

• 论 著 •

AFP、AKT2、SATB1 在原发性肝癌患者中的 表达水平及与临床病理特征的关系*

李 欢¹, 董宇曦²

1. 河北省唐山市人民医院检验科, 河北唐山 063000; 2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102446

摘 要:目的 探讨甲胎蛋白(AFP)、丝/苏氨酸蛋白激酶(AKT)2、核基质结合区结合蛋白(SATB)1 在原发性肝癌患者中的表达水平及与临床病理特征的关系。方法 收集 2019 年 5 月至 2020 年 5 月于唐山市人民医院接受手术治疗的 82 例原发性肝癌患者的病历资料进行回顾性研究,测定癌组织及癌旁组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平,分析癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系,对比术后 1 年复发与未复发患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平,采用 Logistic 回归分析原发性肝癌患者术后复发的影响因素,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 对术后复发的预测价值。结果 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平高于癌旁组织($P<0.05$);癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与 TNM 分期、病理分级有关($P<0.05$);复发者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平高于未复发者($P<0.05$);癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平升高均为术后复发的影响因素($P<0.05$);癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 联合预测复发的曲线下面积为 0.853,灵敏度为 89.47%,特异度为 71.43%。结论 原发性肝癌患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与 TNM 分期、病理分级及术后复发有关,三者联合检测可为临床预测术后复发提供有效的量化参考依据,亦可能为原发性肝癌治疗提供新的靶点。

关键词:甲胎蛋白; 丝/苏氨酸蛋白激酶 2; 核基质结合区结合蛋白 1; 原发性肝癌; 病理特征; 复发

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.020 **中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2022)18-2274-06 **文献标志码:**A

Expression levels of AFP, AKT2 and SATB1 in patients with primary liver cancer and their relationship with clinicopathological characteristics*

LI Huan¹, DONG Yuxi²

1. Department of Clinical Laboratory, Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. College of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102446, China

Abstract: Objective To explore the expression levels of alpha-fetoprotein (AFP), serine/threonine protein kinase 2 (AKT2) and nuclear matrix binding domain binding protein 1 (SATB1) in the patients with primary liver cancer and their relationship with clinicopathological characteristics. **Methods** The case data of 82 patients with primary liver cancer receiving surgery in the Tangshan Municipal People's Hospital from May 2019 to May 2020 were selected for conducting the retrospective study. The expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues and paracancerous tissues were measured. The relationship between the expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues with the clinicopathological characteristics were analyzed. The expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues were compared between the patients with recurrence and the patients without recurrence in postoperative 1 year. The Logistic regression was used to analyze the influencing factors of postoperative recurrence in patients with primary liver cancer, and the predictive values of AFP mRNA, AKT2 mRNA, SATB1 mRNA in cancer tissue for postoperative recurrence were analyzed by adopting the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues were higher than those in paracancerous tissues ($P<0.05$); the expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues were related to the TNM staging

* 基金项目:河北省唐山市卫生和计划生育委员会课题(20171303)。

作者简介:李欢,女,副主任技师,主要从事肝癌诊断方面的检验研究。

and pathological grading ($P < 0.05$); the expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues of the patients with recurrence were higher than those of the patients without recurrence ($P < 0.05$); the high expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues were all influential factors for postoperative recurrence ($P < 0.05$); the area under the curve of the combination detection of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in cancer tissues for predicting recurrence was 0.853, the sensitivity was 89.47% and the specificity was 71.43%. **Conclusion** The expression levels of AFP mRNA, AKT2 mRNA and SATB1 mRNA in the cancer tissues of the patients with primary liver cancer are related to the TNM staging, pathological grading and postoperative recurrence. The combination detection of the three can provide an effectively quantitative reference basis for clinical prediction of postoperative recurrence, which also may provide the new target spot for the treatment of primary liver cancer.

Key words: alpha-fetoprotein; serine/threonine protein kinase 2; nuclear matrix binding domain binding protein 1; primary liver cancer; pathological features; recurrence

原发性肝癌为世界十大恶性肿瘤之一,具有发病隐匿、恶性程度高、复发率高、预后差等特点^[1-2]。目前,临床治疗原发性肝癌多采用以手术治疗为主的综合治疗方案,但由于肝癌发展迅速并有转移潜能,术后复发、转移较为常见,患者 5 年生存率为 25%~39%^[3-4]。目前,人们对原发性肝癌发生、发展和转移等的分子机制仍不清楚。因此,研究原发性肝癌发展进程的分子机制,探讨能阻断原发性肝癌发展的靶点,以改善患者预后是亟待解决的问题。既往研究证实,甲胎蛋白(AFP)、丝/苏氨酸蛋白激酶(AKT)2、核基质结合区结合蛋白(SATB)1 与乳腺癌、肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤的发生、发展、转移生物学行为有关^[5-7]。目前,AKT2、SATB1 用于预测原发性肝癌术后复发风险,临床鲜有报道。基于此,本研究尝试探讨癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达与原发性肝癌临床病理特征的关系及预测术后复发的价值,旨在为临床防治该病提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 5 月至 2020 年 5 月于唐山市人民医院接受手术治疗的 82 例原发性肝癌患者的病历资料进行回顾性研究。纳入标准:均符合原发性肝癌诊断标准及相关分期标准^[8],经术后病理检查证实为原发性肝癌;术前均未进行任何抗癌治疗;手术方案为根治性切除术;有完整的临床病历和病理学资料;有完整的随访记录。排除标准:术前肝功能或其他器官功能严重不全;合并其他器官、组织恶性肿瘤;精神、心理异常。其中男 59 例,女 23 例;年龄 < 60 岁 63 例,≥ 60 岁 19 例;合并肝硬化 62 例,未合并肝硬化 20 例;肿瘤最大径: < 3 cm 23 例, 3~5 cm 19 例, > 5 cm 40 例;TNM 分期:Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 51 例,Ⅲ期 17 例;病理分级:高分化 37 例,中分化 23 例,低分化 22 例。

1.2 方法 (1)临床病理特征收集:包括性别、年龄、肿瘤数目、有无肝硬化、肿瘤最大径、TNM 分期、病理分级等。(2)AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1

mRNA 检测:提取肝癌组织、癌旁组织总 RNA,反转录为 cDNA,以 β -actin 为内参,采用实时荧光定量 PCR 测定 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达。条件:95 °C 预变性 2 min, 95 °C 15 s, 64 °C 15 s, 60 °C 45 s 为 1 个循环,共 45 个循环,检测基因相对表达量(公式为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$)。(3)随访。术后 1 年定期行影像学检查(肝动脉造影、B 超、CT、MRI 等),发现肝内新发病灶为复发,否则为未复发。

1.3 观察指标 (1)癌组织及癌旁组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平。(2)癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系。(3)对比术后 1 年复发与未复发患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平。(4)分析原发性肝癌患者术后复发的影响因素。(5)分析癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 对原发性肝癌患者术后复发的预测价值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件处理数据。计量资料先进行方差齐性检验与正态性检验,均确认方差齐性且近似服从正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD- t 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;术后复发的影响因素采用 Logistic 回归进行分析;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析各指标的预测价值,获取曲线下面积(AUC)、置信区间、灵敏度、特异度及 cut-off 值,联合预测实施 Logistic 二元回归拟合,返回预测概率 $\text{logit}(P)$ 作为独立检验变量。均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织及癌旁组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平比较 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平均高于癌旁组织($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系 癌组织

AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与 TNM 分期、病理分级有关($P<0.05$)。见表 2。

表 1 癌组织及癌旁组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组织	<i>n</i>	AFP mRNA	AKT2 mRNA	SATB1 mRNA
癌组织	82	0.37±0.09	1.31±0.21	0.20±0.05
癌旁组织	82	0.21±0.03	1.12±0.15	0.05±0.02
<i>t</i>		15.272	6.667	25.223
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 不同预后患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mR-

NA、SATB1 mRNA 表达水平比较 术后 1 年复发 19 例,复发率为 23.17%(19/82)。复发者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平平均高于未复发者($P<0.05$)。见表 3。

2.4 原发性肝癌患者术后复发影响因素的多因素 Logistic 回归分析 以原发性肝癌患者术后复发情况为因变量,以癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达作为自变量,赋值见表 4,多因素 Logistic 回归分析结果显示,癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平升高均为术后复发的独立影响因素($P<0.05$)。见表 5。

表 2 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

临床病理特征	<i>n</i>	AFP mRNA	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	AKT2 mRNA	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	SATB1 mRNA	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
性别			1.137	0.259		0.741	0.461		0.857	0.394
男	59	0.38±0.11			1.32±0.23			0.20±0.05		
女	23	0.35±0.10			1.28±0.19			0.19±0.04		
年龄(岁)			1.093	0.278		0.704	0.484		0.844	0.401
<60	63	0.36±0.10			1.30±0.21			0.20±0.04		
≥60	19	0.39±0.12			1.34±0.24			0.21±0.06		
肿瘤数目(个)			0.463	0.645		0.521	0.604		0.750	0.455
1	61	0.37±0.08			1.30±0.23			0.20±0.05		
≥2	21	0.38±0.10			1.33±0.22			0.21±0.06		
肝硬化			1.239	0.219		0.729	0.468		0.845	0.401
有	62	0.38±0.13			1.32±0.22			0.20±0.05		
无	20	0.34±0.11			1.28±0.19			0.19±0.03		
肿瘤最大径(cm)			0.661	0.519		0.094	0.910		1.997	0.143
<3	23	0.35±0.09			1.30±0.19			0.18±0.05		
3~5	19	0.37±0.11			1.30±0.18			0.20±0.06		
>5	40	0.38±0.10			1.32±0.23			0.21±0.06		
TNM 分期			10.905	<0.001		6.326	0.003		16.283	<0.001
I 期	14	0.29±0.08			1.20±0.15			0.16±0.03		
II 期	51	0.36±0.11			1.30±0.18			0.19±0.05		
III 期	17	0.47±0.13			1.43±0.21			0.26±0.07		
病理分级			19.505	<0.001		11.805	<0.001		16.939	<0.001
高分化	37	0.30±0.09			1.21±0.17			0.17±0.04		
中分化	23	0.38±0.12			1.32±0.20			0.21±0.05		
低分化	22	0.48±0.12			1.47±0.24			0.24±0.05		

表 3 不同预后患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	AFP mRNA	AKT2 mRNA	SATB1 mRNA
复发	19	0.45±0.08	1.46±0.25	0.24±0.06
未复发	63	0.35±0.12	1.26±0.21	0.19±0.04
<i>t</i>		3.404	3.479	4.219
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

表 4 变量赋值表

变量	赋值
因变量	
术后复发	否=0,是=1
自变量	
AFP mRNA	具体值
AKT2 mRNA	具体值
SATB1 mRNA	具体值

2.5 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 对原发性肝癌患者术后复发的预测价值 以复发者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 作为阳性样本,以未复发者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 作为阴性样本,

绘制各指标预测原发性肝癌患者术后复发的 ROC 曲线。结果显示,癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 单独预测复发的 AUC 分别为 0.815、0.756、0.761,三者联合预测的 AUC 为 0.853。见表 6、图 1。

表 5 原发性肝癌患者术后复发影响因素的多因素 Logistic 回归分析

项目	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
AFP mRNA	1.379	0.352	15.337	<0.001	3.969	2.059~7.651
AKT2 mRNA	1.425	0.369	14.913	<0.001	4.158	2.147~8.052
SATB1 mRNA	1.303	0.408	10.195	<0.001	3.679	1.983~6.827

表 6 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达对原发性肝癌患者术后复发的预测价值

指标	AUC	95%CI	Z	P	cut-off 值	灵敏度(%)	特异度(%)
AFP mRNA	0.815	0.714~0.893	6.262	<0.001	>0.40	73.68	74.60
AKT2 mRNA	0.756	0.737~0.683	3.998	<0.001	>1.32	73.68	71.43
SATB1 mRNA	0.761	0.655~0.849	3.918	<0.001	>0.23	62.63	87.30
三项联合	0.853	0.757~0.921	8.245	<0.001	—	89.47	71.43

注:—表示无数据。

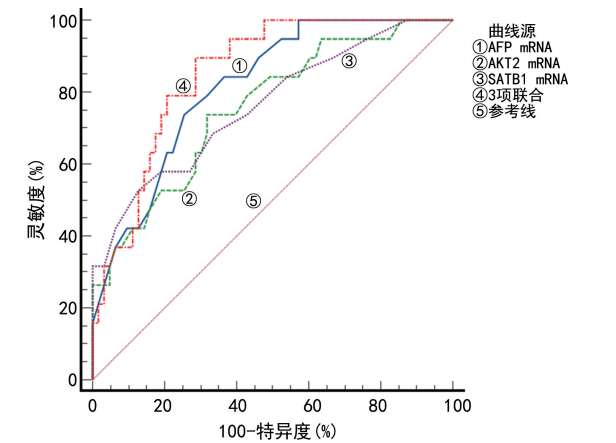


图 1 癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 预测复发的 ROC 曲线

3 讨 论

转移是恶性肿瘤最基本的生物学特征,多数原发性肝癌患者行根治性切除术后仍死于肿瘤复发、转移^[9]。复发、转移已成为影响原发性肝癌患者远期疗效和生存期的瓶颈问题。现在的研究热点为探讨与原发性肝癌复发、转移相关的分子标志物,明确原发性肝癌复发、转移的分子机制,以服务于肿瘤的靶向治疗。

