究回顾性分析我院门诊 420 例孕妇的临床资料, 分析葡萄糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素、C-肽释放曲线特点, 探讨其对 GDM 的诊断价值。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2017 年 12 月~2019 年 6 月在空军军医大学西京医院进行产前检查的孕妇 420 例, 根据 OGTT 测定结果将妊娠妇女分为 GDM 组 55 例, 平均年龄  $31.2 \pm 4.8$  岁, 平均孕周  $25.2 \pm 3.1$  周; 正常妊娠者 (对照组) 365 例, 平均年龄  $30.3 \pm 4.4$  岁, 平均孕周  $24.3 \pm 1.9$  周。所有研究对象及其家属均知情并签署知情同意书。纳入标准: ①妊娠期糖尿病患者和正常妊娠妇女自早孕期 (8~12 周) 在我院首次孕检和建档, 资料齐全。②孕 24~28 周行 75g OGTT 试验, 均符合第九版《妇产科学》中妊娠期糖尿病诊断标准, 空腹血糖  $\geq 5.1$  mmol/L、1h 血糖  $\geq 10.0$  mmol/L、2h 血糖  $\geq 8.5$  mmol/L, 满足上述任何一项即诊断为 GDM。排除标准: ①存在急慢性感染性疾病、肿瘤、心血管疾病者; ②既往存在糖耐量异常; ③严重肝肾功能障碍者, 并发精神智力障碍者。

1.2 仪器与试剂 血糖检测采用日立 7170 全自动生化分析仪及四川迈克葡萄糖试剂。胰岛素、C-肽的检测采用国产仪器 MAGLUMI 4000Plus 测定 (化学发光法), 试剂为配套试剂。

1.3 方法 OGTT 前禁食至少 8h, 要求孕妇在本实验 3 天前维持正常饮食。受检当日清晨空腹采血, 采血期间禁止剧烈运动、吸烟、吃口香糖。75g 葡萄糖粉溶于 250~300 ml 水中, 嘱咐孕妇 5min 内饮完, 分别取空腹、服糖后 1h, 2h, 3h 静脉血 3ml (从开始饮用葡萄糖水开始计时), 进行各时间点血糖 (FPG, PG1, PG2, PG3)、胰岛素 (FIns, 1hIns, 2hIns, hIns) 及 C-肽水平 (FC-P, 1hC-P, 2hC-P, 3hC-P) 的检测。

计算指标: 应用稳态模型评估法 (HOMA) 评价胰岛素抵抗性和胰岛  $\beta$  细胞功能。稳态模型胰岛素抵抗指数 ( $HOMA-IR = FINS \times FPG / 22.5$ )<sup>[3-4]</sup> 反映胰岛素抵抗, 数值越大, 表明外周组织对胰岛素越

不敏感。胰岛分泌功能指数 ( $HOMA-\beta = 20 \times FINS / FPG - 3.5$ )<sup>[5]</sup> 反映胰岛素分泌能力, 数值越大表明胰腺胰岛素分泌能力越强。

1.4 统计学分析: 采用统计学软件 SPSS17.0 及 Excel 对数据进行统计处理, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用  $t$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验。当  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患病率 420 例妊娠期孕妇通过 75g 口服葡萄糖耐量试验诊断为妊娠糖尿病的有 55 例, 检出率为 13.1%。

2.2 GDM 组和对照组糖耐量曲线特点 见表 1。GDM 组空腹血糖、1h, 2h 血糖水平高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。GDM 组 3h 与对照组 3h 血糖水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。糖耐量曲线特点: ①对照组: 300 例 (82.2%, 300/365) 服糖后 0.5~1h 出现峰值, 1~2 h 峰值开始下降, 2h 血糖  $\leq 7.6$  mmol/L, 其中 190 例 (63.3%) 在 3h 下降至 3~5 mmol/L, 66 例 (21.7%) 在 3h 下降至 5.1~6 mmol/L; 65 (17.8%) 例糖耐量曲线呈 “N 字型”, 有两个峰值, 第一个峰值出现在 0.5~1h, 第二个峰值出现在 3h, 其中 40 例 (61.5%) 在 3h 升高至 5~6.7 mmol/L, 12 例 (18.5%) 在 3h 上升至 6.8~8.5 mmol/L。还有 13 例 (20.0%) 孕妇 3h 血糖值约 4~5 mmol/L。② GDM 组: 55 例峰值出现在 0.5~1h, 峰值波动在 10.0~13.0 mmol/L, 其中 72% GDM 孕妇 2h 血糖值在 7~10 mmol/L。

表1 两组孕妇空腹血糖及服糖后 1, 2, 3h 血糖水平 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

项目	对照组 (n=365)	GDM 组 (n=55)	t	P
FPG	4.3 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.8	5.599	<0.05
PG1	7.1 $\pm$ 1.4	11.3 $\pm$ 1.3	19.253	<0.05
PG2	5.9 $\pm$ 1.1	8.9 $\pm$ 3.7	5.486	<0.05
PG3	4.5 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 3.5	1.543	>0.05

2.3 GDM 组和对照组胰岛素释放曲线特点 见表 2。GDM 组和对照组空腹胰岛素水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 1h, 2h, 3h 胰岛素水平孕妇组高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

胰岛素释放曲线特点: ①对照组孕妇胰岛素释放曲线出现两种趋势, 80% 孕妇胰岛素峰值出现在糖负荷后 0.5~1h, 其中 70% 的孕妇胰岛素峰值为空腹水平的 3~9 倍, 14.9% 的孕妇胰岛素峰值为空腹水平的 9~12 倍, 于 3h 恢复至接近空腹水平; 20% 孕妇呈现 “N 字型曲线”, 胰岛素空腹值略高于正常型, 峰值低于正常型, 出现在 0.5~1h, 32% 的孕妇胰岛素水平为空腹水平的 4~6 倍, 38% 的为

6~9倍, 2~3h出现不适当高水平。②GDM组孕妇空腹胰岛素升高, 曲线基线上移, 峰值出现在2h左右。60%峰值为基础值的5~10倍。

表2 两组孕妇空腹及服糖后1, 2, 3h胰岛素水平 ( $\bar{x} \pm s$ , mIU/L)

项目	对照组(n=365)	GDM组(n=55)	t	P
Fins	9.0 ± 3.2	14.1 ± 20.4	1.698	>0.05
1h Ins	55.4 ± 31.7	77.8 ± 42.3	4.251	<0.05
2h Ins	50.0 ± 26.4	83.8 ± 45.8	4.898	<0.05
3h Ins	22.2 ± 16.7	30.2 ± 30.4	2.662	<0.05

2.4 GDM组和对照组C肽释放曲线特点 见表3。GDM组与对照组空腹C肽水平比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), GDM组孕妇1h, 2h, 3h C肽水平高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

C肽释放曲线特点: 根据C肽基础值及餐后峰值和分泌时相, C肽释放曲线有三种类型: ①对照组中大部分刺激后高峰出现在0.5h或者1h, 升高幅度为空腹的2~6倍; 少部分呈现“N字型”, 空腹值与其他正常型孕妇无差异, 刺激后出现两个峰值, 餐后3h呈现不正常的高水平, 整个曲线呈双峰状。76%的孕妇餐后峰值为基础值的3~6倍。②GDM组空腹C肽值与正常孕妇相同或略高, 刺激后高峰出现在2h或者3h, 呈现延迟释放, 78%峰值升高幅度为空腹的3~7倍。

表3 两组孕妇空腹及服糖后1, 2, 3h C肽水平 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

项目	对照组(n=365)	GDM组(n=55)	t	P
FC-P	2.5 ± 1.5	2.9 ± 0.9	2.12	>0.05
1h C-P	9.2 ± 3.5	11.6 ± 3.7	4.355	<0.05
2h C-P	9.2 ± 3.4	13.0 ± 3.5	6.909	<0.05
3h C-P	5.6 ± 3.0	7.2 ± 3.8	3.211	<0.05

2.5 两组孕妇胰岛素抵抗和分泌功能比较 见表4。比较两组胰岛素抵抗和分泌功能, HOMA-IR GDM组高于对照组, HOMA-β 分泌功能 GDM组低于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表4 两组孕妇胰岛素抵抗和分泌功能比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组(n=365)	GDM组(n=55)	t	P
FPG(mmol/L)	4.3 ± 0.4	5.0 ± 0.8	5.599	<0.05
FIns(mIU/L)	9.0 ± 3.2	14.1 ± 20.4	1.698	>0.05
HOMA-IR	1.73 ± 0.70	3.15 ± 4.37	2.2	<0.05
HOMA-β	250.7 ± 157.5	194.9 ± 141.8	2.235	<0.05

### 3 讨论

妊娠期并发糖尿病会增加孕期并发妊娠高血压的风险, 增加孕妇产后患2型糖尿病的风险和分娩早产儿和巨大儿的风险<sup>[6]</sup>, 早期监测预防非常重要。ZHU等<sup>[7]</sup>报道, 2012年在我国15家医院分娩的15194例孕妇中, GDM发病率占19.7%。我国各地区报道的GDM发病率存在较大差异。2018年上半年深圳市妇幼保健院筛查GDM患病率为6.54%<sup>[8]</sup>。本研究中陕西地区妊娠糖尿病发病率为13.0%, 发病率比较高。17.8%的孕妇糖耐量曲线呈“N”形, 此现象可能与婴儿在母体内消耗血糖有关系, 但具体机制及原因至今未查明<sup>[9]</sup>, 同时笔者长期在检验工作中了解发现, 这部分孕妇大多空腹喝完糖水后有明显作呕反胃不适感, 部分在试验期间进行过大量运动, 提示应激反应对血糖结果有一定干扰。

本次研究把OGTT, 胰岛素释放试验和C-肽释放试验同时进行, 发现部分孕妇虽然糖耐量各诊断点均在正常范围, 但空腹胰岛素值明显升高, 餐后3h水平未恢复至正常水平, 同时出现胰岛素及C肽峰值的后延, 表明这部分孕妇已存在胰岛素抵抗, 胰岛β细胞功能有一定的下降。女性在妊娠过程中会出现慢性胰岛素抵抗表现, 此种表现多在孕早期出现, 孕中期、晚期更为明显, 若孕期出现慢性胰岛素抵抗则其发生妊娠糖尿病的风险会增加<sup>[10]</sup>。可见血糖正常孕妇在孕期进行胰岛素释放和C肽释放试验是非常有必要的。

本研究中GDM组孕妇与对照组比较, 胰岛素释放、C肽释放试验曲线出现峰值增高而且延迟, 同时出现胰岛素抵抗指数明显增高, 胰岛分泌功能指数减低。这和相关报道结论一致<sup>[11]</sup>, 这表明GDM患者有胰岛素抵抗, 也有胰岛β细胞功能的受损。因此, 最好能同时测定胰岛素及C肽水平, 监测胰岛β细胞功能。

总之, GDM及OGTT正常孕妇中有部分存在胰岛功能受损, 需要结合胰岛素释放、C肽释放试验才能够发现, 从而引起重视, 因此孕妇葡萄糖耐量及血清胰岛素、C-肽释放水平检测对妊娠糖尿病的诊断及治疗监测具有重要价值, 由此可见对孕妇进行OGTT以及胰岛功能的普查非常有必要。

### 参考文献:

- [1] 张玉婷, 孟海霞. 妊娠期糖尿病流行病学调查[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19(99):95-97.  
ZHANG Yuting, MENG Haixia. A prevalence survey on gestational diabetes mellitus[J]. World Latest Medicine Information (Continuous Electronic Journal), 2019, 99(19):95-97.



- [2] 黄裕春. 糖尿病患者胰岛素、C肽释放、糖耐量和糖化血红蛋白联合测定分析[J]. 临床医学工程, 2016, 23(2): 175-176.  
HUANG Yuchun. Combined detection of insulin, C-peptide release, glucose tolerance and glycated hemoglobin of diabetic patients[J]. Clinical Medical Engineering, 2016, 23(2): 175-176.
- [3] 吕朝晖, 潘长玉, 高妍, 等. 随机、双盲、安慰剂对照评价盐酸吡格列酮并用磺酰脲类药物治2型糖尿病的有效性和安全性[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(10): 826-830.  
LÜ Zhaohui, PAN Changyu, GAO Yan, et al. A randomized, double blind, placebo-controlled, parallel and multicenter study to evaluate the safety and efficacy of pioglitazone with sulphonyurea in type 2 diabetic patients[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2011, 50(10): 826-830.
- [4] VILELA B S, ANA CAROLINA J V, ROBERTA SOARES L C, et al. The HOMA-ddiponectin (HOMA-AD) closely mirrors the HOMA-IR index in the screening of insulin resistance in the Brazilian metabolic syndrome study (BRAMS)[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0158751.
- [5] KUSUNOKI Y, KATSUNO T, NAKAE R, et al. Insulin resistance and  $\beta$ -cell function influence postprandial blood glucose levels in Japanese patients with gestational diabetes mellitus[J]. Gynecological Endocrinology, 2015, 31(12): 929-933.
- [6] 梁培松, 王结珍, 陈康, 等. 孕早期年龄、BMI和PAPPA水平综合评价对GDM的预测价值[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(1): 133-135.  
LIANG Peisong, WANG Jiezhen, CHEN Kang, et al. Predictive value of comprehensive evaluation of early pregnant age, BMI and PAPPA levels to the GDM[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1): 133-135.
- [7] ZHU Weiwei, YANG Huixia, WANG Chen, et al. High prevalence of gestational diabetes mellitus in Beijing: effect of maternal birth weight and other risk factors[J]. Chinese Medical Journal, 2017, 130(9): 1019-1025.
- [8] 陈翠美. 深圳市妇幼保健院2018年上半年妊娠期糖尿病发病率调查[J]. 医药前沿, 2019, 9(13): 232.  
CHEN Cuimei. Investigation of diabetes incidence of pregnant women in child health care hospital of Shenzhen in half of 2018[J]. Journal of Frontiers of Medicine, 2019, 9(13): 232.
- [9] BLATT A J, NAKAMOTO J M, KAUFMAN H W. Gaps in diabetes screening during pregnancy and postpartum[J]. Obstetrics and Gynecology, 2011, 117(1): 61-68.
- [10] 谢君芬. 妊娠期糖尿病发病机制的研究现状[J]. 临床医药文献(电子杂志), 2020, 7(8): 196.  
XIE Junfen. The research status of gestational diabetes mellitus[J]. Journal of Clinical Medical Literature (Electronic Edition), 2020, 7(8): 196.
- [11] 沈文霞. 妊娠期糖尿病与新生儿胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国现代医生, 2018, 56(3): 12-14, 18.  
SHEN Wenxia. Correlation between gestational diabetes mellitus and neonatal insulin resistance[J]. China Modern Doctor, 2018, 56(3): 12-14, 18.