AFP 是一种糖原蛋白,AFP 基因位于第 4 号染色体上,其在健康成人肝细胞中仅微量表达,在肝癌细胞中高表达^[10]。研究报道,AFP 诊断原发性肝癌的假阳性率仅为 2%,是目前较有价值的早期诊断指标^[11]。本研究结果显示,癌组织 AFP mRNA 表达水平高于癌旁组织,且与 TNM 分期、病理分级有关 ($P<0.05$),提示 AFP mRNA 高表达与原发性肝癌

发生及生物学行为有关,但 APF 的生物学活性是否与疾病转归有关尚需继续探讨。多因素 Logistic 回归分析显示,癌组织 AFP mRNA 高表达为术后复发的相关影响因素($P<0.05$)。分析可能原因:AFP 对肝癌细胞生长有促进作用,其机制在于,通过细胞膜上 AFP 受体,影响淋巴细胞或肝癌细胞的肿瘤坏死因子家族及受体表达,导致癌细胞逃避机体免疫监视,并可促进癌基因表达^[12]。此外,AFP 在肝癌组织中的表达呈癌巢分布的趋势,癌旁组织的部分细胞也可见 AFP 表达,提示这些细胞可能是癌前细胞,但尚缺乏恶性转化表型^[13]。结合上述研究得出,AFP 可能与肝细胞恶性转化有关,参与肝癌进展及术后复发、转移。

AKT 是信号转导途径中重要的蛋白激酶,其为磷脂酰肌醇-3-羟基激酶(PI3K)下游的靶蛋白,是 PI3K/AKT 信号转导通路的核心^[13]。AKT2 是 AKT 重要亚型之一,介导体内 PI3K 依赖的细胞黏附、侵袭和转移效应^[14]。在肝癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌中均可检测到 AKT2 基因扩增与过表达,因此,AKT2 被定义为癌基因^[15]。本研究结果显示,原发性肝癌患者癌组织 AKT2 mRNA 异常高表达,且可反映原发性肝癌的生物学特性,与既往研究^[16]结果一致。进一步分析发现,癌组织 AKT2 mRNA 高表达为原发性肝癌术后复发的影响因素($P<0.05$)。相关机制可能如下:(1)AKT2 通过上调金属基质蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、 β 1-整合素表达而促进肿瘤细胞侵袭和转移^[17];(3)AKT2 可抑制肿瘤细胞凋亡,使 BCL-2 相关凋亡促进基因(Bad)、叉头状转录因子 O1

等凋亡相关分子活化或失活,引起前凋亡基因转录水平降低,并抑制细胞凋亡,导致肿瘤细胞凋亡机制障碍^[18]。

SATB1 是一种核基质结合区结合蛋白质,对胸腺细胞发育和 T 细胞成熟起重要作用,是调节免疫系统的关键物质^[19]。有研究发现,SATB1 能调节癌基因 c-myc 转录及 BCL-2 的转录活性,参与细胞凋亡调控^[20]。因此,探讨 SATB1 在肿瘤发生、发展过程中的作用成为研究热点。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 SATB1 在原发性肝癌组织中的表达情况,结果显示,SATB1 mRNA 在癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织,且与肿瘤分化程度、TNM 分期有关($P < 0.05$),提示 SATB1 可能参与了原发性肝癌的发生、发展过程。有研究显示,采用 RNA 干扰技术敲除 SATB1 基因可对肝癌细胞增殖及远处转移起到抑制作用^[21],也证明了 SATB1 在肝癌细胞转移和侵袭中发挥了重要作用。本研究还发现,癌组织 SATB1 mRNA 高表达为原发性肝癌患者术后复发的影响因素($P < 0.05$),分析其原因可能与 SATB1 能上调许多转移相关基因表达有关,如钙结合蛋白(CBP)基因、血管内皮生长因子(VEGF)基因^[22]。有研究报道,CBP、VEGF 基因表达水平与肿瘤复发、转移呈正相关^[23-25]。目前,SATB1 对癌细胞生长、侵袭及转移具体调控的基因和分子机制尚不清楚,有待于进一步研究。另外,本研究进行癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 联合检测预测原发性肝癌术后复发的 ROC 曲线分析,发现联合预测的 AUC 达 0.853,高于各指标单独预测。因此,临床可同时检测上述基因表达,为预测术后复发提供更有效的量化参考依据。

综上所述,原发性肝癌患者癌组织 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 表达水平与 TNM 分期、病理分级及术后复发有关,三者联合检测可有效预测原发性肝癌术后复发风险,为预防术后复发提供指导。但 AFP mRNA、AKT2 mRNA、SATB1 mRNA 具体调控癌细胞生长、侵袭及转移的分子机制尚不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] ZIEMLEWICZ T J, WELLS S A, LUBNER M G, et al. Hepatic tumor ablation[J]. Surg Clin North Am, 2016, 96(2): 315-339.
- [2] 张爽,王锋,孟庆玲,等.原发性肝癌患者流行病学与乙型肝炎病毒感染调查[J].中国疫苗和免疫,2018,24(2): 133-136.
- [3] CHI Y, GONG Z, XIN H, et al. Long noncoding RNA lncARSR promotes nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma by promoting YAP1 and activating the IRS2/AKT pathway[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 126.
- [4] 王双佳,李秀东,苏旭,等.原发性肝癌患者术后肝外转移复发分析[J].中华肝胆外科杂志,2018,24(5): 341-343.
- [5] 杨大鹏,宦洪波,张亮,等.去甲肾上腺素通过 PI3K/Akt 信号通路上调 Sox4 表达促进肝癌细胞增殖[J].第三军医大学学报,2017,39(9): 821-826.
- [6] 李彦,潘烽平,彭勃,等.核基质结合区结合蛋白质 1 介导 Snail/Slug 信号通路调控上皮-间充质转化评估直肠癌分子切缘的研究[J].中华实验外科杂志,2020,37(7): 1354.
- [7] FU J, LI Y, LI Z, et al. Clinical utility of decarboxylation prothrombin combined with alpha-fetoprotein for diagnosing primary hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2018, 38(5): BSR20180044.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)[J].中华消化外科杂志,2017,16(7): 635-647.
- [9] 温瑜鹏,刘彦君.超声造影对原发性肝癌术后复发转移的诊断价值[J].肝脏,2018,23(4): 321-322.
- [10] LIANG J, WANG J, ZHANG L, et al. Conductometric immunoassay of alpha-fetoprotein in sera of liver cancer patients using bienzyme-functionalized nanometer-sized silica beads[J]. Analyst, 2018, 144(1): 265-273.
- [11] 张瑜,陈琨.血小板 4 项参数联合血清 AFP 水平检测对乙型肝炎肝硬化肝癌的诊断价值研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(23): 2921-2924.
- [12] 苏纯洁,何前进,毛伟明,等.沉默 AFP 表达对肝癌细胞侵袭转移的影响及机制[J].山东医药,2019,59(4): 44-47.
- [13] 王希君,沈容芳,王想,等.甲胎蛋白高表达和低表达肝细胞肝癌的基因表达谱差异分析[J].中华肿瘤杂志,2020,42(5): 396-402.
- [14] 陈斌,李博飞,胡志强. Gli1 与 p-AKT 在肝癌组织中的表达及其与肝癌侵袭转移的关系[J].中华普通外科杂志,2019,34(6): 540-541.
- [15] 黄长山,余伟,王谦,等.过表达 miR-29c 靶向抑制 AKT2 增强肝癌 HepG2 细胞放射敏感性的实验研究[J].中华放射医学与防护杂志,2019,39(3): 185-191.
- [16] 黄瑾,刘景雪,曾颖,等.胰腺癌细胞中 TRPV1 受体参与 EGFR 介导的细胞功能研究[J].药学实践杂志,2018,36(2): 126-130.
- [17] 曹煜娜,孙达权,夏庆,等. PI3 K/Akt 通路在肝癌细胞迁移和侵袭中的作用[J].山东医药,2018,58(26): 14-17.
- [18] 黄丹红,吴建兵,简捷,等. TPX2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控肝癌细胞增殖及凋亡[J].肿瘤,2019,39(11): 897-907.
- [19] 郭春华,张雅雅,刘蕾,等. AKT 通过 C-myc 通路调控肝癌 HepG2 细胞中 PTEN 蛋白的表达[J].肿瘤,2020,40(2): 102-112.
- [20] 王明月,黄波,王思望,等.特异性核基质结合区结合蛋白 1 在肺腺癌组织中的表达及其对肺腺癌细胞增殖、凋亡的影响[J].中华实验外科杂志,2019,36(3): 488-491.
- [21] MA J, WU K, ZHAO Z, et al. Special AT-rich sequence binding protein 1 promotes tumor growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317694537. (下转第 2282 页)

• 论 著 •

不可逆电穿孔消融治疗不可切除性胰腺癌对心肌酶的影响*

黄生权¹, 曾健滢^{1,2}, 胡欢欢¹, 吴文烈¹, 陈银珍¹, 牛立志^{1,2}

1. 广州复大肿瘤医院检验科, 广东广州 510665; 2. 广州市复大肿瘤研究所, 广东广州 510315

摘要:目的 通过观察接受不可逆电穿孔(IRE)消融治疗的不可切除性胰腺癌患者心肌酶水平变化,为 IRE 消融治疗胰腺癌的术前评估及术后安全性判断提供一定的临床参考。方法 回顾性分析 2016 年 10 月至 2021 年 10 月广州复大肿瘤医院收治的 50 例不可切除性胰腺癌患者,分为原位消融组(胰腺癌合并/不合并肝转移瘤,采用 IRE 原位消融胰腺癌,23 例)与合并消融组(胰腺癌合并肝转移瘤,进行 IRE 消融,27 例)。比较 IRE 消融术前、术后心肌酶水平的变化,并比较原位消融组与合并消融组患者术后心肌酶水平。结果 与术前相比,两组术后当天心肌酶水平均显著升高($P<0.001$),且两组相比, α -羟丁酸脱氢酶、乳酸脱氢酶及天门冬氨酸氨基转移酶差异有统计学意义($P<0.05$),术后 3 d 两组心肌酶水平呈现下降趋势。结论 IRE 消融治疗的胰腺癌患者心肌酶水平呈一过性升高,IRE 消融安全性较好。

关键词:不可逆电穿孔; 消融; 胰腺癌; 心肌酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.021

中图法分类号:R446.11

文章编号:1673-4130(2022)18-2279-04

文献标志码:A

Effect of irreversible electroporation ablation on myocardial enzymes in patients with unresectable pancreatic cancer*

HUANG Shengquan¹, ZENG Jianying^{1,2}, HU Huanhuan¹, WU Wenlie¹, CHEN Yinzen¹, NIU Lizhi^{1,2}

1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Fuda Tumor Hospital, Guangzhou, Guangdong 510665, China; 2. Guangzhou Fuda Tumor Research Institute, Guangzhou, Guangdong 510315, China

Abstract: Objective To observe the changes of myocardial enzyme levels in the patients with unresectable pancreatic cancer treated by irreversible electroporation (IRE) ablation so as to provide some clinical reference for the preoperative evaluation and postoperative safety of IRE in the treatment of pancreatic cancer. **Methods** Fifty patients with unresectable pancreatic cancer in the Guangzhou Fuda Tumor Hospital from October 2016 to October 2021 were retrospectively analyzed, and divided into the ablation in situ group (pancreatic cancer with or without liver metastasis tumor, adopting IRE ablation in situ for pancreatic tumors, 23 cases) and the combined ablation group (pancreatic cancer complicating liver metastasis tumor, conducting IRE ablation, 27 cases). The change of myocardial enzyme levels were compared between before and after IRE ablation and the postoperative myocardial enzyme levels were compared between the in situ ablation group and the combined ablation group. **Results** Compared with before operation, the levels of myocardial enzymes on the operation day in both groups were increased significantly ($P<0.001$), moreover in the comparison between the two groups, the differences in α -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), lactate dehydrogenase (LDH) and asparagine aminotransferase (AST) had statistical significance ($P<0.05$). The myocardial enzyme levels in the two groups showed a downward trend on postoperative 3 d. **Conclusion** In the patients with pancreatic cancer treated by IRE ablation, the myocardial enzyme levels show the transient increase, and IRE ablation has good safety.

Key words: irreversible electroporation; ablation; pancreatic cancer; myocardial enzyme

胰腺癌是消化道恶性肿瘤,具有隐匿性强、预后差和病死率高的特点。大部分患者因全身状况差及

合并其他系统性疾病无法手术,仅 15%~20% 的患者可接受手术治疗。胰腺癌术后行辅助治疗者中位生

* 基金项目:广州复大肿瘤医院国际科学基金项目(Y2021-MS-06)。

作者简介:黄生权,男,主管技师,主要从事临床检验诊断研究。

存期为 12~22 个月,5 年生存率为 20%~25%^[1]。纳米刀又称不可逆电穿孔(IRE),是一项近年来兴起、不依赖热量形式的肿瘤消融技术。该技术利用微创电极传递毫秒级高压电脉冲并形成高场强消融区,使细胞膜产生不可逆纳米级孔道,造成细胞内外环境失衡,最终导致细胞凋亡^[2-5]。由于 IRE 对细胞外基质影响较小,可应用于邻近有重要血管或神经的肿瘤消融。近年来,IRE 已逐步应用于胰腺癌及肝肿瘤的治疗并获得认可^[6-10]。IRE 能量可触发心肌细胞过早动作电位,并导致心律失常,尤其是心室颤动^[11],因此,IRE 治疗术中采用心电图同步技术,在心动周期绝对不应期应用电脉冲,但亚临床心肌损伤和非致命性心律失常仍有发生^[12-13]。本文通过观察胰腺癌或胰腺癌合并肝转移瘤患者 IRE 消融治疗前后心肌酶的改变,以求为 IRE 消融治疗胰腺癌的术前评估及术后安全性判断提供相关临床参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 10 月至 2021 年 10 月于广州复大肿瘤医院进行原位或合并肝转移 IRE 消融治疗的 50 例不可切除性胰腺癌患者,分为原位消融组(胰腺癌合并/不合并肝转移瘤,采用 IRE 原位消融胰腺癌,23 例)与合并消融组(胰腺癌合并肝转移瘤,进行 IRE 消融,27 例)。入组标准:(1)术前经组织学或细胞学检查确诊为胰腺导管腺癌;(2)肿瘤无法进行外科手术切除;(3)体力状况(PS)评分≤2 分;(4)肝转移瘤≤5 个,且经组织学或细胞学检查来源于胰腺癌;(5)术前评估生存期在 3 个月以上。排除标准:(1)1 周内服用过抗凝药物或凝血功能异常者;(2)对比剂过敏或因其他原因无法进行 CT 及 MRI 增强扫描者;(3)术前评估为不能完全消融者;(4)严重心、肺、肾功能不全或不能耐受气管插管全身麻醉者;(5)严重心律失常、癫痫病史或心脏起搏器植入者以及近期发生大面积心肌梗死的患者;(6)急性感染或慢性感染急性期者;(7)妊娠、精神异常或有精神病史且不能自主配合者。本研究获医院医学伦理委员会审查批准(伦理批号:FD-IRB-SL-KY-20211129)。两组的年龄、性别、PS 评分、肿瘤最大径及肿瘤位置等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

1.2 仪器与试剂 7100 自动生化分析仪(日立 HITACHI 公司),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)检测试剂盒(宁波美康生物科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 IRE 消融方法 采用 HVP01 纳米刀治疗系统(美国 Angio Dynamics 公司)经皮消融。术前制订治疗计划,电极有效暴露距离为 1.5~2.0 cm。通过 CT 联合超声定位,使电极探针经皮插入肿瘤,设置 IRE 发生器参数,每组释放电脉冲 10 次,脉冲宽度 70~90 μ s,放电组数 7~9 个。总脉冲次数为 70~90 次,电场强度为 1 200~1 500 V/cm,每次消融时长 1~2 min。通过实时的电阻或电流变化,结合术中超声及 CT 确认消融成功。术后持续镇静,呼吸机辅助通气 2 h。患者留置胃管,转重症监护室接受心电图监护过夜。监测体征平稳后转入普通病房,给予抑制胰液分泌、抗感染、护胃、脱水消肿药物及静脉营养支持治疗。

表 1 一般资料在两组间比较[n(%)或 $\bar{x}\pm s$ 或 $M(P_{25},P_{75})$]				
一般资料	原位消融组 ($n=23$)	合并消融组 ($n=27$)	$\chi^2/t/Z$	P
性别			0.253	0.614
男	12(52.17)	16(59.26)		
女	11(47.83)	11(40.74)		
年龄(岁)	63.74 $\pm$ 11.12	59.04 $\pm$ 10.75	1.370	0.177
术前 PS 评分(分)	1.0(1.0,1.0)	1.0(1.0,1.0)	-0.482	0.632
肿瘤最大径(cm)	4.0(3.2,5.4)	4.7(3.5,6.7)	-1.489	0.143
肿瘤分期			2.446	0.117
Ⅲ期	2(8.70)	0(0.00)		
Ⅳ期	21(91.30)	27(100.00)		
肿瘤位置			2.334	0.311
胰头	10(43.48)	11(40.74)		
胰颈、胰体	4(17.39)	2(7.40)		
胰尾	7(30.43)	14(51.85)		
术前病史				
高血压	4(17.39)	8(29.63)	1.020	0.312
糖尿病	6(26.09)	7(25.92)	<0.001	0.989

1.3.2 心肌酶检测方法 入组患者血标本收集时间点为术前、术后当天、术后 3 d,采用日立 HITACHI 7100 自动生化分析仪检测 AST(参考范围为 13~35 U/L)、LDH(参考范围为 120~250 IU/L)、CK(参考范围为 40~200 IU/L)、CK-MB(参考范围为 0~24 IU/L)、HBDH(参考范围为 72~182 IU/L)水平。

1.4 统计学处理 所有数据结果应用 GraphPad Prism 5.0 软件(San Diego,CA,USA)进行统计分析并作图。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对资料间比较配对 t 检验,非配对资料间比较用独立样本 t 检验。偏态分布的计量资料以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。计数资料以例数

或率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 手术前后心肌酶改变 与术前相比,两组患者术后当天心肌酶(CK-MB、CK、HBDH、LDH、AST)水平均显著升高(原位消融组: $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P=0.003\ 3$ 、 $P=0.001\ 1$ 、 $P=0.003\ 3$;合并消融组: $P=0.000\ 4$ 、 $P=0.000\ 1$ 、 $P=0.000\ 1$ 、 $P=0.000\ 2$ 、 $P<0.001$)。术后 3 d 时,原位消融组 CK 水平与术前比较,差异有统计学意义($P=0.042\ 4$),其余心肌酶水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。术后 3 d 时,合并消融组 CK、HBDH、LDH、AST 水平与术

前比较,差异有统计学意义($P=0.001\ 1$ 、 $P=0.012\ 0$ 、 $P=0.037\ 7$ 、 $P=0.017\ 9$),CK-MB 水平与术前比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 两组手术前后心肌酶水平比较 两组患者接受 IRE 消融术前外周血心肌酶水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。术后当天,两组心肌酶(HBDH、LDH 及 AST)水平比较,差异有统计学意义($P=0.011\ 4$ 、 $P=0.005\ 5$ 、 $P<0.001$),CK-MB、CK 水平比较差异无统计学意义($P=0.056\ 4$ 、 $P=0.179\ 2$)。术后 3 d,两组 LDH 差异有统计学意义($P=0.030\ 7$),CK-MB、CK、HBDH、AST 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 IRE 消融术前、术后心肌酶水平 [$M(P_{25},P_{75})$]

组别	<i>n</i>	时间	CK-MB(IU/L)	CK(IU/L)	HBDH(IU/L)	LDH(IU/L)	AST(U/L)
原位消融组	23	术前	14(12,21)	53(40,89)	141(126,179)	165(148,228)	24(17,44)
		术后当天	30(22,46) ^a	110(46,206) ^a	184(157,210) ^a	217(196,276) ^a	33(26,69) ^a
		术后 3 d	16(14,25)	88(54,149) ^a	152(132,182)	180(142,203)	34(27,54)
合并消融组	27	术前	17(10,28)	51(33,71)	157(123,196)	200(160,252)	35(23,55)
		术后当天	39(28,55) ^a	149(77,417) ^a	232(172,476) ^{ab}	382(215,892) ^{ab}	119(63,358) ^{ab}
		术后 3 d	20(14,35)	105(52,142) ^a	182(145,269) ^a	242(154,360) ^{ab}	58(28,125) ^a

注:与本组术前相比,^a $P<0.05$;与同时间段原位消融组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

心肌酶是一种具有促进心肌细胞代谢和调节心肌细胞电生理活动的酶类物质,一旦机体心肌细胞出现异常,这些酶类物质就会进入血液导致其在血液中的水平升高。心肌酶是诊断心肌损伤的传统实验室检查指标,心肌酶水平动态升高被认为是急性心肌损伤的标志^[14-15],可以在一定程度上反映心肌损伤的情况。其中,CK-MB 主要存在于心肌组织中,对心肌损伤的诊断特异性较高^[16],是用于评估消融术后心肌损伤程度的重要参数^[17-19]。现有多个临床研究证明,实体瘤的 IRE 消融治疗可引起与心脏相关的不良反应^[13,20]和心肌损伤标志物水平升高^[12]。因此,本研究在胰腺癌患者实施 IRE 消融手术之前,常规检查患者心肌酶以确保患者符合手术适应证,在 IRE 消融术后复查心肌酶来判断手术对胰腺癌患者心肌造成损伤的程度及预后。

本研究表明,与手术前比较,两组心肌酶水平在术后当天均显著升高($P<0.05$),且合并消融组心肌酶 HBDH、LDH、AST 水平较原位消融组升高更明显($P<0.05$),这表明 IRE 消融治疗胰腺癌可能会造成急性心肌损伤,且对胰腺癌消融的同时,对肝转移瘤进行合并消融时会使心肌损伤更重。主要原因可能与消融脏器、消融范围及消融次数有关。值得指出的

是,在 IRE 消融术中,为保证 100%肿瘤消融率,降低局部复发率,需确保有效的高场强消融区范围,即消融区范围覆盖肿瘤,而此时可能损伤正常胰腺组织,导致各种胰酶从被破坏的胰腺组织中释放并直接损伤心肌^[21],这可能是心肌组织受损的协同作用机制。其次,在 IRE 消融治疗术后 3 d,合并消融组 LDH 水平仍明显高于原位消融组($P<0.05$),可能与该组对多个肝转移瘤进行消融导致大量 LDH 释放入血有关。然而,所有患者术后当天心肌酶水平呈一过性升高,3 d 后明显下降,考虑 IRE 消融对心肌组织形态学影响轻微,短时间内可完成代偿性修复,安全性较好。苏东朝等^[22]报道的 12 例 IRE 联合化疗治疗局部进展期胰腺癌患者术后心肌酶水平呈一过性升高,与本研究结果大致一致。

综上所述,IRE 消融治疗不可切除性胰腺癌未见严重心肌损伤,安全性较好,但其影响机制仍需通过进一步研究证实。

参考文献

[1] CHHODA A, LU L, CLERKIN B M, et al. Current approaches to pancreatic cancer screening[J]. Am J Pathol, 2019, 189(1): 22-35.

[2] BOWER M, SHERWOOD L, LI Y, et al. Irreversible electroporation of the pancreas: definitive local therapy

without systemic effects[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(1): 22-28.

[3] NEAL R E, GARCIA P A, ROBERTSON J L, et al. Experimental characterization of intrapulse tissue conductivity changes for electroporation[J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011, 2011: 5581-5584.

[4] THOMSON K R, KAVNOUDIAS H, NEAL R E. Introduction to irreversible electroporation: principles and techniques[J]. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2015, 18(3): 128-134.

[5] 中国医药教育协会介入微创治疗专业委员会. 影像学引导胰腺癌不可逆电穿孔消融治疗专家共识 2018 版[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(39): 3148-3152.

[6] RAI Z L, FEAKINS R, PALLETT L J, et al. Irreversible electroporation (IRE) in locally advanced pancreatic cancer: a review of current clinical outcomes, mechanism of action and opportunities for synergistic therapy[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(8): 1609.

[7] GHIDINI M, PETRILLO A, SALATI M, et al. Surgery or locoregional approaches for hepatic oligometastatic pancreatic cancer: myth, hope, or reality[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8): 1095.

[8] HONG Y, RICE J, SHARMA D, et al. The use of IRE in multi-modality treatment for oligometastatic pancreatic cancer[J]. *Am J Surg*, 2018, 216(1): 106-110.

[9] KLUGER M D, EPELBOYM I, SCHROPE B A, et al. Single-institution experience with irreversible electroporation for t4 pancreatic cancer: first 50 patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(5): 1736-1743.

[10] CINDRIC H, MARIAPPAN P, BEYER L, et al. Retrospective study for validation and improvement of numerical treatment planning of irreversible electroporation ablation for treatment of liver tumors[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2021, 68(12): 3513-3524.