收稿日期: 2020-05-17

修回日期: 2020-06-08

(上接第51页)

- [10] BLUMENFELD O, HUANG Chenghan. Molecular genetics of the glycophorin gene family, the antigens for MNSs blood groups: Multiple gene rearrangements and modulation of splice site usage result in extensive diversification[J]. Human Mutation, 1995, 6(3): 199-209.
- [11] DE ISLA N G, RIQUELME B D, RASIA R J, et al. Quantification of glycophorin A and glycophorin B on normal human RBCs by flow cytometry[J]. Transfusion, 2003, 43(8): 1145-1152.
- [12] VELLIQUETTE R W, HU Zong, LOMAS-FRANCIS C, et al. Novel single-nucleotide change in GYP\*A in a person who made an alloantibody to a new high-prevalence MNS antigen called ENEV[J]. Transfusion, 2010, 50(4): 856-860.
- [13] ITO S, KAITO S, MIYAZAKI T, et al. A new antigen SUMI carried on glycophorin A encoded by the GYP\*A\*M with c. 91A>C (p. Thr31Pro) belongs to the MNS blood group system[J]. Transfusion, 2020, 60(6): 1287-1293.
- [14] 李志祥, 谢桂岚. MN血型M基因单核苷酸多态性在中国北京汉族人群中分布状态的初步调查[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(2): 224-226.  
LI Zhixiang, XIE Guilian. Primary research on G/T polymorphism in intron 1 of M gene in Chinese Beijing han population[J]. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15(2): 224-226.
- [15] PALACAJORNSUK P. Review: molecular basis of MNS blood group variants[J]. Immunohematology, 2006, 22(4): 171-182.
- [16] KUDO S, FUKUDA M. Identification of a novel human glycophorin, glycophorin E, by isolation of genomic clones and complementary DNA clones utilizing polymerase chain reaction[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(2): 1102-1110.
- [17] CARTRON J P, COLIN Y, KUDO S, et al. Molecular genetics of human erythrocyte sialoglycoproteins glycophorins A, B, C, and D[M]. Springer: Boston, MA, USA, 1990: 299-335.
- [18] (英)杰夫·丹尼尔(Geoff Daniels). 人类血型[M]. 2版. 朱自严译. 北京: 科学出版社, 2007: 117-207.  
DANIELS G. Human Blood Groups[M]. 2th ed. Translated by ZHU Ziyang. Beijing: Science Press, 2007: 117-207.
- [19] HASSAN S N, PONNURAJ K A, MOHAMAD S, et al. Molecular detection of glycophorins a and B variant phenotypes and their clinical relevance[J]. Transfusion Medicine Reviews, 2019, 33(2): 118-124.

收稿日期: 2020-05-02 修回日期: 2020-06-01

# 孤独症谱系障碍儿童血清叶酸与脑源性神经营养因子水平检测的临床意义

毕开湘<sup>1a</sup>, 陶红莉<sup>2</sup>, 杨丽丽<sup>1b</sup>

(1. 宝鸡市康复医院 a. 精神科; b. 社区中心, 陕西宝鸡 721000; 2. 咸阳市中心医院精神心理科, 陕西咸阳 712000)

**摘要:** **目的** 研究叶酸和脑源性神经营养因子 (BDNF) 检测在孤独症谱系障碍 (ASD) 患儿中的临床意义。**方法** 纳入2017年3月~2020年3月56例ASD患儿作为观察组,按1:1比例,另纳入同期56例体检健康儿童作为对照组。分别采用化学发光微粒子免疫分析技术 (CMIA) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清叶酸和BDNF水平,比较两组儿童血清叶酸和BDNF水平。采用儿童孤独症评定量表 (CARS) 记录ASD患儿病情状态,并分析血清叶酸和BDNF与CARS评分的关系。分析血清叶酸水平对判断ASD及病情程度的价值,比较不同患儿血清BDNF水平,分析BDNF水平影响因素。**结果** 观察组患儿血清叶酸水平显著低于对照组 ( $15.39 \pm 7.41$  nmol/L vs  $19.61 \pm 6.09$  nmol/L), BDNF显著高于对照组 ( $25.88 \pm 11.05$  pg/ml vs  $20.48 \pm 10.30$  pg/ml), 差异均有统计学意义 ( $t=2.941, 2.670$ , 均  $P<0.05$ )。不同病情程度ASD患儿血清叶酸水平比较,差异均有统计学意义 ( $F=14.797, P<0.05$ )。轻中度ASD患儿BDNF显著高于重度患儿及健康对照组儿童,差异均有统计学意义 ( $t=2.833, 3.130$ , 均  $P<0.05$ )。Pearson线性相关分析显示CARS评分与血清叶酸水平呈显著负相关性 ( $r=-0.317, P=0.000$ )。CARS评分与血清BDNF水平无显著相关性 ( $r=0.074, P=0.132$ )。受试者工作曲线 (ROC) 分析显示血清叶酸对判断ASD和重度ASD均具有一定应用价值 ( $AUC=0.779, 0.768; P<0.05$ )。多元线性回归分析结果显示年龄 ( $b=1.214, P<0.05$ )、家族史 ( $b=2.927, P<0.05$ ) 及病情程度 ( $b=3.210, P<0.05$ ) 是影响血清BDNF水平的独立因素。**结论** 叶酸和BDNF与ASD关系密切,叶酸检测可作为ASD早期诊断和病情程度判断的指标,BDNF则是ASD的保护因素,但其水平受患儿年龄、家族史及病情程度等影响。

**关键词:** 叶酸; 脑源性神经营养因子; 孤独症谱系障碍; 早期诊断

中图分类号: R749.1; R446.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-171-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.042

## Clinical Significance of the Detection of Folic Acid and Brain-derived Neurotrophic Factor in Children with Autism Spectrum Disorder

BI Kai-xiang<sup>1a</sup>, TAO Hong-li<sup>2</sup>, YANG Li-li<sup>1b</sup>

(1a. Department of Psychiatry; 1b. Community Center, Baoji Rehabilitation Hospital, Shaanxi Baoji 721000, China; 2. Department of Psychiatry, Xianyang Central Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China)

**Abstract: Objective** To study the clinical significance of folic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with autism spectrum disorders (ASD). **Methods** 56 cases of children with ASD from March 2017 to March 2020 were enrolled as the observation group, there were another 56 healthy children in the same period were included as the control group, which accorded to the ratio of 1:1. The serum folate and BDNF levels were measured by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The serum folic acid and BDNF levels were compared between the two groups. The status of ASD was recorded by child autism rating scale (CARS), and the relationship between serum folic acid, BDNF and CARS score were analyzed. The value of serum folic acid level in judging the severity of ASD were analyzed. The serum levels of BDNF in different children were compared and the influence factors were analyzed. **Results** The serum folic acid level of the observation group was significantly lower than that of the control group ( $15.39 \pm 7.41$  nmol/L vs  $19.61 \pm 6.09$  nmol/L), and the BDNF was significantly higher than that of the control group ( $25.88 \pm 11.05$  pg/ml vs  $20.48 \pm 10.30$  pg/ml), the difference were statistically ( $t=2.941, 2.670$ , all  $P<0.05$ ). There were significantly difference of the serum folic acid of different degree of illness in children ( $F=14.797, P<0.05$ ). The BDNF in mild and moderate ASD group were significantly higher than those in severe ASD group and healthy control group, the difference were statistically significant ( $t=2.833, 3.130$ , all  $P<0.05$ ). The Pearson linear correlation analysis showed that there was a significant negative correlation between cars score and

作者简介: 毕开湘 (1982-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 精神科方面, E-mail: baojibikaix@163.com。

通讯作者: 杨丽丽 (1983-), 女, 本科, 主管护师, 研究方向: 精神科方面, E-mail: 119085634@qq.com。

serum folate level ( $r = -0.317, P = 0.000$ ). There was no significant correlation between CARS score and serum BDNF level ( $r = 0.074, P = 0.132$ ). The receiver operator characteristic (ROC) analysis showed that serum folic acid had certain application value in judging ASD and severe ASD ( $AUC = 0.779$  and  $0.768, P < 0.05$ ). The multiple linear regression analysis showed that the age ( $b = 1.214, P < 0.05$ ), family history ( $b = 2.927, P < 0.05$ ) and disease severity ( $b = 3.210, P < 0.05$ ) were independent factors to influence the serum BDNF level. **Conclusion** The folic acid and BDNF were closely related to ASD. Folic acid detection can be used as an index for early diagnosis and severity judgment of ASD. BDNF is a protective factor for ASD, but its level is affected by age, family history and disease severity of the children.

**Keywords:** folic acid; brain-derived neurotrophic factor; autism spectrum disorders; early diagnosis

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD) 已成为目前临床最常见的神经发育障碍性疾病, 研究显示超过 75% 的 ASD 患儿伴有智力障碍<sup>[1]</sup>, 成年后生活难以自理, 给家庭和社会带来巨大负担。但有关 ASD 发病机制尚未阐明, 其病因也不明确, 更缺乏有效治疗药物。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是具有促进神经元分化、生长及突触形成的神经营养因子, 被认为是 ASD 患儿神经重塑的关键因子<sup>[2]</sup>。但有关 BDNF 在 ASD 患儿中的表达水平, 临床仍存在争议。有研究显示 BDNF 水平与 ASD 患儿病情程度呈显著相关性<sup>[3]</sup>, 也有报道发现 BDNF 仅在轻度 ASD 患儿中呈异常表达<sup>[4]</sup>。另外, 有研究显示 ASD 患儿叶酸水平异常<sup>[5]</sup>, 提示叶酸可能与 ASD 发病有关。但目前有关叶酸与 ASD 关系的报道较少。为此, 本研究采用平行对照研究方法, 分析叶酸和 BDNF 与 ASD 的关系, 评价叶酸和 BDNF 的临床应用价值, 报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 根据纳入排除标准, 纳入 2017 年 3 月 ~ 2020 年 3 月 56 例在宝鸡市康复医院就诊的 ASD 患儿作为观察组, 其中男性 38 例, 女性 18 例; 年龄  $7.53 \pm 2.62$  岁; 体重指数  $18.94 \pm 2.07 \text{ kg/m}^2$ 。根据 1:1 比例, 另纳入同期 56 例体检健康儿童作为对照组, 其中男性 42 例, 女性 14 例; 年龄  $8.01 \pm 1.95$  岁; 体重指数  $19.22 \pm 1.83 \text{ kg/m}^2$ 。两组儿童性别、年龄及体重指数等基本资料差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**纳入标准:** ① ASD 诊断均符合第 5 版美国精神障碍诊断与统计手册推荐标准<sup>[6]</sup>; ② 患儿年龄  $\leq 12$  岁; ③ 均获得患儿监护人同意, 并签署知情同意书。

**排除标准:** ① 并发有精神分裂症、强迫症、癫痫或有其他器质性疾病者; ② 并发有先天性心脏病、肝肾功能不全者; ③ 并发有心肺严重基础性疾病者; ④ 伴有严重急慢性感染者。

**1.2 检测方法** 所有研究对象均于清晨空腹抽取肘静脉血 5ml, 3 000r/min 离心后取上清液送检。采用贝克曼库尔特 UniCel DxI 800 免疫分析系统, 以

化学发光微粒子免疫分析技术检测血清叶酸水平。采用酶联免疫吸附法检测血清 BDNF 水平, 试剂盒由上海信帆生物科技有限公司提供。

**1.3 观察指标** 比较观察组和对照组两组儿童血清叶酸和 BDNF 水平, 采用儿童孤独症评定量表 (child autism rating scale, CARS) 记录 ASD 患儿病情程度<sup>[7]</sup>, 以 30 分  $\leq$  CARS 评分  $< 37$  分为轻中度, 以 CARS 评分  $\geq 37$  分为重度。比较不同儿童血清 BDNF 和叶酸水平。分析 ASD 患儿 CARS 评分和血清叶酸、BDNF 水平的关系, 分析血清叶酸判断 ASD 及重度 ASD 的应用价值, 采用多元线性回归分析法分析影响 ASD 患儿血清 BDNF 的相关因素。