[11] DEODHAR A, DICKFELD T, SINGLE G W, et al. Irreversible electroporation near the heart: ventricular arrhythmias can be prevented with ECG synchronization[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2011, 196(3): W330-W335.

[12] KOSTRZEWA M, TUELUEMEN E, RUDIC B, et al. Cardiac impact of R-wave triggered irreversible electroporation therapy[J]. *Heart Rhythm*, 2018, 15(12): 1872-1879.

[13] KAMBAKAMBA P, BONVINI J M, GLENCK M, et al. Intraoperative adverse events during irreversible electroporation—a call for caution[J]. *Am J Surg*, 2016, 212(4): 715-721.

[14] 谷红梅, 吕燕青, 李淑群, 等. 阿奇霉素联合特布他林、脂溶性维生素治疗肺炎支原体感染合并心肌损害患儿的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(11): 1350-1355.

[15] 王艳, 张华, 关丽, 等. 支气管哮喘患儿血清心肌酶及免疫功能水平检测及临床价值分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(3): 316-318.

[16] 张建立, 杨亚志. 腹腔镜与开腹胆囊切除术对患者心肌酶谱的影响[J]. *肝胆外科杂志*, 2018, 26(5): 384-386.

[17] YU H, LI Q, CHEN C, et al. Effect of intralipid on myocardial injury during valve replacement surgery with concomitant radiofrequency ablation: a randomized controlled trial[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(1): e9603.

[18] BUDZIANOWSKI J, HICZKIEWICZ J, BURCHARDT P, et al. Predictors of atrial fibrillation early recurrence following cryoballoon ablation of pulmonary veins using statistical assessment and machine learning algorithms[J]. *Heart Vessels*, 2019, 34(2): 352-359.

[19] ZENG Q, LI X, XU G. Evaluation of myocardial injury induced by different ablation approaches (radiofrequency ablation versus cryoablation) in atrial flutter patients: a Meta-analysis[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20182251.

[20] 郭凯, 李晓勇, 陈艳军, 等. 不可逆电穿孔联合胆道复合支架植入治疗不可切除肝门部胆管癌[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2019, 25(8): 570-574.

[21] 和成华, 马琪, 孙扬. 实验性急性胰腺炎对心肌影响的动态观察[J]. *新疆医科大学学报*, 2007, 30(10): 1108-1110.

[22] 苏东朝, 李晓勇, 陈艳军, 等. 实时多影像融合介入导航系统引导下纳米刀消融治疗局部进展期胰腺癌的效果与安全性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(6): 1392-1395.

(收稿日期: 2021-12-23 修回日期: 2022-04-21)

(上接第 2278 页)

[22] 曲杰, 叶丽虹, 杨宗伟. SATB1 在原发性肝癌中表达并促进生长和转移的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(7): 606-609.

[23] 于瑞莲, 谢可. SATB1、survivin 和 VEGF 在卵巢上皮癌中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2016, 36(7): 796-803.

[24] 李晓雷, 徐俊, 胡欣, 等. SATB1 基因沉默抑制食管鳞状细胞癌 TE-1 中肿瘤干细胞样细胞侵袭及迁移能力[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(17): 2674-2679.

[25] 孙国钢, 宋新江. 转化生长因子-β1、缺氧诱导因子-1α、血管内皮生长因子、癌胚抗原、糖类抗原 199 在结直肠癌根治术后复发转移中的预测价值[J]. *中国医师杂志*, 2020, 22(12): 1888-1892.

(收稿日期: 2021-12-19 修回日期: 2022-04-28)

· 论 著 ·

尿液外泌体 miR-494-3p 在急性肾损伤患者中的表达水平及诊断价值

魏 萍,王艳侠,尹 娣,石书梅[△]

中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院肾内科肾病实验中心,山东济南 250031

摘 要:目的 探讨急性肾损伤(AKI)患者尿液外泌体 miR-494-3p 的表达水平,并分析其作为生物标志物的临床应用价值。方法 收集 2019 年 1 月至 2021 年 12 月该院 131 例新诊断未经治疗的 AKI 患者和 96 例健康对照者。提取尿液外泌体,随机将其纳入训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)和验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)。提取 RNA,通过实时荧光定量聚合酶链反应检测尿液外泌体中 miR-494-3p 的相对表达水平,分析其在 AKI 患者和健康对照者中的差异,绘制受试者工作特征(ROC)曲线,并计算曲线下面积(AUC)。结果 训练集 miR-494-3p 在 AKI 患者和健康对照者尿液中呈差异表达($P<0.05$)。训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.740(95%CI:0.640~0.824),灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。相对于健康对照者,尿液外泌体 miR-494-3p 在验证集 AKI 患者中同样也呈高表达($P<0.05$),验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.761(95%CI:0.679~0.831),灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平与患者年龄、性别及疾病分期无关($P>0.05$)。结论 尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中呈高表达,对 AKI 具有一定的临床诊断价值。

关键词:尿液外泌体; 急性肾损伤; miR-494-3p; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.022

中图法分类号:R692.5

文章编号:1673-4130(2022)18-2283-05

文献标志码:A

Expression level and diagnostic value of urine exosome miR-494-3p in patients with acute kidney injury

WEI Ping, WANG Yanxia, YIN Di, SHI Shumei[△]

Experimental Center of Nephrology, 960 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Jinan, Shandong 250031, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of urine exosome miR-494-3p in the patients with acute kidney injury, and to analyze its clinical application value as a biomarker. **Methods** A total of 131 patients with newly diagnosed and untreated acute kidney injury (AKI) and 96 healthy controls in this hospital from January 2019 to December 2021 were collected. Urine exosome was extracted and randomly included into the training set (48 cases of AKI patients and 48 cases of healthy controls) and validation set (83 cases of AKI patients and 48 cases of healthy controls). RNA was extracted, and the relative expression level of miR-494-3p in urine exosome was detected by qRT-PCR. The difference of AKI was analyzed between the AKI patients and healthy controls. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn and the area under the curve (AUC) was calculated. **Results** miR-494-3p in the train set was differentially expressed in urine between the AKI patients and healthy controls ($P<0.05$). AUC of urine exosome miR-494-3p in the train set for diagnosing AKI was 0.740 (95%CI:0.640-0.824), the sensitivity was 68.75% and the specificity was 75.00%. Related to the healthy controls, urine exosome miR-494-3p in the validation set was also highly expressed in the patients with AKI ($P<0.05$), AUC of urine exosome miR-494-3p for diagnosing AKI in the validation set was 0.761 (95%CI:0.679-0.831), the sensitivity was 72.29%, and the specificity was 70.83%. The relative expression level of miR-494-3p in urine exosome had no relation with the age, sex and disease stage of the patients ($P>0.05$). **Conclusion** Urine exosome miR-494-3p is highly expressed in the patients with AKI, and has a certain clinical diagnostic value for AKI.

Key words: urine exosome; acute kidney injury; miR-494-3p; biomarkers

急性肾损伤(AKI)是指由各种原因引起肾小球滤过率在短期内急剧下降的临床综合征^[1]。AKI 是

一种具有极高病死率的常见危急重症,且缺乏有效的治疗手段,该病已成为全球主要的公共卫生问题^[2]。目前,临床开展的检测方法无法可靠地预测 AKI 的发生风险和严重程度。因此,积极寻找新的高灵敏度和高特异度的早期诊断 AKI 的生物标志物,早期发现 AKI 并采取有效的干预手段是当务之急。外泌体是一类直径为 30~150 nm、脂质双分子层包裹的细胞外囊泡,存在于血清、尿液、唾液、胸腔积液等多种体液中^[3]。微小核糖核酸(miRNA)是一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性非编码 RNA^[4]。外泌体被受体细胞摄取后,其内部的 miRNA 等遗传物质也被携带至受体细胞内,从而使受体细胞内的分子组成发生改变,并通过基因调控和信号传导通路等影响受体细胞发挥功能,参与调控包括 AKI 在内的多种疾病^[5-6]。miR-494-3p 被证明以激活转录因子 3(ATF3)的 3'-非翻译区(UTR)为靶点,ATF3 是一种已被证明可减轻肾脏缺血/再灌注损伤的蛋白质^[7]。这种特异性结合抑制了 ATF3 的转录,从而促进缺血/再灌注的炎症发生^[8]。上述研究中,miR-494-3p 的过表达显著降低了肾脏缺血/再灌注损伤后 ATF3 的表达,诱导炎症介质过表达,导致肌酐水平显著升高^[7]。但 miR-494-3p 在 AKI 患者尿液外泌体中的表达却缺乏相关报道。本文主要分析尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中的相对表达情况,旨在进一步了解尿液外泌体 miR-494-3p 对 AKI 的临床诊断价值,为 AKI 的早期诊断提供新的检测途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月至 2021 年 12 月在中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院住院的 AKI 患者 131 例作为 AKI 组,其中男 71 例,女 60 例。AKI 诊断标准主要有以下 3 项:(1)在 48 h 内,患者血肌酐升高超过 0.3 mg/dL 或 26.5 μmol/L;(2)患者血肌酐升高值大于基础值的 1.5 倍,并且发生在 7 d 内;(3)患者的尿量小于 0.5 mL/(kg·h),持续超过 6 h。上述 3 项中满足 1 项即可诊断为 AKI^[9]。健康对照组 96 例,其中男 50 例,女 46 例。AKI 患者纳入标准:未经过透析或者药物等手段的干预。健康对照组纳入标准:根据生化检查等排除泌尿系统、消化系统重大疾病。本研究已获得医院伦理委员会批准同意[伦理号:(2022)科研伦理审第(34)号]。随机将研究对象纳入训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)和验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)。训练集和验证集分别是两组独立的样本,训练集用于筛选候选分子,验证集用于将训练集中筛选出的分子纳入另一组独立样本进一步验证得出的结论。训练集和验证集所有研究对象的性别、年龄差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。根据改善全球肾脏

病预后组织(KDIGO)^[9]AKI 临床实践指南中的 AKI 分期标准进行分期:血肌酐 48 h 内升高超过 26.5 μmol/L,或在 7 d 内升高≥基础值的 1.5 倍而小于 2.0 倍为 AKI 1 期;升高达基础值的 2.0~3.0 倍为 AKI 2 期;升高达基础值 3.0 倍以上,或血肌酐>353.6 μmol/L,或开始行肾脏替代治疗为 AKI 3 期。

表 1 训练集和验证集中 AKI 患者和健康对照者的临床特征(<i>n</i>)				
项目	训练集(<i>n</i> =96)	验证集(<i>n</i> =131)	χ^2	<i>P</i>
健康对照者	48	48		
年龄(岁)			0.042	0.838
≤48	24	25		
>48	24	23		
性别			0.668	0.414
男	23	27		
女	25	21		
AKI 患者	48	83		
年龄(岁)			1.044	0.307
≤48	27	39		
>48	21	44		
性别			<0.001	0.996
男	26	45		
女	22	38		
AKI 分期			0.334	0.846
1 期	12	21		
2 期	26	48		
3 期	10	14		

1.2 主要仪器与试剂 CFX-96 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪、Nanodrop2000 分光光度计、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪、纳米颗粒跟踪分析仪、透射电子显微镜。尿液外泌体提取试剂盒(加拿大,Norgen Biotek)、总 RNA 提取试剂盒(德国,QIAGEN)、反转录试剂盒(大连,TAKARA)、qRT-PCR 试剂(大连,TAKARA)、miR-494-3p 和 miR-16-5p 的 PCR 引物(博尚生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 尿液标本收集 尿液采集后均在 2 h 内进行处理,在 4℃于离心机中以 3 500 r/min 离心 5 min,再以 10 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液于无 RNA 酶的离心管中,于-80℃冰箱保存待用。AKI 患者标本采集必须符合以下标准:入院第 2 天,禁食禁水 8 h 以上首次留取的晨尿。健康对照组标本收集标准:禁食禁水 8 h 以上留取的晨尿。

1.3.2 提取、鉴定尿液外泌体 按照尿液外泌体提取试剂盒操作步骤提取尿液外泌体。将获得的外泌体悬液经 2%醋酸双氧铀染色后,置于低分辨率透射

电子显微镜(TEM)下观察外泌体大小、形态。采用纳米颗粒跟踪分析(NTA)技术分析外泌体粒径大小和浓度分布情况。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测外泌体表面标志蛋白,其中所使用的抗体包括兔抗人 CD9 蛋白单克隆抗体(美国, CST)、鼠抗人 TSG101 蛋白单克隆抗体(英国, Abcam)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(美国, CST)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(美国, CST)。