**1.4 统计学分析** 选用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间行独立样本  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验。计数资料以 (%) 表示, 组间行卡方检验, 采用受试者工作曲线 (receiver operator characteristic, ROC) 分析预测价值, 结果以曲线下面积 (area under curve, AUC) 表示, 影响因素采用多元线性回归模型进行,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组血清叶酸和 BDNF 水平比较** 见表 1。观察组患儿血清叶酸水平显著低于对照组, BDNF 显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 两组血清叶酸和 BDNF 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

检测指标	观察组 ( $n=56$ )	对照组 ( $n=56$ )	$t$	$P$
叶酸 (nmol/L)	$15.39 \pm 7.41$	$19.16 \pm 6.09$	2.941	0.004
BDNF (pg/ml)	$25.88 \pm 11.05$	$20.49 \pm 10.30$	2.670	0.009

**2.2 不同研究对象血清叶酸和 BDNF 水平比较** 见表 2。三组儿童血清叶酸水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同病情程度患儿血清叶酸水平比较, 轻中度组与重度组比较  $t = 3.289$ ,  $P = 0.002$ ; 轻中度组与对照组比较  $t = 2.204$ ,  $P = 0.030$ ; 重度组与对照组比较  $t = 5.176$ ,  $P = 0.000$ , 差异均有统计学意义。三组儿童血清 BDNF 水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中轻中度组患儿 BDNF 显著高于重度组患儿及健康对照组



( $t=2.833$ ,  $P=0.007$ ;  $t=3.130$ ,  $P=0.002$ ), 差异均有统计学意义( $t=0.063$ ,  $P=0.950$ )。

有统计学意义; 重度组患儿低于对照组, 差异无统

表2 不同研究对象血清叶酸和BDNF水平比较

检测指标	轻中度 ( $n=30$ )	重度 ( $n=26$ )	对照组 ( $n=56$ )	$F$	$P$
叶酸 (nmol/L)	$16.34 \pm 4.72$	$12.09 \pm 4.94$	$19.16 \pm 6.09$	14.797	0.000
BDNF (pg/ml)	$27.73 \pm 10.08$	$20.34 \pm 9.32$	$20.49 \pm 10.30$	5.806	0.000

2.3 ASD 患儿 CARS 评分与血清叶酸和 BDNF 水平关系 见图1, 图2, 表3。经 Pearson 线性相关分析显示, CARS 评分与血清叶酸水平呈显著负相关性( $r=-0.317$ ,  $P=0.000$ )。CARS 评分与血清

BDNF 水平无显著相关性( $r=0.074$ ,  $P=0.132$ )。ROC 分析显示血清叶酸对判断 ASD 和重度 ASD 均具有一定应用价值( $P<0.05$ )。

表3 血清叶酸判断 ASD 与重度 ASD 的 ROC 分析结果

组别	AUC	95%CI	S.E.	$P$	敏感度	特异度	截断值 (nmol/L)
ASD	0.779	0.659-0.900	0.062	0.000	0.750	0.714	16.520
重度 ASD	0.768	0.633-0.902	0.069	0.003	0.786	0.571	13.040

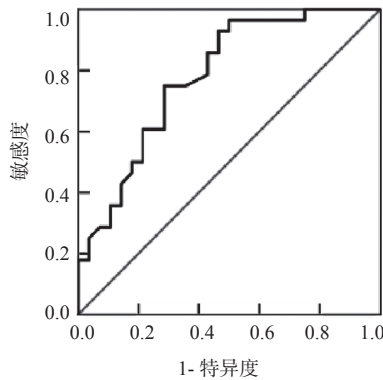


图1 血清叶酸判断 ASD 的 ROC 分析

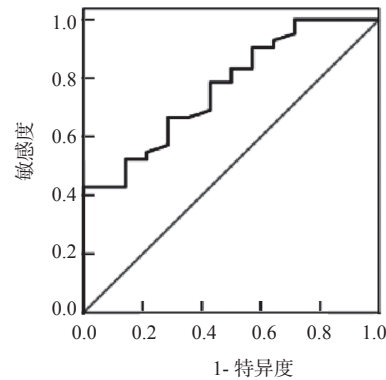


图2 血清叶酸判断重度 ASD 的 ROC 分析

2.4 BDNF 影响因素分析 单因素分析显示不同年龄、病情程度、家族史患儿血清 BDNF 水平比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表4。多元线性

回归分析结果显示年龄、家族史及病情程度是影响血清 BDNF 水平的独立因素( $P<0.05$ ), 见表5。

表4 不同 ASD 患儿血清 BDNF 水平比较

因素	$n$	血清 BDNF (pg/ml)	$\chi^2$	$P$
性别	男	$24.73 \pm 9.48$	0.112	0.911
	女	$25.04 \pm 10.13$		
年龄 (岁)	$\geq 7$	$23.15 \pm 6.34$	2.370	0.021
	$< 7$	$27.62 \pm 7.78$		
病情程度	轻度	$27.73 \pm 10.08$	3.602	0.034
	中度	$20.47 \pm 9.75$		
	重度	$20.34 \pm 9.32$		
家族遗传史	有	$21.29 \pm 6.68$	3.505	0.001
	无	$27.01 \pm 5.46$		
吸烟史	有	$26.92 \pm 9.32$	2.044	0.046
	无	$21.86 \pm 7.97$		
病程 (月)	$\geq 6$	$26.18 \pm 7.43$	0.121	0.904
	$< 6$	$25.91 \pm 8.01$		

表5 影响血清 BDNF 水平的多元线性回归模型分析

指标	偏回归系数 b	标准化偏回归系数 b'	P
年龄	1.214	0.331	0.007
病情程度	3.210	1.107	0.001
家族遗传史	2.927	0.584	0.000
吸烟史	1.281	0.374	0.089
常数	0.361	-	0.000

### 3 讨论

ASD 发病率呈地域差异,其发病机制复杂,虽尚未完全阐明,但多项报道显示 ASD 患儿叶酸水平异常。马燕等<sup>[8]</sup>报道证实 ASD 患儿血清叶酸水平显著高于健康儿童,且叶酸水平与病情程度相关,本研究也显示 CARS 评分与叶酸水平相关,与上述报道一致。而孙艺等<sup>[9]</sup>的一项研究则发现 ASD 患儿体内四氢叶酸、5-甲基四氢叶酸及叶酸受体  $\alpha$  水平较同龄健康儿童显著降低,佐证 ASD 患儿存在叶酸代谢异常。为此,本研究采用 ROC 进一步分析血清叶酸在 ASD 病情评估中的预警作用,结果显示叶酸判断 ASD 及重度 ASD 的 AUC 值分别为 0.779 和 0.768,提示当叶酸低于 16.520 nmol/L 和 13.040 nmol/L 时,应谨防 ASD 与重度 ASD 的发生,这对指导临床具有重要意义。孙彩虹等<sup>[10]</sup>对照实验也发现对 ASD 患儿给予叶酸干预,可通过调节谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽水平,改善甲基化和氧化应激状态,达到辅助治疗作用。因而,对于 ASD 患儿,临床动态监测血清叶酸水平对 ASD 早期预警诊断和后续诊疗均具有重要实用价值。

BDNF 广泛存在于中枢神经系统,既往报道已证实 BDNF 参与大脑发育<sup>[11-12]</sup>。SCATTONI 等<sup>[13]</sup>动物实验显示 BTBR 小鼠 ASD 模型不仅海马区 BDNF 和酪氨酸激酶受体 B 水平降低,其相应突触传递功能也明显受损。另外,有学者发现 BDNF 可通过 BDNF-Akt-Bcl-2 介导抗凋亡通路,抑制 ASD 神经元坏死<sup>[14]</sup>。上述研究说明 BDNF 对神经元具有保护作用。本研究显示观察组血清 BDNF 水平显著高于对照组,这与既往报道结果相符,提示对于 ASD 患儿,血清 BDNF 水平升高可能是机体启动的代偿保护机制。

但本研究显示仅轻中度患者血清 BDNF 水平高于健康儿童,而重度患儿血清 BDNF 并未显著升高,推测 BDNF 在 ASD 患儿中表达还可能受其他因素影响。这使得随着病情加重,重度患儿 BDNF 水平与健康儿童相比,其差异反而无统计学意义。为进一步探讨血清 BDNF 在 ASD 患儿中的作用,本研究采用多元线性回归模型分析影响血清 BDNF 的相

关因素,结果发现血清 BDNF 水平与患儿年龄、病情程度及家族史相关。KATO-H-SEMBA 等<sup>[15]</sup>研究也发现 9 岁以后 ASD 患儿血清 BDNF 水平较 9 岁前患儿水平显著升高,本研究根据新年龄分期对比婴幼儿与少儿血清 BDNF 水平,结果也显示年龄是血清 BDNF 的独立影响因素,提示对于 ASD 患儿,血清 BDNF 存在增高延迟现象<sup>[16-17]</sup>,但其机制尚不明确。另外,家族遗传因素也是影响血清 BDNF 的重要因素。基础实验结果显示胚胎期 BDNF 可与神经生长因子、刺猬蛋白 Shh 发挥协同作用,保护胚胎,促进神经元生长发育,而在胚胎损伤后,BDNF 可代偿性分泌增加,成为 ASD 的保护因素<sup>[18-19]</sup>。这说明 ASD 家族遗传史在孕期可能通过胚胎途径影响 BDNF 分泌,进而抑制胎儿大脑神经元发育,成为 ASD 患儿的诱发因素。

综上,叶酸和 BDNF 与 ASD 发生发展密切相关,叶酸可作为 ASD 的预警信号指标,BDNF 对 ASD 具有保护作用,但其水平受多因素影响,动态监测叶酸和 BDNF 水平有助于 ASD 临床诊疗。

### 参考文献:

- [1] 周浩,李春培,王天祺,等. 6~18 岁智力障碍人群的孤独症谱系障碍样症状分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2019,21(5):445-449.  
ZHOU Hao, LI Chunpei, WANG Tianqi, et al. Autism spectrum disorder-like symptoms in the population with intellectual disability aged 6 to 18 years[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2019,21(5):445-449.
- [2] MENG Weidong, SUN Shaojun, YANG Jie, et al. Elevated serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not BDNF gene Val66Met polymorphism is associated with autism spectrum disorders[J]. Molecular Neurobiology, 2017, 54(2): 1167-1172.
- [3] 徐萍,张静洁,季卫东,等. 血清脑源性神经营养因子及其基因启动子甲基化水平与儿童孤独症谱系障碍的关联性分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(21): 2510-2512.  
XU Ping, ZHANG Jingjie, JI Weidong, et al. Association between the levels of serum brain -derived neurotrophic factor and its gene promoter methylation and autism spectrum disorder in children[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 34(21): 2510-2512.
- [4] 马菲,任亮,陈素环. 孤独症儿童血清中脑源性神经营养因子和 S100B 蛋白的检测及意义[J]. 中国中西医结合儿科学, 2019, 11(3): 251-253.  
MA Fei, REN Liang, CHEN Suhuan. Detection and significance of serum BDNF and S100B protein levels in autistic children[J]. Chinese Pediatrics of Integrated Traditional and Western Medicine, 2019, 11(3): 251-253.
- [5] 何一. 孤独症谱系障碍与叶酸代谢的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2018, 45(11): 880-883.

- HE Yi. Autism spectrum disorder and folate metabolism[J]. International Journal of Pediatrics, 2018, 45(11): 880-883.
- [6] 美国精神医学学会. 精神障碍诊断与统计手册[M]. 5版. 张道龙, 等译. 北京: 北京大学出版社, 2016: 24-36.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders[M]. 5th Ed. Translated by ZHANG Daolong, et al. Beijing: Peking University Press, 2016, 24-36.
- [7] 卢建平, 杨志伟, 舒明耀, 等. 儿童孤独症量表评定的信度、效度分析[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(13): 119-121, 123.
- LU Jianping, YANG Zhiwei, SHU Mingyao, et al. Reliability, validity analysis of the childhood autism rating scale[J]. China Journal of Modern Medicine, 2004, 14(13): 119-121, 123.
- [8] 马燕, 汪学静, 韩洁, 等. 孤独症谱系障碍患儿血清 25 羟维生素 D 和叶酸水平变化及意义[J]. 山东医药, 2019, 59(10): 75-77.
- MA Yan, WANG Xuejing, HAN Jie, et al. Changes and significance of serum 25 hydroxyvitamin D and folic acid in children with autism spectrum disorder[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(10): 75-77.
- [9] 孙艺, 梁爽, 孙彩虹, 等. 孤独症谱系障碍患儿血清叶酸及其代谢产物与维生素 B12 水平状况[J]. 中国学校卫生, 2018, 39(3): 331-334.
- SUN Yi, LIANG Shuang, SUN Caihong, et al. Serum folic acid with associated metabolites and vitamin B12 in ASD children: a case-control study [J]. Chinese Journal of School Health, 2018, 39(3): 331-334.
- [10] 孙彩虹, 邹明扬, 李卓影, 等. 叶酸对孤独症谱系障碍儿童甲基化水平和氧化应激状态的影响[J]. 中国学校卫生, 2018, 39(3): 338-342.
- SUN Caihong, ZHOU Mingyang, LI Zhuoying, et al. Efficacy of folic acid supplementary on methylation capability and oxidative stress in autistic children[J]. Chinese Journal of School Health, 2018, 39(3): 338-342.
- [11] 惠凌云, 王凌, 张琳, 等. CHB 患者疾病进程与抑郁的程度及血清 BDNF 水平的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 13-16.
- HUI Lingyun, WANG Ling, ZHANG Lin, et al. Correlation of the disease process, depression severity and serum levels of BDNF in patient with CHB [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 13-16.
- [12] FRANCIS K, DOUGALI A, SIDERI K, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with ASD and their parents: a 3-year follow-up[J]. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2018, 137(5): 433-441.
- [13] SCATTONI M L, MARTIRE A, CARTOCCI G, et al. Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T+ tf/J strain, a mouse model of autism[J]. Behavioural Brain Research, 2013, 251(1): 35-40.
- [14] GAO Jingquan, WANG Xuelai, SUN Hongli, et al. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2016, 49(27): 67-78.
- [15] KATOH-SEMBA R, WAKAKO R, KOMORI T, et al. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2007, 25(6): 367-372.
- [16] 彭志晴, 赵栋, 孙彩虹, 等. 孤独症儿童血清中脑源性神经营养因子的水平[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(1): 1-4.
- PENG Zhiqing, ZHAO Dong, SUN Caihong, et al. Serum brain derived neurotrophic factor levels in autism children[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2014, 18(1): 1-4.
- [17] CAMILLA B, ANDREA M, ANGELA B, et al. Impaired neuronal differentiation of neural stem cells lacking the engrailed-2 gene[J]. Neuroscience, 2018, 386(21): 137-149.
- [18] HACHOEN-KLEIMAN G, SRAGOVICH S, KAR-MON G, et al. Activity-dependent neuroprotective protein deficiency models synaptic and developmental phenotypes of autism-like syndrome[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(11): 4956-4969.
- [19] MUSSER E D, HAWKEY E, KACHAN-LIU S S, et al. Shared familial transmission of autism spectrum and attention-deficit/hyperactivity disorders[J]. Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines, 2014, 55(7): 819-827.