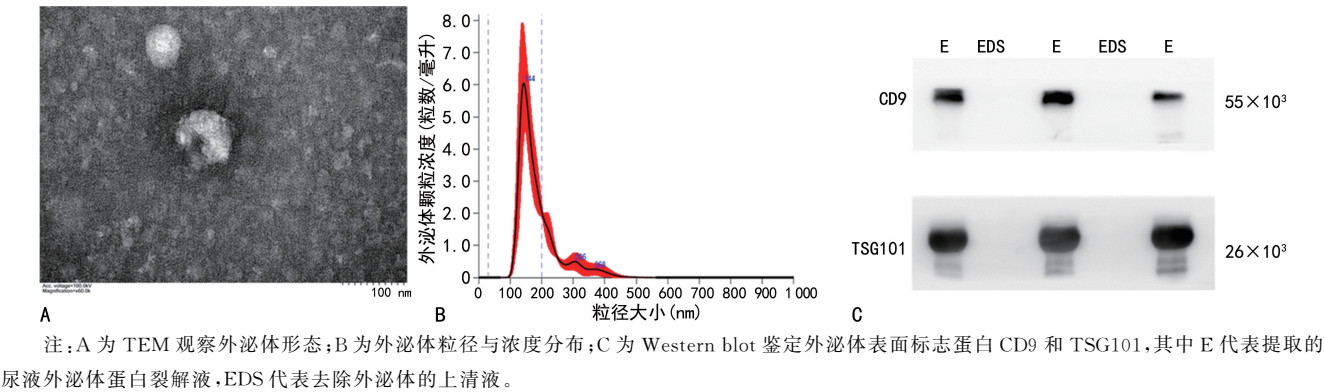
1.3.3 尿液外泌体 miR-494-3p 检测 采用 RNA 提取纯化试剂盒提取总 RNA,操作步骤参照试剂盒说明书。采用紫外可见分光光度计测定 RNA 的 A_{260} 、 A_{280} , A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0 表示提取的 RNA 样本含 DNA 和蛋白质杂质较少。利用反转录试剂盒行 RNA 反转录。用 qRT-PCR 对合成的 cDNA 进行扩增,反应体系为 25.0 μ L,反应试剂: Tli RNaseH Plus 12.5 μ L,PCR 前向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,PCR 反向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L, cDNA 2.0 μ L,去 RNA 酶水 8.5 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,共 45 个循环。实验中 U6 不适合作为外泌体 miRNA 的内参,根据外泌体 miRNA 的有关报道,选定 miR-16-5p 作为检测的内参^[10-11]。其中 hsa-miR-16-5p 引物序列为 5'-CAG-CACGTAAATATTGGCGA-3',目的分子 hsa-miR-494-3p 引物序列为 5'-TGAAACATACACGG-

GAAACCTC-3'。每个样本均重复检测 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算其相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行统计处理和分析。对计量资料进行正态性检验,不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。利用 GraphPad Prism 5 进行作图。受试者工作特征(ROC)曲线和曲线下面积(AUC)均使用 MedCalc 软件绘制、计算。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鉴定尿液外泌体 为确定通过尿液外泌体提取试剂盒得到的沉淀为外泌体,本研究通过 TEM、NTA 技术和 Western blot 对外泌体进行鉴定。TEM 下可观察到直径为 60~150 nm 具有茶托样结构的囊状小泡(图 1A)。NTA 技术分析结果显示,所提取的外泌体悬液颗粒主峰和平均直径均在外泌体粒径范围内(图 1B)。Western blot 结果显示,在提取的尿液外泌体蛋白裂解液中成功鉴定出外泌体表面标志蛋白 CD9、TSG101,而其在去除外泌体的上清液中呈低表达(图 1C)。本研究从尿液中提取的沉淀为具有完整形态的外泌体,这为下一步研究尿液外泌体中的生物标志物提供了基础保证。



注:A为TEM观察外泌体形态;B为外泌体粒径与浓度分布;C为Western blot鉴定外泌体表面标志蛋白CD9和TSG101,其中E代表提取的尿液外泌体蛋白裂解液,EDS代表去除外泌体的上清液。

图1 尿液外泌体特征

2.2 训练集和验证集尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达量 训练集、验证集尿液外泌体 miR-494-3p 在 AKI 患者中的相对表达水平高于健康对照者($P<0.05$)。见表 2。

表 2 miR-494-3p 在训练集和验证集尿液外泌体中的相对表达水平 $[M(P_{25}, P_{75})]$				
项目	健康对照组	AKI 组	Z	P
训练集	1.09(0.50, 1.85)	2.11(1.20, 2.79)	-4.05	<0.001
验证集	1.20(0.59, 2.17)	2.97(1.27, 5.06)	-4.97	<0.001

2.3 训练集尿液外泌体 miR-494-3p 的诊断效能

训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.740(95%CI: 0.640~0.824),灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。见图 2。

2.4 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 的诊断效能 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 AUC 为 0.761(95%CI: 0.679~0.831),灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。见图 3。

2.5 尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达水平与 AKI 患者临床特征的关系 尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平与患者年龄、性别及疾病分期无关($P>0.05$)。见表 3。

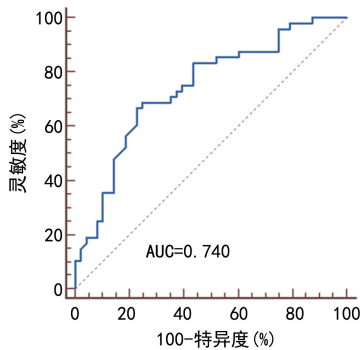


图 2 训练集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 ROC 曲线

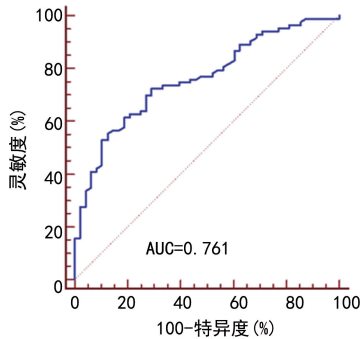


图 3 验证集尿液外泌体 miR-494-3p 诊断 AKI 的 ROC 曲线

表 3 尿液外泌体 miR-494-3p 的相对表达水平与 AKI 患者临床特征的关系[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	<i>n</i>	miR-494-3p	<i>Z</i>	<i>P</i>
年龄(岁)			-1.94	0.093
≤46	66	2.76(1.88,5.09)		
>46	65	2.23(1.16,3.71)		
性别			-0.95	0.726
男	71	2.38(1.27,4.17)		
女	60	2.43(1.26,4.07)		
AKI 分期			1.87	0.068
1 期	33	2.10(1.04,4.65)		
2 期	74	2.38(1.22,3.84)		
3 期	24	3.39(2.22,6.61)		

3 讨 论

尿液外泌体中富含 miRNA,外泌体的脂质双分子结构具有保护 miRNA 免受 RNA 酶降解的作用,从而保持其稳定性^[12]。尿液外泌体是一种极具潜力的生物标志物,它们很容易获得,检测尿液外泌体具有非侵入性和无创等优点。生理状态下,血清中的外泌体无法通过肾小球滤过机制进入尿液^[13],因此尿液外泌体被认为来源于肾脏细胞,而肾脏细胞分泌的外泌体可以通过 miRNA 等遗传物质影响肾脏功能^[14]。因此,尿液外泌体包裹的 miRNA 更能反映肾脏的功能^[15]。

miRNA 在不同类型的 AKI 中发生显著改变^[16]。相关研究表明,miR-24、miR-126、miR-494 和 miR-687 可与其靶基因的 3'-UTR 结合,在 AKI 损伤和修复阶段调控炎症、程序性细胞死亡和细胞周期,表明其在 AKI 中的治疗潜力^[17]。GONG 等^[18]研究发现,AKI 患者 miR-494 表达升高,后者可抑制 ATF3 表达,从而促进炎症反应,导致肾小管细胞的凋亡和坏死。ZHANG 等^[19]研究发现,AKI 患者尿液外泌体中的 miRNA 与转化生长因子-β 信号有关,外泌体 miRNA 可能是控制 AKI 进展的物质。在狼疮性肾炎患者中,尿液外泌体 miR-135b-5p、miR-107 和 miR-31 通过抑制低氧诱导因子 1α 调控系膜细胞的功能^[20]。尿液外泌体 miR-21 水平在慢性肾脏病和不同的足细胞损伤模型中呈显著上升趋势^[21]。以上研究表明尿液外泌体 miRNA 将成为判断肾脏疾病发生、发展和预后潜在的生物标志物。

本研究运用 TEM、NTA 和 Western blot 3 种方法验证利用尿液外泌体提取试剂盒可以成功提取完整的外泌体。随着对外泌体研究不断深入,笔者相信外泌体的分离、富集技术会不断得到优化。本研究重点评估了尿液外泌体 miR-494-3p 作为诊断 AKI 的生物标志物的潜在价值。尿液外泌体 miR-494-3p 在训练集(48 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)中呈差异表达,其诊断 AKI 的 AUC 为 0.740,灵敏度为 68.75%,特异度为 75.00%。在验证集中进一步验证后得出结论:尿液外泌体 miR-494-3p 在验证集(83 例 AKI 患者和 48 例健康对照者)中同样也呈差异表达($P<0.05$),其诊断 AKI 的 AUC 为 0.761,灵敏度为 72.29%,特异度为 70.83%。训练集和验证集得出了同样的结论,表明尿液外泌体 miR-494-3p 对 AKI 具有一定的临床诊断价值。在此基础上,本研究统计、分析了尿液外泌体 miR-494-3p 与 AKI 患者性别、年龄和分期等临床特征的关系,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。这可能与实验方法、样本差异导致不同的结果有关,后期亟待开展大样本、多中心的研究进一步验证上述结论。

目前,肾脏和泌尿系统疾病的诊断是基于不敏感和非特异性的生物标志物。临床上常用的诊断 AKI 的生物标志物有中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、胱抑素 C 及肾脏损伤分子-1 等。后期笔者也会开展尿液外泌体 miR-494-3p 与常用标志物的比较和联合诊断方面的研究。

需要指出的是,虽然尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平在 AKI 患者和健康对照者中呈明显差异,但本研究没有比较该分子在肾脏其他疾病中的表达情况,后续将进一步开展该方面的研究。鉴于本研究中的样本均来自同一医院,样本量相对有限且单

一,后期需要扩大样本,纳入多中心和前瞻性研究进一步验证上述结论。此外还需要通过细胞和动物实验等基础研究来阐明 miR-494-3p 在 AKI 发生、发展中的生物学功能和机制,并通过生物信息学分析其在 AKI 中的可能作用。

综上所述,本研究成功提取并鉴定尿液外泌体。通过 qRT-PCR 检测发现,尿液外泌体 miR-494-3p 相对表达水平在 AKI 患者中较健康对照者显著增加。miR-494-3p 对 AKI 具有较高的诊断价值,是潜在的诊断 AKI 的生物标志物。尿液外泌体 miRNA 可能在 AKI 发病和组织修复过程中发挥双重作用,并可作为新的非侵入性生物标志物,亦可能成为治疗 AKI 的新靶点,为 AKI 诊断和治疗提供新思路和新方法。

参考文献

- [1] MASEWU A, MAKULO J R, LEPIRA F, et al. Acute kidney injury is a powerful independent predictor of mortality in critically ill patients: a multicenter prospective cohort study from kinshasa, the democratic republic of congo[J]. BMC Nephrol, 2016, 17(1): 118.
- [2] BA AQEEL S H, SANCHEZ A, BATLLE D. Angiotensinogen as a biomarker of acute kidney injury[J]. Clin Kidney J, 2017, 10(6): 759-768.
- [3] KOWAL J, TKACH M, THÉRY C. Share biogenesis and secretion of exosomes[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 29: 116-25.
- [4] ALI SYEDA Z, LANGDEN S S S, MUNKHZUL C, et al. Regulatory mechanism of microrna expression in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723.
- [5] WU Y L, LI H F, CHEN H H, et al. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic targets in inflammation- and ischemia-reperfusion-related acute renal injury [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6738.
- [6] REN G L, ZHU J, LI J, et al. Noncoding RNAs in acute kidney injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2266-2276.
- [7] ZHOU P, CHEN Z, ZOU Y, et al. Roles of non-coding rnas in acute kidney injury[J]. Kidney Blood Press Res, 2016, 41(6): 757-769.
- [8] LAN Y F, CHEN H H, LAI P F, et al. MicroRNA-494 reduces ATF3 expression and promotes AKI[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23: 2012-2023.
- [9] KHWAJA A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury[J]. Nephrol Clin Pract, 2012, 120(4): 179-184.
- [10] DEJIMA H, IINUMA H, KANAOKA R, et al. Exosomal

microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 13: 1256-1263.