收稿日期: 2020-07-02

修回日期: 2020-07-25

(上接第 152 页)

- MA Junlong, CONG Yulong, LU Yujing, et al. Study and application of the combination of urine dry chemistry examination and urine sediment flow cytometry examination on the microscopic screening of the urine formed component[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2011, 34(6): 494-500.
- [10] 王刚强, 郑善奎, 张磊, 等. 西安地区健康成人尿液有形成分参考区间的建立[J]. 现代检验医学杂

志, 2020, 35(1): 111-114, 119.

WANG Gangqiang, ZHENG Shanluan, ZHANG Lei, et al. Establishment of a reference interval for the formation of urine in healthy adults in Xi'an[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1): 111-114, 119.

收稿日期: 2020-04-06

修回日期: 2020-07-14



# 急性心力衰竭病人血清 Hcy 与 NA-ProBNP, LP(a) 水平及性别的相关性研究

何 平 (舒城县人民医院检验科, 安徽舒城 231300)

**摘要:** 目的 探讨急性心力衰竭 (acute heart failure, AHF) 心功能Ⅳ级患者血清同型半胱氨酸 (Hcy) 水平与性别、年龄、N-末端脑钠肽前体 (NT-ProBNP), 脂蛋白 (a) [LP (a)] 及住院时间的相关性。方法 选取2017年1月~2019年6月收治的急性心力衰竭患者32例为研究对象, 其中包括女性22例、男性10例, 年龄58~88岁, 平均 $74.47 \pm 7.35$ 岁。所有研究对象行血清 Hcy, NT-ProBNP 和 LP (a) 检测。分析比较急性心力衰竭心功能Ⅳ级患者血清 Hcy 与性别、年龄、NT-ProBNP, LP (a) 及住院时间的相关性。结果 男性与女性 Hcy, NT-ProBNP, LP (a) 和住院时间分别为  $19.87 \pm 9.08 \mu\text{mol/L}$  vs  $18.10 \pm 8.95 \mu\text{mol/L}$ ,  $13\ 930.6 \pm 10\ 863.2\text{pg/ml}$  vs  $7\ 935.3 \pm 7\ 663.7\text{pg/ml}$ ,  $249.8 \pm 254.2\text{mg/L}$  vs  $332.9 \pm 269.4\text{mg/L}$  和  $7.13 \pm 2.57$  天 vs  $8.56 \pm 3.06$  天, 除 Hcy 外差异无统计学意义 ( $t=2.18$ ,  $P>0.05$ ) 外其余差异均有统计学意义 ( $t=4.51$ ,  $3.06$  和  $2.37$ ,  $P$  均  $<0.05$ )。根据 Spearson 相关分析提示血清 Hcy 与性别、年龄和 LP (a) 均不存在相关性, 与男性 NT-ProBNP、女性住院时间存在相关性, 相关系数为  $0.679$  和  $0.416$ 。结论 心衰患者血清 Hcy 异常可以反映患者心衰严重程度。

**关键词:** 同型半胱氨酸; 急性心力衰竭; 住院时间

中图分类号: R541.6; R446.12 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-176-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.043

## Correlation between Serum Hcy, NA-ProBNP, LP (a) Levels and Gender in Patients with Heart Failure

HE Ping (Department of Clinical Laboratory, Shucheng County People's Hospital, Anhui Shucheng 231300, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between serum homocysteine (Hcy) level and gender, age, N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-ProBNP), lipid protein (a) and length of hospital stay in NYHA class IV acute heart failure (AHF) patients. **Methods** From December 2016 to June 2019, 32 patients with acute heart failure, including 22 females and 10 males, with an average age of  $74.47 \pm 7.35$  years were selected. Serum Hcy, N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-ProBNP), LP (a) were detected in all subjects. The correlation between serum Hcy, gender, age, NT-ProBNP, LP (a) and length of hospital stay was analyzed and compared in NYHA class IV acute heart failure patients. **Results** Hcy, NT-ProBNP, LP (a), length of hospital stay of male and female were  $19.87 \pm 9.08 \mu\text{mol/L}$  vs  $18.10 \pm 8.95 \mu\text{mol/L}$ ,  $13\ 930.6 \pm 10\ 863.2\text{pg/ml}$  vs  $7\ 935.3 \pm 7\ 663.7\text{pg/ml}$ ,  $249.8 \pm 254.2\text{mg/L}$  vs  $332.9 \pm 269.4\text{mg/L}$ ,  $7.13 \pm 2.57$  Day vs  $8.56 \pm 3.06$  Day, except the  $t$  value between Hcy was  $2.18$ ,  $P>0.05$ , the others were  $4.51$ ,  $3.06$  and  $2.37$  respectively, all  $P<0.05$ . Spearson correlation analysis showed that there was no correlation between serum Hcy and gender, age, LP (a). However, there was a correlation on male NT-ProBNP and female length of hospital stay, with correlation coefficients of  $0.679$  and  $0.416$ . **Conclusion** Abnormal Hcy in patients with heart failure can reflect the severity of heart failure.

**Keywords:** homocysteine; acute heart failure; length of hospital stay

同型半胱氨酸 (Hcy) 为含硫氨基酸, 由体内蛋氨酸代谢产生, Hcy 在体内循环中大部分以与血浆清蛋白结合的氧化形式存在, 当 Hcy 代谢发生障碍时, 就可能引起 Hcy 在体内积蓄, 导致高 Hcy 血症, 临床研究显示, 高 Hcy 血症和心脑血管疾病发病关系密切<sup>[1-2]</sup>; 同时有研究表明 Hcy 和Ⅳ-末端脑钠肽前体 (NT-ProBNP) 与心力衰竭密切相关<sup>[3-4]</sup>。心力衰竭是心血管疾病终末期及最主要的死亡原因, 因此及时准确地诊治心力衰竭对挽救生命至

关重要。本研究对急性心力衰竭心功能Ⅳ级患者血清 Hcy 与不同性别的年龄、NT-ProBNP, 脂蛋白 (a) [LP (a)] 及住院时间进行相关性分析, 了解血清 Hcy 等与心力衰竭的关联性, 为精准诊疗及疾病防控提供指导依据。现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2017年1月~2019年6月住院急性心力衰竭患者32例为研究对象, 其中女性22例、男性10例; 年龄58~88岁, 平均年龄

74.47±7.35岁。所有患者均为临床诊断急性心力衰竭、心功能Ⅳ级患者。

1.2 仪器与试剂 清晨空腹抽取3ml静脉血送检。血清Hcy和LP(a)采用日立-7600全自动生化分析仪测定,试剂由北京九强生物化学试剂有限公司提供,分别为酶循环法和胶乳增强免疫比浊法;血清NT-ProBNP采用武汉明德生物技术公司免疫荧光分析仪层析法及其配套试剂测定。全部操作按SOP文件进行。

1.3 方法 分析比较急性心力衰竭心功能Ⅳ级患者血清Hcy与性别、年龄,NT-ProBNP,LP(a)及住院时间的相关性。

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0统计学软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,男女间差异用两样本均数 $t$ 检验,两变量间相关性分析采用Spearman相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

表2 不同性别患者血清Hcy与年龄,NT-ProBNP,LP(a)及住院时间相关性分析

类别	年龄		NT-ProBNP		LP(a)		住院时间	
	男	女	男	女	男	女	男	女
$r$ 值	0.026	0.242	0.679	0.281	0.266	0.163	0.235	0.416
$P$ 值	0.944	0.279	0.031	0.205	0.457	0.545	0.513	0.049

## 3 讨论

Hcy为含硫氨基酸,由人体内蛋氨酸代谢生成,Hcy水平上升会引发血栓动脉粥样硬化疾病,且与心力衰竭密不可分。目前,对于血清Hcy增高加速心衰发展机制的研究主要包括:①Hcy引起心肌重构以及心脏功能受损。心肌重构包括心肌细胞形态、功能的变化,心肌重构主要表现为心室腔扩大、室壁肥厚、心室质量增加和射血分数降低。心肌重构使心脏形态改变和泵血能力减弱,是心力衰竭发生发展的主要机制。有研究表明<sup>[5]</sup>Hcy促进心肌纤维化和基质金属蛋白酶活性增强,引发心室重构。也有专家认为,高水平Hcy通过钙蛋白酶和线粒体NO合酶使心肌细胞间的支架结构受到破坏,导致心肌重构并损害心功能。②Hcy可促进炎性递质释放,造成心肌细胞损伤、纤维化、凋亡<sup>[6-7]</sup>。Hcy促进细胞产生活性氧,导致强氧化诱导心肌细胞凋亡,抑制心肌细胞胶原降解,促进心肌胶原增殖和心肌纤维化。FOURNIER等<sup>[8]</sup>通过134例心力衰竭患者随访发现,高Hcy患者5年内的死亡率远大于低Hcy患者。

本研究发现血清Hcy与急性心力衰竭心功能Ⅳ级女性患者的住院时间具有相关性,说明Hcy与急性心力衰竭的严重程度及预后相关,与既往研究一

致<sup>[9-11]</sup>。而男性患者(10例)血清Hcy与住院时间无相关性,可能与纳入样本量较少分析的偏倚较大有关。

表1 不同性别血清Hcy,NT-ProBNP,LP(a)及住院时间比较( $\bar{x} \pm s$ )

指标	男性(n=10)	女性(n=22)	$t$	$P$
Hcy( $\mu\text{mol/L}$ )	19.87±9.08	18.10±8.95	2.18	>0.05
NT-ProBNP(pg/ml)	13 930.6±10 863.2	7 935.3±7 663.7	4.15	<0.05
LP(a)(mg/L)	249.8±254.2	332.9±289.4	3.06	<0.05
住院时间(天)	7.13±2.57	8.56±3.06	2.37	<0.05

2.2 不同性别患者血清Hcy与年龄,NT-ProBNP,LP(a)及住院时间相关性分析 见表2。急性心力衰竭心功能Ⅳ级患者血清Hcy与男性NT-ProBNP具有相关性( $r=0.679$ ),与女性住院时间具有相关性( $r=0.416$ ),其他均无相关性。

本研究还发现,在急性心力衰竭心功能Ⅳ级的患者中血清Hcy与年龄、LP(a)不具有相关性,从而进一步说明了Hcy可以作为心力衰竭严重程度的独立危险因素。有研究证实,Hcy是冠心病的独立危险因素,而冠心病又是导致心力衰竭发生的重要原因,因此心力衰竭的发生、发展与血清Hcy水平密切相关<sup>[12]</sup>。此外,研究中还发现Hcy与男性患者(10例)NT-ProBNP水平呈正相关,而与女性患者(22例)NT-ProBNP水平无相关性,可能与男性样本量有限分析偏倚所致,有待进一步观察研究。

随着社会老龄化进程加速以及饮食结构的变化,我国心力衰竭发病率逐年上升,心衰已经成为影响人们健康的重要疾病。Hcy通过多种机制参与心衰的发生和发展,是心衰独立危险因素;Hcy与NT-ProBNP和住院时间存在相关性且反映心衰严重程度,因此通过干预Hcy水平来预防并治疗心衰,对于降低心衰的发病率和死亡率有着重要意义。

参考文献:

[1] 刘沙沙.血浆同型半胱氨酸对慢性心力衰竭患者的

- 作用及意义[J]. 临床荟萃, 2016, 31(6): 658-662.
- LIU Shasha. Effect and significance of plasma homocysteine in patients with chronic heart failure[J]. Clinical Focus, 2016, 31(6): 658-662.
- [2] 赵曼, 赵雅, 王禹, 等. 血清 Hcy, Cys C 和 NT-ProBNP 检测在急性脑梗死及预后中的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 70-73.
- ZHAO Man, ZHAO Ya, WANG Yu, et al. Clinical application of serum HCY, Cys C and NT-proBNP joint detection in diagnosis and prognosis of acute cerebral infarction[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3): 70-73.
- [3] MAO Xudong, XING Xubin, XU Rong, et al. Folic acid and vitamins D and B12 correlate with homocysteine in Chinese patients with type-2 diabetes mellitus, hypertension, or cardiovascular disease[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(6): e2652.
- [4] 杨宏斌, 黄巧平. 老年心功能衰竭患者血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平检测与 NYHA 分级的相关性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 64-67, 71.
- YANG Hongbin, HUANG Qiaoping. Application of combined detection of serum NT-proBNP and hs-TnT by electrochemiluminescence in evaluation of elderly patients with heart failure[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 64-67, 71.
- [5] 李丽琪, 张丽中, 冯玫, 等. 原发性高血压患者血清同型半胱氨酸与左心室几何构型的相关性分析[J]. 中华全科医师杂志, 2018, 17(3): 207-209.
- LI Liqi, ZHANG Lizhong, FENG Mei, et al. Correlation between serum homocysteine level and left ventricular geometry in essential hypertension[J]. Chinese Journal of General Practitioners, 2018, 17(3): 207-209.
- [6] 李艳兰. 慢性心力衰竭病人左室射血分数与血清 NT-proBNP 及 Hcy 水平的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(10): 2722-2723.
- LI Yanlan. Correlation between left ventricular ejection fraction and serum LEVELS of NT-proBNP and Hcy in patients with chronic heart failure[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(10): 2722-2723.
- [7] LENG Yiping, MA Yeshuo, LI Xiaogang, et al. L-Hcy-induced cathepsin V mediates the vascular endothelial inflammation in hyperhomocysteinemia[J]. British Journal of Pharmacology, 2017, 175(8): 1157-1172.
- [8] FOURNIER P, FOURCADE J, RONCALLI J, et al. Homocysteine in chronic heart failure[J]. Clinical Laboratory, 2015, 61(9): 1137-1145.
- [9] 周文斌, 林新宇. 脑钠肽和同型半胱氨酸对慢性心力衰竭辨证分型的价值[J]. 广东医学, 2017, 34(3): 461-464.
- ZHOU Wenbin, LIN Xinyu. The study on traditional Chinese medicine differential diagnosis of chronic heart failure assisted by B-type natriuretic peptide and homocysteine[J]. Guangdong Medical Journal, 2017, 34(3): 461-464.
- [10] 解智慧, 姚丹林, 秦俭. 同型半胱氨酸水平与急性心力衰竭的相关性研究[J]. 中国医刊, 2016, 51(10): 36-38.
- XIE Zhihui, YAO Danlin, Qinjian. Correlative study between serum homocysteine and acute heart failure[J]. Chinese Journal of Medicine, 2016, 51(10): 36-38.
- [11] 薛有平, 雷毅, 刘峰, 等. Hcy, hsCRP, MPO 及 IMA 联合检测在老年脑动脉粥样硬化患者病情评估中的应用[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(18): 2782-2785.
- XUE Youping, LEI Yi, LIU Feng, et al. Combined detection of Hcy, hsCRP, MPO and IMA in the elderly application of condition assessment in patients with cerebral atherosclerosis[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2018, 15(18): 2782-2785.
- [12] SCHAFFER A, VERDOIA M, CASSETTI E, et al. Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study[J]. Thrombosis Research, 2014, 134(2): 288-293.

收稿日期: 2019-12-26

修回日期: 2020-07-23

## (上接第138页)

- WANG Shaoxia. Targeting miR-194-5p with long non-coding RNA H19 inhibits LPS-induced cardiomyocyte inflammatory response[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2019, 39(19): 4839-4842.
- [18] 焦玉蓓, 郭海, 余瑾, 等. HIF-1 $\alpha$  在七氟醚后处理减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(6): 758-760.
- JIAO Yubei, GUO Hai, YU Jin, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in sevoflurane postconditioning-induced reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2017, 37(6): 758-760.
- [19] 王珂, 石继红, 魏振衡. 微小 RNA-30a 对缺氧条件下心肌细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(7): 874-877, 880.
- WANG Ke, SHI Jihong, WEI Zhenheng. Influence of microRNA-30a on cardiomyocyte apoptosis under hypoxia condition and mechanism study[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2019, 11(7): 874-877, 880.
- [20] 苏彤, 张晓璞, 李勋. 循环微小 RNA-1 诊疗心肌梗死的研究进展[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(10): 1030-1033.
- SU Tong, ZHANG Xiaopu, LI Xun. Progress in the diagnosis and treatment of myocardial infarction by circulating microRNA-1[J]. Chinese Circulation Journal, 2019, 34(10): 1030-1033.

收稿日期: 2020-07-21

修回日期: 2020-09-02



## 新生儿坏死性小肠结肠炎患者血清 IL-12 及 IL-17 水平检测及临床意义

陈小冰, 张雪梅, 陈求凝, 谢邦贵, 卢玉朱 (三亚中心医院新生儿科, 海南三亚 572000)

**摘要:** **目的** 探讨新生儿坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 患儿血清白细胞介素-12 (IL-12) 及白细胞介素-17 (IL-17) 水平变化及临床意义。**方法** 选取 80 例新生儿 NEC 作为病例组和 65 例健康新生儿作为对照组。80 例 NEC 新生儿根据修正 Bell 分期分为 I 期组 (31 例), II 期组 (37 例) 和 III 期组 (12 例)。对照组于出生 3 天后, 病例组于治疗前检测血清 IL-12 及 IL-17 水平变化。应用 ROC 曲线分析血清 IL-12 及 IL-17 水平对新生儿 NEC 的诊断价值。**结果** 病例组血清 IL-12 ( $63.80 \pm 10.27$  ng/L vs  $20.62 \pm 5.83$  ng/L) 及 IL-17 ( $22.73 \pm 6.50$  ng/L vs  $6.35 \pm 2.28$  ng/L) 水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $t=12.640, 9.572$ , 均  $P<0.05$ )。III 期血清 IL-12 ( $79.30 \pm 14.80$  ng/L vs  $62.40 \pm 9.52$  ng/L,  $51.72 \pm 7.40$  ng/L) 及 IL-17 ( $34.60 \pm 9.72$  ng/L vs  $20.85 \pm 6.17$  ng/L,  $14.20 \pm 4.38$  ng/L) 水平均明显高于 I 期和 II 期, 差异有统计学意义 ( $F=10.205, 7.228$ , 均  $P<0.05$ ); 且 II 期血清 IL-12 及 IL-17 均明显高于 I 期 ( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析显示, 血清 IL-12 及 IL-17 水平诊断新生儿 NEC 的最佳截值分别为 48.75 ng/L 和 15.60 ng/L, 两项联合诊断新生儿 NEC 的曲线下面积 (0.902, 95%CI: 0.845 ~ 0.963) 最大, 其敏感度和特异度分别为 90.3% 和 83.5%。**结论** 血清 IL-12 与 IL-17 水平在新生儿 NEC 中明显升高, 且与患儿病情严重程度相关, 两项联合检测对新生儿 NEC 诊断具有一定的价值。

**关键词:** 新生儿; 坏死性小肠结肠炎; 白细胞介素-12; 白细胞介素-17

中图分类号: R722.132; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-179-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.044

## Detection and Clinical Significance of Serum IL-12 and IL-17 Levels in Neonatal Necrotizing Enterocolitis

CHEN Xiao-bing, ZHANG Xue-mei, CHEN Qiu-ning, XIE Bang-gui, LU Yu-zhu

(Department of Neonatology, Sanya Central Hospital, Hainan Sanya 572000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes and clinical significance of serum interleukin-12 (IL-12) and interleukin-17 (IL-17) levels in neonates with necrotizing enterocolitis (NEC). **Methods** 80 cases of NEC were selected as the case group and 65 healthy newborns as the control group. 80 NEC neonates were divided into I stage group (31 cases), II stage group (37 cases) and III stage group (12 cases) according to modified Bell stage. Serum IL-12 and IL-17 levels in the control group were detected three days after birth and in the case group before treatment. The diagnostic value of serum IL-12 and IL-17 levels in neonatal NEC were analyzed by ROC curve. **Results** Serum levels of IL-12 ( $63.80 \pm 10.27$  ng/L vs  $20.62 \pm 5.83$  ng/L) and IL-17 ( $22.73 \pm 6.50$  ng/L vs  $6.35 \pm 2.28$  ng/L) in the case group were significantly higher than those in the control group the differences were statistically significant ( $t=12.640, 9.572$ , all  $P<0.05$ ). Serum levels of IL-12 ( $79.30 \pm 14.80$  ng/L vs  $62.40 \pm 9.52$  ng/L,  $51.72 \pm 7.40$  ng/L) and IL-17 ( $34.60 \pm 9.72$  ng/L vs  $20.85 \pm 6.17$  ng/L,  $14.20 \pm 4.38$  ng/L) in III stage were significantly higher than those in I and II stage, the differences were statistically significant ( $F=10.205, 7.228$ , all  $P<0.05$ ). The levels of IL-12 and IL-17 in phase II were significantly higher than those in phase I ( $P<0.05$ ). ROC curve analysis showed that the best cut-off values of serum IL-12 and IL-17 levels for neonatal NEC were 48.75 ng/L and 15.60 ng/L, respectively. The area under the curve (0.902, 95% CI: 0.845~0.963) of the two combined diagnoses of neonatal NEC was the largest, with a higher sensitivity and specificity of 90.3% and 83.5%. **Conclusion** Serum levels of IL-12 and IL-17 were significantly increased in neonatal NEC, and correlated with the severity of the disease. The combined detection of IL-12 and IL-17 has certain value in the diagnosis of neonatal NEC.

**Keywords:** neonatal; necrotizing enterocolitis; interleukin-12; interleukin-17

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是一种常见于新生儿的急性肠道炎症性疾病, 其病情进展迅速, 预后较差, 治疗时间长, 严重时

死亡率高达 20% ~ 30%<sup>[1]</sup>。早期发现新生儿 NEC, 并进行及时、有效的临床治疗, 对改善 NEC 患儿的预后具有重要意义。目前, 新生儿 NEC 的病因及具体发病机制尚未完全明确, 且新生儿 NEC 的

早期症状多不典型,容易漏诊或误诊。因此,探寻新生儿 NEC 诊断及病情评估的生物学指标是研究热点。近期的研究表明,促炎因子白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12)及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)通过促进各种炎症因子的转录,启动炎症级联反应,参与 NEC 发病过程<sup>[2-3]</sup>。本研究通过观察 NEC 患儿血清 IL-12 及 IL-17 水平变化,分析其对新生儿 NEC 诊断及病情评估的价值,为新生儿 NEC 的诊疗提供参考依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2015年1月~2018年12月三亚中心医院收治的足月新生儿 NEC 80例作为病例组,其中男性52例,女性28例,胎龄37~40周,平均胎龄 $37.80 \pm 1.40$ 周。纳入标准:① NEC 的诊断符合《实用新生儿学》(4版)标准<sup>[4]</sup>,且为足月新生儿;②存在肠道症状和体征,全身症状和体征,腹部X线平片显示肠充气或功能性梗阻,肠胀气肠壁囊样积气体。排除标准:①非足月新生儿,低或极低出生体重儿;②并发其他消化系统疾病及感染性疾病者。另选取同期非消化系统疾病、非感染性疾病的健康足月新生儿65例作为对照组,其中男性44例,女性21例,胎龄37~41周,平均胎龄 $38.30 \pm 1.60$ 周。两组年龄、性别及胎龄等基本资料比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

1.2 方法 根据修正 Bell 分期<sup>[4]</sup>,将80例 NEC 患儿分为Ⅰ期31例:主要表现为全身非特异性症状及胃肠道表现,腹部X线检查表现为肠间隙增宽,肠壁增厚,无肠壁积气;Ⅱ期37例:除Ⅰ期症状外还可表现为肠鸣音消失及腹痛加重,X线可出现肠扩张,肠梗阻,肠壁积气征或伴门静脉积气;Ⅲ期12例:全身进行性恶化(如心动过缓,严重呼吸暂停,酸中毒,弥散性血管内凝血等),多有腹膜炎体征,X线常提示肠穿孔。对照组于出生3天后,病例组于治疗前采集空腹静脉血3 ml置于未加抗凝剂的离心管中,置37℃水浴箱30min后,以离心半径13.5cm,3 500r/min离心10min,分离血清保存于-80℃低温,待检。IL-12及IL-17采用酶联免疫吸附法检测,试剂盒由上海科新生物技术股份有限公司提供。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件分析,

计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,方差分析多组间均数,采用成组  $t$  检验进行两组间比较;计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验。血清 IL-12 及 IL-17 水平对新生儿 NEC 的诊断价值应用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线进行分析,曲线下面积(area under curve, AUC)比较采用  $Z$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 病例组和对照组血清 IL-12, IL-17, 白细胞计数及血小板比较 见表1。病例组血清 IL-12 及 IL-17 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。两组白细胞及血小板计数比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

表1 病例组和对照组血清 IL-12, IL-17, 白细胞及血小板计数比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组( $n=65$ )	病例组( $n=80$ )	$t$	$P$
IL-12 (ng/L)	$20.62 \pm 5.83$	$63.80 \pm 10.27$	12.640	<0.001
IL-17 (ng/L)	$6.35 \pm 2.28$	$22.73 \pm 6.50$	9.752	<0.001
白细胞( $\times 10^9/L$ )	$8.62 \pm 2.35$	$9.30 \pm 3.46$	0.713	0.548
血小板( $\times 10^9/L$ )	$263.40 \pm 58.20$	$258.60 \pm 56.30$	0.492	0.637

2.2 各期 NEC 患儿血清 IL-12 及 IL-17 水平比较 见表2。Ⅲ期血清 IL-12 及 IL-17 水平均明显高于Ⅰ期和Ⅱ期,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );且Ⅱ期血清 IL-12 及 IL-17 水平均明显高于Ⅰ期,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

表2 各期 NEC 患儿血清 IL-12 及 IL-17 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Ⅰ期( $n=31$ )	Ⅱ期( $n=37$ )	Ⅲ期( $n=12$ )	$F$	$P$
IL-12 (ng/L)	$51.72 \pm 7.40$	$62.40 \pm 9.52$	$79.30 \pm 14.80$	10.205	<0.001
IL-17 (ng/L)	$14.20 \pm 4.38$	$20.85 \pm 6.17$	$34.60 \pm 9.72$	7.228	<0.001

2.3 血清 IL-12 及 IL-17 水平对新生儿 NEC 的诊断价值 见表3。血清 IL-12 及 IL-17 水平诊断新生儿 NEC 的最佳截值分别为48.75ng/L, 15.60 ng/L, 两项联合诊断新生儿 NEC 的曲线下面积(0.902, 95%CI: 0.845~0.963)明显高于单项 IL-12 (0.826, 95%CI: 0.768~0.887) 及 IL-17 (0.797, 95%CI: 0.742~0.854),差异均有统计学意义( $Z=4.658, 5.116, P<0.05$ ),其敏感度和特异度为90.3%和83.5%。

表3 血清 IL-12 及 IL-17 水平对新生儿 NEC 的诊断价值

项目	最佳截值 (ng/L)	AUC (95%CI)	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比	阴性似然比	约登指数
IL-12	48.75	0.826 (0.768 ~ 0.887)	84.2	75.8	79.0	81.6	3.479	0.208	0.600
IL-17	15.60	0.797 (0.742 ~ 0.854)	80.4	73.6	70.3	84.2	3.045	0.266	0.540
两项联合	-	0.902 (0.845 ~ 0.963)	90.3	83.5	87.0	88.2	5.473	0.116	0.738

### 3 讨论

新生儿 NEC 是临床上常见的一类重症消化系统疾病,其病情进展快,早期表现不典型,轻症与重症临床表现差别较大,部分与早产儿并发症难以鉴别,临床上仍以预防、早期治疗为主<sup>[5-6]</sup>。目前,临床上缺乏对 NEC 早期诊断的可靠实验室指标,故其早期诊断率较低,往往延误了患儿救治的最佳时机。因此,寻找一种能早期诊断 NEC 的敏感度及特异度高的实验室指标对本病的诊治具有重要意义。IL-12 是重要的促炎介质,能激发炎症的级联反应,介导机体的免疫功能,与小儿肠道炎症性疾病的发生发展相关<sup>[7]</sup>。IL-17 是一种前炎症细胞因子,通过诱导多种细胞释放促炎因子参与 NEC 的发病<sup>[8]</sup>。

本研究显示,病例组血清 IL-12 及 IL-17 水平明显高于对照组,提示血清 IL-12 及 IL-17 水平在 NEC 患儿中呈高表达,可能参与 NEC 的发生发展。目前临床常以修正 Bell 分期诊断标准对 NEC 进行分期,其中 I 期为轻症 NEC,病情较少进展;II 期为 NEC 确诊期;III 期为重症 NEC,病情进展迅速、危重,死亡率极高。NEC 的预后与分期密切相关,若能在 I 期识别,及时给予禁食、抗生素治疗等处理,则有阻断病情进展的可能。反之,病情快速进展,肠道炎症加重,进入 III 期出现穿孔、腹膜炎表现,此时保守治疗则无效,只能外科手术处理。本研究显示,III 期血清 IL-12 及 IL-17 水平均明显高于 I 期和 II 期,且 II 期血清 IL-12 及 IL-17 水平均明显高于 I 期,提示血清 IL-12 及 IL-17 水平与 NEC 患儿的病情严重程度有关,其水平越高,NEC 患儿病情进展越快,发生死亡的风险越大。李晓霞等<sup>[9]</sup>研究发现,NEC 患儿血清 IL-12 呈高表达,对 NEC 的病情进展可能有促进作用,在 NEC 诊断中有一定价值。邱玉芬等<sup>[10]</sup>研究表明,血清 IL-17 水平在 NEC 患儿中显著升高,与重症 NEC 患儿预后显著相关,可能是 NEC 诊断或预后判断的一个预测因素。本研究进一步应用 ROC 曲线分析显示,血清 IL-12 及 IL-17 水平诊断新生儿 NEC 的最佳截值分别为 48.75 ng/L, 15.60 ng/L, 两项联合诊断新生儿 NEC 的曲线下面积 (0.902, 95%CI: 0.845 ~ 0.963) 最大,其敏感度和特异度较高。胡利霞等<sup>[11]</sup>研究表明,抗炎或促炎细胞因子水平与 NEC 的临床分期及肠道菌群丰富度密切相关,可作为 NEC 病情诊断的辅助指标。亦有研究认为,促炎细胞因子 IL-12 在新生儿 NEC 发病过程中起着重要作用,利用促炎细胞因子的拮抗剂,可为新生儿 NEC 的防治提供新的方向<sup>[12]</sup>。

综上所述,血清 IL-12 及 IL-17 水平在 NEC 患

儿中明显升高,与患儿病情严重程度相关,有望作为新生儿 NEC 早期诊断的实验室指标,两项联合检测对新生儿 NEC 诊断具有一定的价值。

### 参考文献:

- [1] RICH B S, DOLGIN S E. Necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatrics in Review*, 2017, 38(12): 552-559.
- [2] CORSINI I, SIMONE P, TAROCCHI M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal preterm rat model[J]. *Pediatric Research*, 2017, 81(2): 364-368.
- [3] TIAN Jiayi, LIU Yanjun, JIANG Yanfang, et al. Association of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 with necrotizing enterocolitis in premature infants[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2017, 430(1/2): 201-209.
- [4] 邵肖梅,叶鸿瑁,丘小汕. 实用新生儿学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2011: 477-482.  
SHAO Xiaomei, YE Hongmao, QIU Xiaoshan. *Practical neonatology* [M]. 4th Ed. Beijing: People's Health Press, 2011: 477-482.
- [5] 吕志宝,盛庆丰. 新生儿坏死性小肠结肠炎的病因与诊治研究进展[J]. *临床小儿外科杂志*, 2019, 18(5): 352-355.  
LÜ Zhibao, SHENG Qingfeng. Advances in the etiology, diagnosis and treatment of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *Journal of Clinical Pediatric Surgery*, 2019, 18(5): 352-355.
- [6] EATON S, REES C M, HALL N J. Current research on the epidemiology, pathogenesis, and management of necrotizing enterocolitis[J]. *Neonatology*, 2017, 111(4): 423-430.
- [7] BRUCE E S. Inhibition of interleukin-12 and/or-23 for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology & Hepatology*, 2016, 12(12): 784-786.
- [8] LAWRENCE S M, RUOSS J L, WYNN J L. IL-17 in neonatal health and disease[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2018, 79(5): e12800.
- [9] 李晓霞.  $\beta$ -葡萄糖苷酶、IL-6 和 IL-12 在诊断新生儿坏死性小肠结肠炎中的应用价值[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(23): 78-79, 83.  
LI Xiaoxia. The clinical diagnostic significance of cytosolic  $\beta$ -glucosidase, IL-6 and IL-12 in serum of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *China Modern Doctor*, 2012, 50(23): 78-79, 83.
- [10] 邱玉芬,高晓燕,冯琳,等. 白细胞介素-17 对坏死性小肠结肠炎早产儿病死率的预测价值[J]. *重庆医学*, 2016, 45(33): 4666-4668.  
QIU Yufen, GAO Xiaoyan, FENG Lin, et al. Value of interleukin-17 in predicting mortality rate of premature infants with necrotizing enterocolitis[J]. *Chongqing Medicine*, 2016, 45(33): 4666-4668.
- [11] 胡利霞,方红霞. 细胞因子与新生儿坏死性小肠结肠炎的相关性[J]. *中国妇幼保健研究*, 2019, 30(1): 19-22.  
HU Lixia, FANG Hongxia. Relationship between cytokines and neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *Chinese Journal of Woman and Child Health Research*,



- 2019, 30 (1): 19-22.
- [12] 蔡娜, 王瑞娟, 封志纯. 抗炎或促炎细胞因子在新生儿坏死性小肠结肠炎发病过程中的作用[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17 (1): 61-64.
- CAI Na, WANG Ruijuan, FENG Zhichun. The role of anti-inflammatory or proinflammatory cytokines in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2014, 17 (1): 61-64.
- 收稿日期: 2019-09-27 修回日期: 2020-06-11
- 
- (上接第86页) 源小分子非编码 RNA, microRNA-106b 在甲状腺癌、视网膜母细胞瘤、胃癌和肾细胞癌等组织中存在异常表达, 其在肝细胞癌和喉癌中呈显著高表达, 发挥促癌作用; 而在胶质瘤和胃癌中呈显著低表达。目前关于 microRNA-106b 与 CC 的关联研究相对较少, 本研究拟分析 microRNA-106b 在 CC 中的表达水平及不同水平 microRNA-106b 与 CC 患者临床病理特征间的关系, 旨在为 CC 的临床诊断提供合理参考。
- 结果显示, 相较于癌旁正常组织, microRNA-106b 在 CC 中呈显著高表达, 提示 microRNA-106b 是 CC 潜在的生物学标记物。高、低水平的 microRNA-106b 与 CC 患者的淋巴结转移和分化程度有密切关系。此外, 高水平的 microRNA-106b 患者的 OS 较低, 反之亦然, 提示 microRNA-106b 可预测 CC 患者的预后。下一阶段本研究组将继续深入开展 microRNA-106b 在 CC 中作用机制的有关研究。
- 综上所述, microRNA-106b 与 CC 的发生、发展有密切关系, 其对 CC 的诊治及预后有关键作用。
- 参考文献:**
- [1] HU Xiaoxia, SCHWARZ J K, LEWIS J S, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis[J]. Cancer Research, 2010, 70(4):1441-1448.
- [2] LI Shuang, HU Ting, LÜ Weiguo, et al. Changes in prevalence and clinical characteristics of cervical cancer in the People's Republic of China: a study of 10 012 cases from anationwide working group[J]. Oncologist, 2013, 18(10):1101-1107.
- [3] TALICIA T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS) [M]. Atlanta :GA American Cancer Society, 2012:66.
- [4] MIRANDA K C, HUYNH T, TAY Y, et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes[J]. Cell, 2006, 126(6):1203-1217.
- [5] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30):10513-10518.
- [6] SCHWARZENBACH H, NISHIDA N, CALIN G A, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2014, 11(Suppl 3):145-156.
- [7] HAN Ying, LIU Mei, WANG Ziyi, et al. Serum microRNAs related with chemoradiotherapy resistance in advanced-stage cervical squamous cell carcinoma [J]. Translational Oncology, 2017, 10(3):378-384.
- [8] HOW C K, HOU S K, SHIH H C, et al. Expression profile of microRNAs in gram-negative bacterial sepsis[J]. Shock, 2015, 43(2):121-127.
- [9] PARMIGIANI G, GARRETT E S, IRIZARRY R A, et al. The analysis of gene expression data: an overview of methods and software [M]. The Analysis of Gene Expression Data, New York: Springer, 2003:1-45.
- [10] SHIN J H, BLAY S, MCNENEY B, et al. LDheatmap: An R function for graphical display of pairwise linkage disequilibria between single nucleotide polymorphisms[J]. Journal of Statistical Software, 2006, 16(3): 1-10.
- [11] LI Feng, WANG Feiran, ZHU Changlai, et al. MiR-221 suppression through nanoparticle-based miRNA delivery system for hepatocellular carcinoma therapy and its diagnosis as a potential biomarker[J]. Int J Nanomedicine. 2018; 13: 2295-2307..
- [12] LIEB V, WEIGELT K, SCHEINOST L, et al. Serum levels of miR-320 family members are associated with clinical parameters and diagnosis in prostate cancer patients.[J]. Oncotarget, 2018, 9(12):10402-10416.
- [13] WANG Fengjun, ZHENG Zhiguo, GUO Jiangfeng, et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor[J]. Gynecologic Oncology, 2010, 119(3): 586-593.
- [14] GONG Chang, QU Shaohua, LÜ Xiaobin, et al. BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10 [J]. Nat Commun, 2014, 5(50):591-602.
- [15] GAO Chundi, ZHOU Chao, ZHUANG Jing, et al. MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers.[J]. Journal of cellular biochemistry, 2018, 119(8):7080-7090.
- [16] 余小多, 欧阳汉, 林蒙, 等. 2009 年国际妇产科联盟子宫内膜癌分期标准对磁共振成像分期诊断价值的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33 (9):692-696.
- YU Xiaoduo, OUYANG Han, LIN Meng, et al. Impact of 2009 FIGO staging system on the diagnostic value of preoperative MRI staging of endometrial carcinoma[J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33 (9):692-696.
- [17] YI Yuexiong, LIU Yanyan, WU Wanrong, et al. The role of miR-106p-5p in cervical cancer: from expression to molecular mechanism[J]. Cell Death Discovery, 2018, 4(1):87-108.
- [18] CHENG Yuan, GUO Yanli, ZHANG Youyi, et al. MicroRNA-106b is involved in transforming growth factor  $\beta$  1-induced cell migration by targeting disabled homolog 2 in cervical carcinoma[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016, 35(1):11.
- [19] RUAN Tongde, GU Chuanlan, GUO Hongbo, et al. C-myc-regulated miR-106b promotes proliferation of human bladder cancer cells by targeting DAPK2[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2017, 10(4), 4370-4376.
- 收稿日期: 2020-09-30 修回日期: 2020-11-18