- [11] LIU T, ZHANG X, DU L, et al. Exosome-transmitted miR-128-3p increase chemosensitivity of oxaliplatin-resistant colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 43.
- [12] LV L L, FENG Y, TANG T T, et al. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 731-739.
- [13] MERCHANT M L, ROOD I M, DEEGENS J K J, et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(12): 731-749.
- [14] DING H, LI L X, HARRIS P C, et al. Extracellular vesicles and exosomes generated from cystic renal epithelial cells promote cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4548.
- [15] ERDBRÜGGER U, BLIJNDORP C J, BIJNSDORP I V, et al. Urinary extracellular vesicles: a position paper by the urine task force of the international society for extracellular vesicles[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(7): e12093.
- [16] AOMATSU A, KANEKO S, YANAI K, et al. MicroRNA expression profiling in acute kidney injury[J]. Transl Res, 2021, 244: 1-31.
- [17] REN G L, ZHU J, LI J, et al. Noncoding RNAs in acute kidney injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2266-2276.
- [18] GONG Q, SHEN Z M, SHENG Z, et al. Hsa-miR-494-3p attenuates gene HtrA3 transcription to increase inflammatory response in hypoxia/reoxygenation HK2 Cell[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1665.
- [19] ZHANG Y, WANG J, YANG B, et al. Transfer of microRNA-216a-5p from exosomes secreted by human urine-derived stem cells reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 610587.
- [20] GARCIA-VIVES E, SOLÉ C, MOLINÉ T, et al. The urinary exosomal mirna expression profile is predictive of clinical response in lupus nephritis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1372.
- [21] LANGE T, ARTELT N, KINDT F, et al. MiR-21 is up-regulated in urinary exosomes of chronic kidney disease patients and after glomerular injury[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(7): 4839-4843.

(收稿日期: 2022-02-12 修回日期: 2022-04-27)

• 论 著 •

聚乙二醇干扰素- α 对乙型肝炎患者 HBsAg 及 Tfh 细胞、B 细胞标志物水平的影响

屈虹霞,董建毅,史莉华

兰州大学第一医院西站院区内镜室,甘肃兰州 730050

摘要:**目的** 探讨聚乙二醇干扰素- α (PEG-IFN- α)对慢性乙型肝炎(CHB)患者乙型肝炎表面抗原(HBsAg)及滤泡辅助性 T 细胞(Tfh 细胞)、B 细胞标志物水平的影响。**方法** 选取 2017 年 1 月至 2018 年 5 月该院收治的 84 例 CHB 患者,均采用 PEG-IFN- α 治疗 48 周,按免疫应答情况分为完全应答组(28 例)、部分应答组(15 例)、无应答组(41 例),比较治疗后各组肝功能指标[丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(STB)]、HBV-DNA、HBsAg 水平,以及乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)阳性率、Tfh 细胞标志物[肿瘤坏死因子相关激活蛋白(CD40L)、诱导性共刺激分子(ICOS)、标志物程序性死亡分子-1(PD-1)]、B 细胞标志物(IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 M(IgM)、免疫球蛋白 G(IgG)、炎症因子 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果** 治疗后完全应答组血清 AST、ALT、STB、HBV-DNA、HBsAg 水平及 HBeAg 阳性率低于无应答组、部分应答组,差异有统计学意义($P<0.05$);完全应答组患者 Tfh 细胞标志物 CD40L、PD-1 表达水平高于无应答组、部分应答组,差异有统计学意义($P<0.05$),各组 ICOS 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);完全应答组 B 细胞标志物 IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺表达水平高于部分应答组、无应答组,IgG、IgM 水平明显高于部分应答组、无应答组,差异有统计学意义($P<0.05$),各组 IgA 水平差异无统计学意义($P>0.05$);完全应答组 IFN- γ 水平高于无应答组、部分应答组,IL-4 水平低于部分应答组、无应答组,差异有统计学意义($P<0.05$),各组治疗前后 TNF- α 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PEG-IFN- α 治疗 CHB 患者能有效降低 HBsAg 水平,提高 Tfh 细胞及 B 细胞标志物表达水平。

关键词:聚乙二醇干扰素- α ; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎表面抗原; 肿瘤坏死因子相关激活蛋白; B 细胞标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.023

中图法分类号:R512.6+2

文章编号:1673-4130(2022)18-2288-05

文献标志码:A

Effect of PEG-IFN- α on levels of HBsAg, Tfh cell and B cell markers in patients with hepatitis B

QU Hongxia, DONG Jianyi, SHI Lihua

Endoscopy Room, West Station Area of First Hospital of Lanzhou University,
Lanzhou, Gansu 730050, China

Abstract:**Objective** To investigate the effect of pegylated interferon- α (PEG-IFN- α) on the levels of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), follicular helper T cells (Tfh) and B cell markers in the patients with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** A total of 84 patients with CHB treated in this hospital from January 2017 to May 2018 were selected and treated with PEG-IFN- α for 48 weeks, and divided into the complete response group (28 cases), the partial response group (15 cases) and non-responsive group (41 cases) according to the immune response. The levels of liver function indicators (ALT, AST, STB), HBV-DNA, HBsAg level, HBeAg positive rate, Tfh markers [tumor necrosis factor-related activator protein (CD40L), inducible costimulatory molecule (ICOS), marker programmed death-1 molecule (PD-1)], B cell markers (IgG⁺CD21⁺, CD38^{hi}CD138⁺), immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin G (IgG) and inflammatory factors γ -interferon (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) after treatment were compared among the groups. **Results** After treatment, the levels of serum AST, ALT, STB, HBV-DNA and HBsAg, and HBeAg positive rate in the complete response group were lower than those in the non-response group and partial response group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression levels of CD40L and PD-1 on the Tfh cell of the patients in the complete response group were high-

er than those in the non-response group and partial response group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$), and the ICOS expression level had no statistically significant difference among the various groups ($P<0.05$). The expression levels of IgG⁺CD21⁺ and CD38^{hi}CD138⁺ on the B cell in the complete response group were higher than those in the partial response group and the non-response group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$), while the levels of IgG and IgM were significantly higher than those in the partial response group and non-response group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the IgA level among the various groups ($P>0.05$). The level of IFN- γ in the complete response group was higher than that in the non-response group and the partial response group, and the IL-4 level was lower than that in the partial response group and the non-response group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in TNF- α level in each group between before and after treatment ($P>0.05$). **Conclusion** PEG-IFN- α in treating the patients with CHB can effectively reduce the HBsAg level, increase the expression levels of Tfh cell and Bcell markers.

Key words: pegylated interferon- α ; hepatitis B virus; hepatitis B virus surface antigen; tumor necrosis factor-related activator protein; B cell marker

慢性乙型肝炎(CHB)是目前全球较为严重的公共卫生问题之一,而乙型肝炎病毒(HBV)的不断复制和对肝细胞的持续破坏是引发 CHB 病情进展的关键因素^[1]。目前临床上多采用干扰素及核苷类似物进行抗 HBV 治疗,与核苷类似物相比,干扰素更能帮助患者在停止治疗后获得持续的病毒学应答和乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的血清学转换,但相关免疫机制尚不明确^[2]。乙型肝炎表面抗体(HBsAb)主要来自活化后的 B 细胞,而 B 细胞活化受滤泡辅助性 T 细胞(Tfh 细胞)的调节,提示 Tfh 细胞也参与了 CHB 患者抗病毒免疫过程^[3]。Tfh 细胞表面高表达肿瘤坏死因子相关激活蛋白(CD40L),因此 CD40L 水平能在一定程度上反映 Tfh 细胞数和免疫水平^[4]。本研究采用聚乙二醇干扰素- α (PEG-IFN- α)治疗 CHB 患者,探讨治疗前后患者 HBsAg 及 Tfh 细胞、B 细胞标志物水平变化,以期进一步明确 PEG-IFN- α 影响病毒学应答和 HBsAg 血清学转换的内在机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 5 月本院收治的 84 例 CHB 患者。纳入标准:(1)符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》^[5]中关于 CHB 的诊断标准;(2)年龄 18~65 岁。排除标准:(1)自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、肝癌等其他肝脏疾病;(2)患者为孕妇或处于哺乳期;(3)近半年进行过抗病毒治疗或采用免疫抑制剂治疗;(4)合并其他脏器严重病变或精神障碍等。按疗效分为完全应答组(28 例)、部分应答组(15 例)、无应答组(41 例),疗效判断标准同样参考文献^[5]:完全应答,HBsAg、HBV-DNA 完全清除;部分应答,丙氨酸氨基转移酶(ALT)恢复正常,HBV-DNA $<1\,000\text{ copy/mL}$,HBsAg 阳性;无应答,HBsAg、HBV-DNA 略有下降或无变化,HBV-

DNA $\geq 1\,000\text{ copy/mL}$ 。各组患者性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究的所有患者知情并签署知情同意书。

表 1 各组患者一般资料比较(n 或 $\bar{x}\pm s$)				
组别	n	性别		年龄(岁)
		男	女	
完全应答组	28	15	13	39.52 $\pm$ 7.42
部分应答组	15	9	6	38.26 $\pm$ 9.36
无应答组	41	23	18	38.73 $\pm$ 10.15
F/χ^2		0.165		1.206
P		0.921		0.074

1.2 方法 所有患者采用 PEG-IFN- α (F. Hoffmann-La Roche Ltd; 国药准字:J20120074)治疗 48 周,根据患者体质量给予 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 肌肉注射,1 次/周。将治疗过程中出现严重不良反应者(外周血中性粒细胞计数 $<0.5\times 10^9/\text{L}$ 、血小板计数 $<25\times 10^9/\text{L}$ 、严重抽搐等)剔除。

1.3 观察指标 分别于治疗前后抽取患者空腹静脉血,离心取上清液,采用全自动生化仪(日立 7600 型)检测血清 ALT、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(STB)水平,采用 ELISA 检测血清乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性率(HBeAg 定量 $\leq 1.0\text{ S/CO}$ 为 HBeAg 阴性, $>1.0\text{ S/CO}$ 为 HBeAg 阳性)及 HBsAg、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-4、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG)和免疫球蛋白 M(IgM)水平,ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物试剂科技有限公司。采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组治疗前后 HBV DNA 水平,检测结果以 lg copy/mL 表示。分

离外周血单个核细胞,采用流式细胞仪(美国贝克曼公司 FACSCalibur 2 型)检测 Tfh 细胞标志物 [CD40L、诱导性共刺激分子(ICOS)、程序性死亡分子-1(PD-1)]及 B 细胞标志物(IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺)水平,流式细胞仪使用的所有试剂均购自美国贝克曼公司。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 *F* 检验,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,两组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组肝功能比较 治疗后,完全应答组血清

AST、ALT、STB 水平低于无应答组、部分应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组肝功能比较($\bar{x} \pm s$, U/L)				
组别	<i>n</i>	AST	ALT	STB
完全应答组	28	33.16±5.04 ^{#*}	33.48±5.24 ^{#*}	16.23±2.51 ^{#*}
部分应答组	15	104.29±12.74 [#]	87.24±16.25 [#]	18.34±2.67 [#]
无应答组	41	132.64±15.26	94.57±20.36	21.54±3.19

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 各组 HBV-DNA、HBsAg 水平及 HBeAg 阳性率比较 完全应答组 HBV-DNA、HBsAg 水平及 HBeAg 阳性率低于部分应答组和无应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组 HBV-DNA、HBsAg 水平及 HBeAg 阳性率比较($\bar{x} \pm s$ 或 <i>n</i> (%))				
组别	<i>n</i>	HBV-DNA(Ig copy/mL)	HBsAg(IU/mL)	HBeAg 阳性率
完全应答组	28	2.02±0.36 ^{#*}	1 236.40±154.62 ^{#*}	5(17.86) ^{#*}
部分应答组	15	2.37±0.52 [#]	1 457.27±164.18 [#]	8(53.33) [#]
无应答组	41	4.20±0.68	3 365.18±396.25	17(41.46)

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 各组 Tfh 细胞标志物 CD40L、ICOS、PD-1 水平比较 完全应答组 Tfh 细胞标志物 CD40L、PD-1 表达水平高于无应答组、部分应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各组 ICOS 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 各组 Tfh 细胞标志物水平比较($\bar{x} \pm s$, %)				
组别	<i>n</i>	CD40L	ICOS	PD-1
完全应答组	28	5.92±0.63 ^{#*}	3.41±0.36	6.72±0.75 ^{#*}
部分应答组	15	4.09±0.51 [#]	3.37±0.52	6.34±0.69 [#]
无应答组	41	3.75±0.54	3.42±0.57	5.86±0.66

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.4 各组 B 细胞标志物 IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺ 水平比较 完全应答组 B 细胞标志物 IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺ 表达水平高于部分应答组和无应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 5。

表 5 各组 B 细胞标志物水平比较($\bar{x} \pm s$, %)			
组别	<i>n</i>	IgG ⁺ CD21 ⁺	CD38 ^{hi} CD138 ⁺
完全应答组	28	16.25±1.80 ^{#*}	4.84±0.51 ^{#*}
部分应答组	15	13.19±1.66 [#]	3.62±0.47 [#]
无应答组	41	11.27±1.54	2.74±0.35

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.5 各组免疫球蛋白水平比较 治疗 48 周后,完全应答组 IgG、IgM 水平明显高于部分应答组、无应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各组 IgA 水平差