# 血清热休克蛋白 70 与急性一氧化碳中毒后迟发性脑病的相关性研究

王小锋<sup>1</sup>, 关红<sup>2</sup>, 黄震<sup>3</sup>, 刘锋瑞<sup>4</sup>

(1. 商州区人民医院急诊科, 陕西商洛 726000; 2. 西安高新医院急诊科, 西安 710077;  
3. 宝鸡市中心医院全科, 陕西宝鸡 721008; 4. 西安医学院第一附属医院急诊科, 西安 710077)

**摘要:**目的 探讨血清热休克蛋白 70 (HSP70) 水平与急性一氧化碳中毒后迟发性脑病 (DEACMP) 的相关性。方法 选择 2015 年 1 月~2017 年 12 月收治的 187 例急性一氧化碳中毒 (ACMP) 患者为研究对象, 根据是否发生迟发性脑病分为 DEACMP 组和 ACMP 组, 另选 100 例同期健康志愿者作为对照组。采用酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 检测各组受试者血清中 HSP70 的水平。采用多因素 Logistic 回归分析法分析 ACMP 患者发生迟发性脑病的影响因素, 绘制 ROC 曲线评价血清 HSP70 对 ACMP 患者发生迟发性脑病的预测价值。结果 三组研究对象在性别、体重指数、高血压、糖尿病、颅内病变、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、血尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB) 和肌钙蛋白 I (cTnI) 方面差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。相比较于 ACMP 组, DEACMP 组年龄明显较高, DEACMP 组昏迷时间和接触 CO 时间均显著增长, 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=3.747\sim10.533$ , 均  $P < 0.05$ )。DEACMP 组和 ACMP 组血清中 HSP70 的水平均显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=3.443$ ,  $P < 0.05$ ), 且 DEACMP 组血清中 HSP70 的水平显著高于 ACMP 组 ( $P < 0.05$ )。血清 HSP70 和接触 CO 时间是 ACMP 患者发生迟发性脑病的危险因素。血清 HSP70 预测 ACMP 患者发生迟发性脑病的 cut-off 值为 32.9ng/ml, 其相应的敏感度和特异度分别为 0.827 和 0.709。结论 ACMP 患者中毒早期血清 HSP70 水平显著增高, 有可能成为预测 ACMP 患者发生迟发性脑病的新指标。

**关键词:** 血清热休克蛋白 70; 急性一氧化碳中毒后迟发性脑病; ROC 曲线分析

中图分类号: R749.63; R446.112 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-183-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.045

## Correlation between Serum Levels of Heat Shock Protein 70 and Delayed Encephalopathy after Acute Carbon Monoxide Poisoning

WANG Xiao-feng<sup>1</sup>, GUAN Hong<sup>2</sup>, HUANG Zhen<sup>3</sup>, LIU Feng-rui<sup>4</sup>

(1. Department of Emergency, Shangzhou District People's Hospital, Shaanxi Shangluo 726000, China; 2. Department of Emergency, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710077, China; 3. General Department, Baoji Central Hospital, Shaanxi Baoji 721008, China; 4. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between serum heat-clearing shock protein 70 (HSP70) level and delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning (DEACMP). **Methods** A total of 187 patients with acute carbon monoxide poisoning (ACMP) admitted from January 2015 to December 2017 were selected as research objects. According to whether delayed encephalopathy occurred, they were divided into DEACMP group and ACMP group. Another 100 healthy volunteers were selected as control group during the same period. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum HSP70 level in each group. Multivariate Logistic regression analysis was used to analyze the influencing factors of delayed encephalopathy in ACMP patients, and ROC curve was developed to evaluate the predictive value of serum HSP70 for delayed encephalopathy in ACMP patients. **Results** There were no statistically significant differences in gender, body mass index, hypertension, diabetes, intracranial lesions, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) and cardiac troponins I (cTnI) among the three groups ( $P > 0.05$ ). Compared with the ACMP group, age of DEACMP group was significantly higher and the coma time and CO exposure time of DEACMP group were significantly longer, with statistically significant differences ( $\chi^2=3.747\sim10.533$ , all  $P < 0.05$ ). The serum HSP70 level in DEACMP group and ACMP group was significantly higher than

作者简介: 王小锋 (1972-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 心肺血管疾病, E-mail: shangwangxf@163.com。

通讯作者: 黄震 (1976-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 内科疾病治疗, E-mail: huangzhen0606@126.com。

that in the control group, and the difference was statistically significant, and the serum HSP70 level in DEACMP group was significantly higher than that in ACMP group ( $P < 0.05$ ). Serum HSP70 and CO exposure time were risk factors for delayed encephalopathy in ACMP patients. The cut-off value of serum HSP70 for predicting the occurrence of delayed encephalopathy in ACMP patients was 32.9 ng/ml, and the corresponding sensitivity and specificity were 0.827 and 0.709, respectively. **Conclusion** The serum HSP70 level in ACMP patients at the early poisoning stage increased significantly, which may be a new indicator to predict the onset of delayed encephalopathy in ACMP patients.

**Keywords:** heat shock protein 70; delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning(DEACMP); ROC curve

急性一氧化碳中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACMP)的发生是由于含碳物质不完全燃烧产生相应的产物经由呼吸道吸入导致的。急性一氧化碳中毒轻度患者会出现头痛和头晕等临床症状,严重时甚至会导致患者死亡。越来越多的研究发现部分较严重的急性一氧化碳中毒患者在经过为期2~60天的假愈期后会出现迟发性脑病(delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning, DEACMP), DEACMP患者会出现锥体外症状和痴呆等<sup>[1-3]</sup>。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)依据相对分子质量的不同可分为六个家族,其中HSP70是最为重要的一族,具有细胞保护、抗氧化、分子伴侣等多种功能<sup>[4]</sup>,但是其在急性一氧化碳中毒后迟发性脑病中的作用尚不明确。

因此,本研究通过考察ACMP患者血清中HSP70水平的变化,旨在探究HSP70与DEACMP的相关性,为临床实践提供合理化参考,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 选择商州区人民医院2015年1月~2017年12月收治的187例ACMP患者为研究对象,其中男性84例,女性103例,年龄28~72岁,平均年龄 $47.9 \pm 9.4$ 岁。根据是否发生DEACMP,将其分为DEACMP组45例和ACMP组142例。另选同期我院健康体检的100例志愿者作为对照组,其中男性48例,女性52例,年龄29~68岁,平均年龄 $49.3 \pm 9.6$ 岁。

采集研究对象的一般资料,包括性别、年龄、体重指数、昏迷和接触CO时间、高血压、糖尿病和颅内疾病情况以及生化指标等。其中生化指标主要有丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)和肌钙蛋白I(cTnI)等。

纳入标准:①患者年龄在18~80岁;②患者具有完整的临床资料。排除标准:①并发恶性肿瘤、血液和免疫系统疾病及重要脏器功能障碍者;②精神疾病者;③近期出现过敏史且有激素、免疫抑制剂治疗史者;④妊娠者。本研究经我院伦理委员会

批准,所有受试者均签署知情同意书。

诊断标准:ACMP的诊断:严格参照《职业性急性一氧化碳中毒诊断标准及处理原则》上的相关规定(GB8781-88);DEACMP诊断标准:有一氧化碳中毒史,经过“假性治愈期”后突然发病,出现记忆力减退、神情淡漠、反应迟钝、腱反射失常等症状<sup>[5-6]</sup>。三组研究对象性别、体重指数、高血压、糖尿病和颅内疾病情况差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

1.2 试剂和仪器 ELISA试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.3 方法 血清中HSP70的检测:DEACMP组、ACMP组和对照组均于入院当日清晨空腹抽取外周静脉血,血样保存于肝素抗凝的无菌聚丙烯试管内,3000r/min离心5min取上清液,-20℃中保存备用。采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定HSP70的浓度。

1.4 统计学分析 运用统计学软件SPSS19.0进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料以 $n(\%)$ 表示。采用方差分析比较三组的均数,采用 $t$ 检验比较两组的均数,采用SNK-q检验比较组间两两之间的差异。

根据血清中HSP70的水平预测ACMP患者发生迟发性脑病的ROC曲线,计算曲线下相应的面积(AUC),采用单因素 $Z$ 检验比较不同指标下的AUC,进而确定预测ACMP患者发生迟发性脑病的cut-off值及对应的敏感度和特异度。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 三组一般资料的比较 见表1。相较于ACMP组,DEACMP组和对照组患者的年龄较高,DEACMP组患者的昏迷时间和接触CO时间均增长,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.2 DEACMP组和ACMP组血清中HSP70的水平比较 见表2。三组生化指标(ALT, AST, BUN, Cr, CK, CK-MB和cTnI)的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。相较于对照组血清中HSP70的水平,DEACMP组和ACMP组均显著升高,且DEACMP组显著高于ACMP组( $P < 0.05$ )。



表1 各组一般临床特征比较

临床特征	DEACMP组 (n=45)	ACMP组 (n=142)	对照组 (n=100)	$\chi^2$	P
年龄(岁)	51.5 ± 11.7	46.7 ± 8.9	49.3 ± 9.6	4.985	0.007
昏迷时间(h)	36.5 ± 11.6	30.1 ± 9.4	—	3.747	0.000
接触CO时间(h)	15.3 ± 3.8	9.4 ± 3.1	—	10.533	0.000

表2 各组生化指标和HSP70水平的比较

项目	DEACMP组 (n=45)	ACMP组 (n=142)	对照组 (n=100)	$\chi^2$	P
ALT(U/L)	37.8 ± 9.7	36.5 ± 8.4	34.9 ± 7.2	2.208	0.112
AST(U/L)	40.1 ± 11.9	38.4 ± 10.2	36.9 ± 11.2	1.445	0.238
BUN(mmol/L)	7.2 ± 1.3	7.3 ± 1.0	7.2 ± 1.0	0.319	0.736
Cr( $\mu$ mol/L)	82.6 ± 12.1	80.5 ± 11.6	81.5 ± 10.3	0.668	0.515
CK(U/L)	118.8 ± 31.6	121.5 ± 27.7	112.3 ± 33.6	2.701	0.069
CK-MB(U/L)	23.0 ± 4.4	22.5 ± 3.8	22.6 ± 3.7	0.303	0.742
cTnI( $\mu$ g/L)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.399	0.249
HSP70(ng/ml)	36.8 ± 6.6	27.7 ± 5.9	12.5 ± 4.6	3.443	0.000

2.3 Logistic多因素回归分析 见表3。以ACMP患者是否发生迟发性脑病为因变量,以年龄、昏迷时间、接触CO时间和血清HSP70为自变量。采用

Logistic多因素回归分析,结果显示血清HSP70和接触CO时间是ACMP患者发生迟发性脑病的危险因素。

表3 Logistic多因素回归分析

变量	B	SE	Wals	OR	95%CI	P
年龄	0.150	0.224	0.449	1.162	(0.846-6.702)	0.367
昏迷时间	0.533	0.461	1.337	1.704	(0.093-8.411)	0.085
接触CO时间	0.816	0.615	1.760	2.261	(1.218-6.160)	0.000
血清HSP70	0.450	0.433	1.079	1.568	(1.046-8.601)	0.003

2.4 ROC曲线 见图1。血清HSP70和接触CO时间是ACMP患者发生迟发性脑病的危险因素。绘制血清HSP70和接触CO时间预测ACMP患者发生迟发性脑病的ROC曲线,AUC分别为0.747(0.656,0.831)和0.783(0.684,0.882),差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。按照约登指数最大原则,血清HSP70预测ACMP患者发生迟发性脑病的cut-off值为32.9ng/ml,其相应的敏感性和特异性分别为0.827和0.709。

发生的指标,因而使其发生风险较高。深入探究DEACMP的发生机制和预测指标是研究的重要趋势,目前研究认为DEACMP的发生可能是由微栓子形成、自身免疫机制异常和自由基过量等导致的<sup>[7-8]</sup>。

ACMP是一种典型的应激状态,有研究发现CO中毒后机体HSP表达水平显著增加<sup>[9-11]</sup>,本研究结果亦显示相较于对照组,DEACMP组和ACMP组血清中HSP70的水平显著升高,再次证实了HSP70参与CO中毒的病理改变过程。本研究结果显示DEACMP组血清中HSP70的水平显著高于ACMP组,提示血清HSP70可能是预测DEACMP发生的有效指标。

本研究中以ACMP患者是否发生迟发性脑病为因变量,以年龄、昏迷时间、接触CO时间和血清HSP70为自变量。采用Logistic多因素回归分析,结果显示血清HSP70和接触CO时间是ACMP患者发生迟发性脑病的危险因素,进一步绘制血清HSP70和接触CO时间预测ACMP患者发生迟发性脑病的ROC曲线,两者AUC无显著性差异( $P > 0.05$ ),按照约登指数最大原则,血清HSP70预测ACMP患者发生迟发性脑病的cut-off值为32.9ng/ml,其相应的敏感度和特异度分别为0.827和0.709,

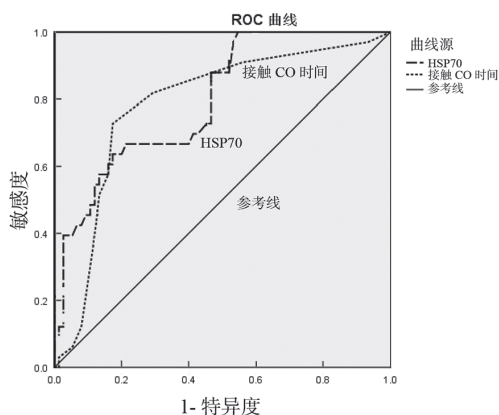


图1 ROC曲线

### 3 讨论

在临床实践中常因缺少准确预测DEACMP

表明应用血清 HSP70 预测 DEACMP 的敏感度较高,而特异度稍差,可联合其他危险因素以提高预测 DEACMP 的效率。

综上所述,本研究发现血清 HSP70 有可能成为早期预测 DEACMP 发生的有效指标。同时需要指出的是本研究还存在样本量有限和静态监测血清 HSP70 水平等诸多不足,在接下来的工作中将会逐步克服上述不足,更深入探究血清 HSP70 水平与 DEACMP 发生的相关性。

#### 参考文献:

- [1] ZHAO Ningjun, LIANG Pengchong, ZHUO Xiaoying, et al. After treatment with methylene blue is effective against delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning [J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2018, 122(5): 470-480.
- [2] YANAGIHA K, ISHII K, TAMAOKA A. Acetylcholinesterase inhibitor treatment alleviated cognitive impairment caused by delayed encephalopathy due to Carbon monoxide poisoning: Two case reports and a review of the literature[J]. Medicine, 2017, 96(8): e6125.
- [3] 孔繁托, 张桂兰, 李敬, 等. 神经节苷脂联合纳美芬对一氧化碳中毒迟发性脑病的治疗作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(11):1400-1405.  
KONG Fantuo, ZHANG Guilan, Li Jing, et al. Clinical value of ganglioside combined with nalmefene on delayed encephalopathy after carbon monoxide poisoning[J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2016, 25(11):1400-1405.
- [4] KIM J Y, KIM N, ZHENG Zhen, et al. 70-kDa heat shock protein downregulates dynamin in experimental stroke a new therapeutic target [J]. Stroke, 2016, 47(8): 2103-2111.
- [5] ORABY A M, RAOUF E R, EL-SAIED M M, et al. Cognitive function and heat shock protein 70 in children with temporal lobe epilepsy[J]. Journal of Child Neurology, 2017, 32(1): 41-45.
- [6] KIM J Y, KIM N, ZHENG Zhen, et al. The 70kD heat shock protein protects against experimental traumatic brain injury[J]. Neurobiol Dis, 2013, 58:289-295.
- [7] 汪涛. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病的临床分析 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(12):19-21.  
WANG Tao. Clinical analysis of delayed encephalopathy caused by acute carbon monoxide poisoning[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2019, 13(12):19-21.
- [8] 唐庆, 李颖, 王永义, 等. 糖皮质激素联合高压氧防治急性一氧化碳中毒迟发性脑病疗效与安全性 Meta 分析 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(2):207-214.  
TANG Qing, LI Ying, WANG Yongyi, et al. Glucocorticoids and high pressure oxygen in prevention and treatment of delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning: a meta-analysis for efficacy and safety[J]. Journal of third military medical university, 2016, 38(2):207-214.
- [9] LI Q, SONG J J, ZHANG H Y, et al. Dexamethasone therapy for preventing delayed encephalopathy after Carbon monoxide poisoning[J]. Biotechnic & Histochemistry, 2015, 90(8): 561-567.
- [10] 李润琰. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病多因素 Logistic 回归分析 [D]. 邯郸: 河北工程大学, 2019.  
LI Runyan. Logistic regression analysis of delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning[D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2019.
- [11] 李平, 李耀峰. 急性一氧化碳中毒患者血清心肌酶谱动态观察及意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(6):67-68.  
LI Ping, LI Yaofeng. Dynamic observation and significance of serum myocardial enzyme profile in patients with acute carbon monoxide poisoning[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2007, 22(6):67-68.

收稿日期: 2019-08-30 修回日期: 2020-07-15

(上接 166 页)

- [10] KOTZE D, KRUGER T F. HLA-G as a marker for embryo selection in assisted reproductive technology [J]. Fertility and Sterility, 2013, 100(6): E44.
- [11] FERREIRA L M R, MEISSNER T B, TILBURGS T, et al. HLA-G: at the interface of Maternal-Fetal tolerance[J]. Trends in Immunology, 2017, 38(4): 272-286.
- [12] 章鸯, 周美英, 戴美珍, 等. HLA-G 多态性与习惯性流产的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(3):7-8, 27.  
ZHANG Yang, ZHOU Meiyang, DAI Meizhen, et al. The recent advances of HLA-G polymorphism and recurrent spontaneous abortion[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2013, 21(3):7-8, 27.
- [13] TILBURGS T, EVANS J H, CRESPO A C. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(43): 13312-13317.
- [14] FERREIRA L M, MEISSNER T B, MIKKELSEN T S, et al. A distant trophoblast-specific enhancer controls HLA-G expression at the maternal-fetal interface[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(19): 5364-5369.
- [15] DESAI N, FILIPOVITS J, GOLDFARB J. Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit[J]. Reproductive Bio Medicine Online, 2006, 13(2): 272-277.
- [16] KEMPER J M, VOLLENHOVEN B J, HEALEY M, et al. IVF outcomes associated with preimplantation genetic screening in blastocyst-stage embryos[J]. Fertility and Sterility, 2018, 110(4): e417-e418.
- [17] Practice Committee, American Society for Reproductive Medicine, Montgomery Highway, Birmingham, Alabama. Blastocyst culture and transfer in clinically assisted reproduction: A committee opinion[J]. Fertility and Sterility, 2018, 110(7):1246-1252.

收稿日期: 2020-03-20 修回日期: 2020-08-07

## 《现代检验医学杂志》投稿须知

1 《现代检验医学杂志》创刊于1986年1月,是一个国内外公开发行的学术性期刊。刊号:ISSN(国际标准刊号)1671-7414, CN(国内统一刊号)61-1398/R。以各级医疗卫生单位的检验工作者、医学科研单位的实验研究人员和大、中专院校检验专业的教师和学生为主要读者对象。

2 本刊以报道临床生物化学、临床微生物学、临床免疫学、遗传学、分子生物学、临床医学、肿瘤医学、临床血液学、临床输血医学、寄生虫学、医学实验室管理学等学科的基础研究和实验诊断方法学为重点,选登的文章包括各学科领域的最新研究成果、创新理论和技术及有关学科实验诊断方面的国内外最新进展和发展动态等。辟有述评、论著、研究简报·实验技术、检验与临床、质量控制·实验室管理、综合报道·经验交流、综述·讲座等十多个栏目。欢迎惠赐内容符合以上栏目的稿件。

3 文稿应具有科学性、先进性、逻辑性和一定的实用性。内容必须详实,论点明确、严谨,论据充足;文章结构紧凑,层次清楚,重点突出;语言精炼、通顺,标点符号正确,无错别字,数据准确无误。统计处理正确、恰当:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$ )时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 $t$ 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 $q$ 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$ 等)应尽可能给出具体的 $P$ 值(如 $P=0.0238$ ),当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出95%可信区间。稿件篇幅不宜过长,一般论著类总字数(包括摘要、图表、参考文献)宜在3500字内,综述类3000~4000字左右,短篇及一般文章类500~1500字以内,消息类500字以内。文题应能反映文章中心内容,简短而确切。作者姓名必须准确无误,工作单位必须写全称,并写明单位所在地及邮政编码,部队作者尤请注意。另将第一作者和通讯作者的联系方式注明,以便与作者联系。并请另附英文文题、作者姓名(汉语拼音)及其工作单位。有汉语摘要的A类文章,还需附英文摘要和作者简介。

4 来稿直接采用网上投稿。在本刊网站(<http://www.xdjyxxzz.com>)上注册后在线投稿。希腊字母和其它各种符号,务必表达正确。本刊所发表文章的各级标题,按“1”、“1.1”、“1.1.1”、“1.1.1.1”的顺序分级标写,以分清层次。

5 医学名词以国家卫生健康委发布的《常用临床医学名词(2019版)》为准,暂未审定公布者仍以人民卫生出版社编《英汉医学词汇(第2版)》为准。计量单位与符号以国务院1984年2月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》为准。简化字以1986年10月15日人民日报公布的《简化字总表》为准。

6 文中图、表应力求少而精,图、表设计要简明,能用文字表达清楚的尽量不用表和图。为避免重复,图表内容不在正文中一一复述,只需强调或摘述其主要发现。表应有表序(如表1、2……)、表题(要精炼,不需加“统计表”、“比较表”等字样)。表内只用横线三条,呈“三”字形。单位名称应集中在表目内,切勿写在表中,所有数据应作统计学处理。照片图稿宜突出主体影像,要求图像清晰,层次分明,反差适度。图的大小以宽度为限,分成两档:60 mm或120 mm。图高不限但要与宽度成比例。

7 论著应包括文题、作者、单位、摘要、关键词(以上包括中英文两种形式)、引言(该2字不要写上)、材料和方法或临床资料、结果、讨论、致谢及参考文献。

7.1 文题 要确切反映全文的特定内容,见上3,不用副题。20字左右,不宜超过26字。

7.2 作者 不宜过多,2人间加逗号,如是单名单姓,则姓和名间空一格。2位以上作者按贡献大小统一排序,如由多单位组成,则在作者的右上角用数字注明,单位排在后,并在单位的



左前方用数字注明,加圆括号。

7.3 摘要 “摘要”两字间空一格。以250字为宜,应为资料性、报道性,包括目的、方法、结果(含主要数据)和结论,着重说明创新和发现。

7.4 关键词 2~5个,请尽可能选用中国医学科学院医学情报研究所翻译出版的《医学主题词注释字顺表(2002年版,英汉对照)》中所列的词或《汉语主题词表》中的词。

7.5 脚注 注明该科研的基金来源及其编号。在文题后右上角注“\*”,脚注置于首页底用半栏横线与正文隔开。

7.6 层次系统,尽量减少。各层次间一律用阿拉伯数字连续编号,不同层次的数字之间用下圆点“.”相隔,最末数字后面不加标点:见上4,各级标序均左顶格,后空1字排标题(或正文),各级标题后空1字。

7.7 引言 通常不超过250字。扼要概述本题的来龙去脉和实验基础,勿作详细的历史回顾和综述。

7.8 材料和方法 重要仪器应注明厂家和型号,试剂应注明厂家、纯度等。一般方法可引文献。如有创新或新改进,则应具体描述。

7.9 表和图 其设计应正确、易懂有自明性。其它见上6。

7.10 讨论 着重讨论新发现及有关结论,避免推论太远,评价不当,勿作文献综述。

7.11 致谢 是对有实际贡献、对文稿作重大修改的人表示感谢。应征得被致谢者的同意并签字。

8 参考文献 以亲自阅读近3~5年的主要文献为限,不少于10条,综述不少于20条。勿引未公开发表的文章和译文。参照GB/T7714-2015《信息与文献参考文献著录规则》书写,并按文内出现先后编序,注于右上角方括号内,文末按顺序列出。

8.1 期刊 “[序号]作者.文题[J].刊名,出版年,卷(期):起止页”作者1~3位全列出,2位间加逗号,超过三位时写前3位加“等”“et al”(西文)或“他”(日文)。我国作者姓名全写出,单名单姓者姓和名间空1格;日本人姓名当用汉字时全写出,单姓者在姓后空1格,单名者在名前空1格:西文姓名用全拼,不加圆点。中文期刊写全名,西文期刊按Index Medicus缩写。

8.2 书籍 “[序号]作者.书名[M].卷次.版次.出版地:出版者,出版年:起止页”;或“作者.文题//主编者.书名.卷次.版次.出版地:出版者,出版年:起止页”。

8.3 参考文献一两条者可列于正文,不必在文末另列。

8.4 中文参考文献必须同时翻译成英文,中英文同时出现。

9 经验交流要求与论著相似,参考文献3~6条,研究简报及短篇报道不要文摘,其它体裁的文章其层次更应简明扼要。

10 本刊对来稿有义务作文字修改、删节等编辑加工,凡有涉及原意的修改,则要提请作者考虑。

11 来稿应经作者科室和单位主管学术的机构审核,并附单位的推荐信。凡来稿在接到本刊回执3个月以后,如未接到稿件处理通知者,系仍在审稿研究之中,作者如欲改投他刊,望事先与本刊联系,勿一稿两投。

12 来稿须付审稿和稿件处理费(本刊编委、特邀编委为第一作者的稿件和特约稿件免收)100元。请通过邮局或直接向本刊编辑部账号汇款。

13 来稿决定采用后,即发录用通知并同时通知作者付稿件发表费,款到发稿,并付报销凭证。稿件刊出后酌致稿酬,并赠当期杂志若干本。稿件处理过程中有关事宜均与第一作者联系。

14 通讯地址:西安市友谊西路256号 陕西省人民医院内 现代检验医学杂志编辑部收 邮政编码:710068 E-mail:xdjyxx@126.com 联系电话:029-85249600-2424,2006(传真)

本稿约中未尽事宜,请径向本刊编辑部咨询。