异无统计学意义($P > 0.05$),见表 6。

表 6 各组 IgG、IgA、IgM 水平比较($\bar{x} \pm s$, mg/mL)				
组别	<i>n</i>	IgG	IgA	IgM
完全应答组	28	22.71±3.29 ^{#*}	2.16±0.37	3.25±0.36 ^{#*}
部分应答组	15	14.06±3.15 [#]	2.07±0.33	2.08±0.31 [#]
无应答组	41	11.42±2.83	2.14±0.30	1.24±0.20

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.6 各组炎症因子水平比较 治疗后完全应答组 IFN- γ 水平高于部分应答组、无应答组,IL-4 水平低于部分应答组、无应答组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各组治疗前后 TNF- α 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 7。

表 7 各组炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)				
组别	<i>n</i>	IFN- γ	IL-4	TNF- α
完全应答组	28	11.04±1.28 ^{#*}	6.59±0.74 ^{#*}	6.92±0.76
部分应答组	15	9.29±1.17 [#]	7.75±0.92 [#]	7.03±0.82
无应答组	41	5.72±0.66	9.28±1.06	6.98±0.85

注:与无应答组比较,[#] $P < 0.05$;与部分应答组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨 论

我国 CHB 患者已超过 2 000 万^[6],HBV 感染者众多。CHB 病情进展与 HBV 的持续感染密切相关,HBV 感染可诱发肝硬化、肝癌等,对患者预后造成不良影响^[7-8]。目前临床上多采用干扰素及核苷类似物进行抗 HBV 治疗,如 INF- γ 、替诺福韦、恩替卡韦等,

能在一定程度上抑制 HBV 复制和减轻肝脏炎性损伤^[9-10]。研究显示,HBV 在体内持续复制,很难被完全清除^[11],而探讨其中的免疫调节机制对制订更合适的治疗方案、帮助患者实现 HBeAg 转阴和 HBsAg 血清学转换具有重要意义。

本研究根据患者治疗情况将其分为完全应答组、部分应答组和无应答组,研究发现,完全应答组 AST、ALT、STB 水平低于无应答组、部分应答组,提示完全应答患者肝功能优于无应答患者。目前已经得到医学界公认的是,HBsAb 在 HBV 清除过程中起了重要作用^[12]。HBsAb 是由 B 细胞活化后生成的抗体,而其对应的 HBsAg 水平升高则提示体液免疫功能不足^[13]。本研究中完全应答组 HBV-DNA、HBsAg 水平及 HBeAg 阳性率低于部分应答组和无应答组,提示完全应答患者 HBV 复制被抑制和 HBsAg 的血清学转换效果最好。

Tfh 细胞在 B 细胞成熟过程中起辅助调节作用,已有研究发现,采用 PEG-IFN- α 联合核苷类似物治疗 CHB 有助于改善 HBV 特异性 Tfh 细胞功能,提示 Tfh 细胞参与了 PEG-IFN- α 治疗后的免疫应答过程^[14]。还有研究发现,Tfh 细胞在 CHB 患者中较健康对照人群明显增多且其功能性分子高表达^[15]。CD40L、PD-1、ICOS 均为 Tfh 细胞表面功能分子,其中 CD40L 主要表达在活化的 T 细胞上,能与 B 细胞上的对应受体 CD40 结合从而促进 B 细胞成熟;PD-1 主要在 T 细胞表面起负性调节作用,能通过 PD-1/PD-L1 通路影响 T 细胞活性;ICOS 是一种共刺激分子,能下调 IL-4、IL-6 等炎症因子的表达水平,可促进 Th2 细胞的免疫应答^[16-17]。有研究认为 CHB 患者 Tfh 细胞上 ICOS 的表达与患者免疫系统紊乱程度有关^[18],而本研究中 Tfh 细胞的 CD40L、PD-1 表达水平在完全免疫应答患者中明显升高,提示 PEG-IFN- α 治疗后能增强患者 Tfh 细胞的免疫功能。ICOS 表达水平在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$),可能是因为外周血 Tfh 细胞与直接刺激淋巴器官的 Tfh 细胞功能不同。有研究发现,CD38^{hi}CD138⁺ 浆细胞、IgG⁺CD21⁺B 细胞在 CHB 患者的表达水平明显高于健康人群^[19],提示其参与了 CHB 的免疫应答过程。而本研究中治疗后 B 细胞标志物 IgG⁺CD21⁺、CD38^{hi}CD138⁺ 及 IgG、IgM 水平在完全应答组中明显升高,还提示 PEG-IFN- α 治疗后能增强 B 细胞免疫功能。前面的研究已经发现经 PEG-IFN- α 治疗后完全免疫应答患者 Tfh 细胞多个活化标志物表达升高,而 B 细胞活化标志物的增加提示 B 细胞活化,产生抗体能力增强。此外,Tfh 细胞标志物 ICOS 在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$),还提示标志物为 CD40L 的 Tfh 细胞可能比 ICOS 更能有效激活 B 细

胞。CHB 也是一种慢性炎性反应疾病,多种炎症因子也在免疫系统中起到重要作用,其中 IFN- γ 主要由 Th1 细胞分泌,IL-4 主要由 Th2 细胞分泌。相关研究发现,IFN- γ 能促进 Tfh 细胞中 CD40L 和 ICOS 表达^[20]。本研究中治疗后无应答患者 IFN- γ 水平偏低,IL-4 水平偏高,提示此类患者存在 Th1 细胞应答减弱而 Th2 细胞应答增强的免疫失衡,这可能是无应答患者无法有效控制 HBV 复制的原因之一。

综上所述,经 PEG-IFN- α 治疗后完全免疫应答患者 Tfh 细胞表面功能分子 CD40L 增加,B 细胞活化和分化加快,提示干扰素可能通过增强 CHB 患者 Tfh 细胞功能来辅助 B 细胞活化并产生抗体,从而促进 HBsAg 的血清学转变。

参考文献

- [1] 张茜,胡鹏.慢性乙型肝炎治愈新药研究进展[J].实用肝脏病杂志,2019,22(3):16-20.
- [2] 于德敏,张欣欣.血清 HBsAg 定量检测在慢性乙型肝炎临床诊疗中的应用及其意义[J].临床肝胆病杂志,2019,35(10):2150-2155.
- [3] 盘铮,尤旭,崇雨田,等.慢性 HBV 感染者经核苷(酸)类似物治疗获血清 HBsAg 转阴后的长期预后[J].中山大学学报(医学版) 2018,39(6):866-872.
- [4] 马兴梅.胸腺肽联合重组人干扰素 α -2b 治疗慢性乙型肝炎疗效及对外周血 T 淋巴细胞亚群水平的影响[J].河北医药,2018,40(23):6-10.
- [5] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(5):6-25.
- [6] 周友乾,李翠,尹凤鸣,等.核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 阴转后 HBsAg 定量的变化[J].临床肝胆病杂志,2019,35(5):977-981.
- [7] YANG Y,LIU M,DENG Y,et al. Pretreatment microRNA levels can predict HBsAg clearance in CHB patients treated with pegylated interferon α -2a[J]. Virol J,2018,15(1):73-79.
- [8] 李怡敏,袁琳,杨永生,等.干扰素诱导肝癌细胞 ADAR1 的表达模式及 HBV 复制抑制[J].第三军医大学学报,2019,41(14):1336-1342.
- [9] 康信通,胡蓉,刘勇,等.肝组织 HBV cccDNA 检测在藏族慢性乙肝患者干扰素治疗中的临床意义[J].四川医学,2018,39(7):735-739.
- [10] 袁正宏,何丽芳,闻玉梅,等.干扰素和核苷(酸)类似物治疗对 HBV cccDNA 的影响与慢性乙型肝炎的功能性治愈[J].中华肝脏病杂志,2020,28(8):640-644.
- [11] HUI Y Y,HO H J,HWAI I Y,et al. Sa1483- real-world rates of hepatitis B surface antigen (HBsAg) seroclearance in patients with chronic hepatitis B (CHB): a systematic review,conventional aggregated data meta-analysis (ADMA) and individual patient data meta-analysis(IPDMA)[J]. Gastroenterology,2018,154(6):1128. (下转第 2297 页)

• 综 述 •

肿瘤相关成纤维细胞促癌作用的研究进展*

杨肖莉¹, 薛桦², 于莹¹综述, 谷川莎^{1△}审校

1. 新乡医学院医学检验学院, 河南新乡 453000; 2. 新乡医学院第三临床学院, 河南新乡 453000

摘 要: 肿瘤的发生、进展、侵袭和转移不仅依赖于癌细胞自身特性, 也深受肿瘤间质反应的影响, 因此受到严格的环境控制, 然而在形成肿瘤微环境的基质细胞中, 肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)是数量最多的, 并且在癌症进展中起着至关重要的作用。CAF 能够分泌各种细胞因子和趋化因子等相关物质, 通过细胞间接触发挥生物学功能, 并对细胞外基质进行合成和重构, 促进肿瘤的发生、进展、侵袭和转移。

关键词: 肿瘤微环境; 肿瘤相关成纤维细胞; 细胞外基质重构; 肿瘤代谢; 表型异质性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.024 **中图法分类号:**R730.2

文章编号:1673-4130(2022)18-2292-06 **文献标志码:**A

Research progress of cancer-promoting effect of tumor-associated fibroblasts*

YANG Xiaoli¹, XUE Hua², YU Ying¹, GU Chuansha^{1△}

1. Medical Laboratory College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China;

2. Third Clinical Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China

Abstract: The occurrence, progression, invasion and metastasis of tumors are not only dependent on the characteristics of the cancer cells themselves, but also deeply affected by the tumor stromal reaction, therefore, which is strictly controlled by the environment. However, cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the largest number in the stromal cells forming the tumor microenvironment and play a crucial role in cancer progression. CAFs can secrete various cytokines, chemokines and other related substances, and play the biological functions through intercellular contact, moreover synthesize and remodel the extracellular matrix to promote the occurrence, progression, invasion and metastasis of cancer.

Key words: tumor microenvironment; cancer-associated fibroblasts; extracellular matrix remodeling; tumor metabolism; phenotypic heterogeneity

近几十年来, 癌症的发病率和病死率仍呈逐渐上升的趋势。肿瘤包括间质和实质, 实质是指肿瘤细胞, 间质是肿瘤赖以生存的微环境, 由细胞(成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞)和非细胞成分(蛋白质、蛋白酶、细胞因子等)组成^[1], 其中肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)是肿瘤微环境中重要的组成部分之一。要更好地治疗肿瘤, 不仅要着手于肿瘤细胞, 还要专注于研究与肿瘤微环境相关的复杂机制, 以寻求有效治疗肿瘤的方法。CAF 对肿瘤发生、进展、复发及转移都具有重要的促进作用。因此, 充分认识 CAF 在促进肿瘤进展中的重要性 and 探讨其分子机制, 对于临床治疗肿瘤以及药物研发至关重要。

1 CAFs 的定义和来源

成纤维细胞最初被定义为结缔组织中合成胶原

的细胞, 它非上皮细胞, 非免疫细胞, 是多种结缔组织的组成部分。正常情况下, 成纤维细胞通常被认为是惰性的, 其代谢和转录活性较弱。研究表明, 成纤维细胞被激活后的能力首先在伤口愈合的环境中被观察到, 而从伤口愈合组织及纤维化组织中分离出来的成纤维细胞比健康器官中的成纤维细胞分泌更多的细胞外基质(ECM)^[2]。成纤维细胞一旦被激活, 其产生细胞因子、趋化因子以及招募免疫细胞和诱导 ECM 重构的能力都大大增强^[3]。CAF 是与肿瘤相关的成纤维细胞, 在肿瘤的进展过程中产生, 对肿瘤具有一定的作用。

新的证据表明, CAF 是一种复杂的异质性细胞群, 这可能与多种类型来源有关^[4]。已有的研究表明, CAF 有 6 种类型来源: (1) 可以来自邻近肿瘤细

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31900569); 河南省高等学校重点科研项目(20B320017)。
△ 通信作者, E-mail: gchsa@163.com。
网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220720.1847.006.html\(2022-07-21\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220720.1847.006.html(2022-07-21))

胞激活的正常成纤维细胞,例如肝脏星状细胞和胰腺星状细胞被重新激活后,获得肌成纤维细胞样表型,表达 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA),这两种细胞被认为是肝癌和胰腺癌中的 CAFs^[5-6]。(2)骨髓源性纤维细胞的募集,这也可能在肿瘤进展中发挥作用^[7]。(3)间充质干细胞的募集,间充质干细胞能够在乳腺癌、胃癌和胰腺癌等癌症中分化成一定比例的 CAFs,并且这种细胞具有很强的自我更新能力并且表达 CAFs 相关的标志物,如波形蛋白、成纤维细胞活化蛋白等。(4)上皮细胞到间质细胞的转化^[8]。(5)内皮细胞到间质细胞的转化。(6)这一种是不常见的,来自脂肪细胞以及平滑肌细胞的分化、转移^[9]。目前,关于 CAFs 的具体来源机制尚未完全阐明,有待进一步的研究,然而因为其具有不同的来源类型,也造成了 CAFs 具有不同的生物学功能,并对肿瘤具有不同的作用。研究人员证明了成纤维细胞比较稳定,但由于各种不可控因素引起的基因突变,会诱导 CAFs 的产生。

总的来说,需要更深入地研究 CAFs 的来源,并在肿瘤进展中监测 CAFs 的变化,以提高研究者对肿瘤微环境在肿瘤进展中所起作用的全面理解力。

2 CAFs 的生物学功能

目前,关于成纤维细胞的定义还是一个模糊的概念,在伤口愈合、炎症、组织纤维化以及癌症过程中,成纤维细胞都能在一定环境条件下被激活。在癌症发生过程中,活化的成纤维细胞被称为 CAFs^[10]。导致成纤维细胞激活的外源性信号有许多,并且在不同类型肿瘤中有所不同。有研究表明,CAFs 与肿瘤细胞共同进化可获得一种肿瘤前表型,这种表型有利于肿瘤在微环境中繁殖^[25]。

癌症被认为是无法愈合的伤口^[11]。癌细胞在特定的组织中持续出现和积累代表了持续的组织损伤,从而启动了机体对癌细胞的慢性伤口愈合反应,这导致了肿瘤的慢性宿主修复反应,称之为癌症纤维化^[2]。癌症纤维化是可改变的促纤维增生反应。虽然肌成纤维细胞在伤口愈合中的作用已经被深入地研究,但它们在癌症进展和转移中的作用更为复杂,并且正在被越来越多的研究者关注。

间质成纤维细胞活化受免疫细胞和癌细胞释放的多种生长因子的控制,其中转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF)和成纤维细胞生长因子 2(FGF2)是组织损伤中成纤维细胞激活的关键介质^[12]。许多癌症中被招募、活化的成纤维细胞依赖 TGF- β ,肿瘤微环境中的 TGF- β 可刺激 CAFs 的局部增殖和侵袭。癌细胞和间质细胞(包括成纤维细胞)分泌的 PDGF 可诱导成纤维细胞的增殖,并与癌症的

进展有关^[13]。正常情况下,基质一般处于静止状态,当基质被激活,活化的成纤维细胞数量增加时,表达大量的 α -SMA、成纤维细胞活化蛋白(FAP)等与 CAFs 相关的蛋白^[2]。肿瘤微环境中新生毛细血管以及免疫细胞的聚集都是由许多生长因子介导的,例如 ECM 内的血管内皮生长因子 A(VEGFA)、PDGF、表皮生长因子(EGF)、白细胞介素(IL)-6 和 IL-8 等^[7],癌细胞和 CAFs 均能产生 VEGFA,VEGFA 能够增强血管通透性,反过来促进免疫细胞、成纤维细胞及增生性内皮细胞的积累^[13]。肿瘤间质富含一些胶原蛋白,能够影响肿瘤的生成,并且随着肿瘤的增殖和侵袭性增强,基质的含量也会增加。成纤维细胞的体外研究往往依赖于常用的激活配体,如 TGF- β 、骨形态发生蛋白(BMP)、PDGF、EGF、FGF2。在乳腺癌中,浸润性癌细胞促进 WNT7a(WNT 信号通路中的一种关键蛋白)的招募并激活成纤维细胞以促进肿瘤侵袭性^[14]。在胰腺癌中,维生素 D 受体的激活可能抑制了 CAFs 的促瘤作用^[15]。有数据表明,在早期肿瘤病变中,免疫细胞来源的 IL-1 β 介导核因子(NF)- κ B 信号通路,可增强 CAFs 的促炎和促肿瘤功能,CAFs 通过生长因子和 ECM 重构等促进肿瘤的进展,在构建有利于肿瘤启动、血管生成、肿瘤扩散和转移的微环境中发挥关键作用^[4]。

CAFs 有许多不同的亚群,并且具有表型异质性,进而表现出不同的功能特性。有研究证明,间充质干细胞能够影响肿瘤的发生,WAGHRAY 等^[16]在胰腺癌中鉴定了一种新的间充质干细胞来源的 CAFs,该 CAFs 通过粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子控制肿瘤的生长和进展。此外,在胰腺癌中 P53 突变导致癌细胞释放的外泌体,使 CAFs 表型及 ECM 结构发生变化,导致肿瘤进展和侵袭性增强^[17]。有报道称胰腺癌细胞促进了 CAFs 中 SOCS1(一种已知的 STAT 抑制剂)基因的甲基化,使得 SOCS1 的表达水平降低,这导致了 STAT3 的磷酸化,促进了胰岛素样生长因子 1 分泌和肿瘤进展^[18]。一项研究发现,整合素 β 4 介导癌相关成纤维细胞的代谢重编程,其通过促进线粒体自噬促发 CAFs 的糖酵解,并有助于维持乳腺癌中 CAFs 表型的激活,促进乳腺癌的侵袭和转移^[19]。

3 CAFs 在肿瘤进展中的作用

3.1 CAFs 与肿瘤发生和转移

肿瘤微环境包括细胞成分和非细胞成分,其中非细胞成分又称为 EMC^[1],然而多项研究表明,ECM 的结构影响许多重要的细胞功能,如细胞增殖、细胞分化和肿瘤形成^[20-21]。事实上,ECM 结构影响细胞形态、整合素信号传导和细胞骨架,从而参与调控细胞周期。肿瘤微环境中的 CAFs 在 ECM 重构中起着重要作用,而与

正常组织相比,ECM 会发生变化,有报道称这些变化会影响癌细胞的增殖和迁移^[22]。以上观点可以推测,CAFs 可能通过 ECM 重构来影响肿瘤的发生。研究表明,在乳腺癌小鼠模型中,脂氧合酶抑制剂治疗导致 ECM 交联减少,可防止 ECM 硬度增加和延缓肿瘤进展^[1];在胰腺癌小鼠模型中,肿瘤相关 CAFs 的减少导致化疗效率的提升,从而表明 CAFs 在肿瘤内药物传递中也发挥了关键作用。有研究表明,ECM 重塑增强了肿瘤细胞侵袭性^[23-24]。这些发现证实了 CAFs 可能通过诱导蛋白酶介导的上皮 EMC 重构引导上皮癌细胞的迁移。

CAFs 能够分泌一些可溶性因子,例如:从肺癌中提取的 CAFs 会产生大量的肝细胞生长因子,从而激活邻近癌细胞中的 c-Met 通路,CAFs 分泌的基质金属蛋白酶 13 通过从 ECM 释放血管内皮生长因子促进肿瘤血管生成,从而导致鳞状细胞癌或黑色素瘤的侵袭性增加^[7]。热休克因子是一种在 CAFs 中高度激活的转录因子,它驱动促肿瘤细胞因子和生长因子的转录,促进肿瘤的快速生长^[25]。一项研究表明,CAFs 可以为胰腺癌提供 WNT 生态位,支持 WNT 缺陷的胰腺导管腺癌体内生长^[26]。许多 CAFs 衍生的因子,如成纤维细胞生长因子 1、丝氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶 2,都能以旁分泌的方式促进乳腺癌细胞的深度增殖^[27]。总之,尽管目前尚无直接证据表明 CAFs 在人类癌症中促进肿瘤发生,但上述大量研究表明,CAFs 可能在肿瘤形成中发挥关键作用,这需要进行进一步的研究。

肿瘤中分离出来的成纤维细胞与正常器官分离出来的成纤维细胞相比,具有许多不同的特性。CAFs 有很强的迁移能力,并且 CAFs 能够分泌更多的生长因子和趋化因子。在许多癌细胞和 CAFs 共培养实验中发现,与正常成纤维细胞相比,CAFs 能够增强癌细胞的致瘤性^[28]。最初的研究表明,猿猴病毒 40 转化的前列腺上皮细胞与正常成纤维细胞或 CAFs 混合后,将混合物接种到小鼠体内,CAFs 可导致类似前列腺上皮内瘤变的肿瘤形成^[29]。随后,这样类似的研究也在其他肿瘤中得以证实:前列腺癌基质成纤维细胞大量分泌趋化因子,在肿瘤生长、血管生成和巨噬细胞浸润中发挥作用;与肿瘤发展相关的 CAFs 表现出促炎特征,招募巨噬细胞,促进血管形成,并促进肿瘤生长^[30]。

肿瘤的生长也需要一定的营养物质和生长环境,丰富的血管提供了这些条件,这就需要进一步了解 CAFs 对血管生成的作用。在促血管生成因子中,CAFs 产生丰富的 VEGFA、PDGF、FGF2 等,这些因子促进血管生成,为肿瘤生长提供氧气和营养物质,

CAFs 还通过 ECM 密度和组成的变化来调节肿瘤间质的硬度、弹性和组织流体压力,从而调节血管生成并促进肿瘤生长^[31]。

肿瘤的转移是一个多阶段的过程,当癌细胞突破基底膜后,开始向其他组织侵袭并渗透。研究表明,在小鼠体内,若缺乏成纤维细胞分化的 S100A4,体内肿瘤不转移,这表明 S100A4 阳性基质细胞在癌细胞转移、扩散方面具有决定性作用^[32]。CAFs 也可能影响原发肿瘤的 ECM 硬度,增强癌细胞侵袭性^[31]。乳腺癌中 CAFs 可产生大量的基质细胞衍生因子 1 和胰岛素样生长因子 1,这有助于癌细胞适应骨髓微环境,从而促进骨转移^[33]。此外,在 CAFs 中通过下调 CCL2 的表达显著抑制口腔鳞癌的转移^[34]。在结直肠癌中,PDGF 激活的 CAFs 可以通过一些趋化因子的分泌促进肿瘤细胞的内渗和远处转移^[35]。此外,过表达的生长因子 15 可发挥全身性作用,促进前列腺癌细胞的恶性进展和扩散^[36]。肿瘤来源的外泌体 miR-1247-3p 通过促进 CAFs 的激活加速肝癌的肺转移^[37]。更有趣的是,CAFs 可以产生一种 WNT 拮抗剂,从而促进老年个体黑色素瘤细胞的血管生成和恶性表型的产生^[38]。研究表明,S100A4 表达水平升高使成纤维细胞在促血管生成和抗凋亡微环境中发挥关键作用,通过释放大量促血管生成因子和抗凋亡因子,从而有利于乳腺癌细胞的肺转移^[32]。此外,转移部位的 CAFs 在 TGF- β 刺激下分泌 IL-11 来激活肿瘤细胞中的 GP130-STAT3 信号,有利于肿瘤细胞发生转移,从而促进转移性结直肠癌的器官定植^[39]。

3.2 CAFs 与肿瘤代谢 肿瘤基质代谢是肿瘤进展过程中不可避免的一部分。最近的癌症代谢研究表明,CAFs 的有氧糖酵解(称为反向瓦伯格效应)就是这样一种代谢支持形式,这种效应的增加似乎也与分解代谢活性和自噬有关^[19]。这些代谢适应被认为在肿瘤微环境细胞和癌细胞重新利用营养物质方面起着关键作用。肿瘤为了快速增殖以及克服严酷的环境限制,通过有氧糖酵解为自身提供高能量的代谢物。在 CAFs 中,活性氧(ROS)诱导的线粒体自噬被广泛研究,除了 ROS 外,细胞应激的形式也可以激活有丝分裂。有研究表明,整合素家族(ITG)可以调节代谢信号通路,如 ITGB1 在乳腺癌中可以通过控制 TWIST 诱导糖代谢重编程。CAFs 在不同的肿瘤中通过不同的信号通路参与癌细胞的合成代谢和分解代谢平衡。CAFs 代谢变化的驱动因素可能包括 TGF- β 、PDGF、缺氧、缺氧诱导因子 1 α 和 ROS 介导的对 CAV1 基因的抑制,具体来说,CAV1 基因敲除的成纤维细胞乳酸产量以及脂肪酸、谷氨酰胺水平增加^[19]。虽然启动 CAFs 代谢重编程的具体分子基础

还需要进一步研究,但一旦建立,CAF 的代谢转移可能部分通过表观遗传重塑^[40]。相反,CAF 和癌细胞的代谢共生关系可能会根据氧、细胞外代谢物有效性和趋化因子或细胞因子信号而动态变化。上皮性癌变可能指导 CAF 的代谢重编程及糖酵解,以促进 CAF 和癌细胞之间的代谢共生^[41],癌细胞对合成代谢的依赖增强可能促进耐药途径的出现^[42]。癌细胞旁分泌信号可能导致 CAF 的代谢重编程,CAF 和癌细胞之间的共生创造了一个肿瘤代谢生态系统,这可能成为癌症治疗的潜在靶点。研究表明,乳腺成纤维细胞不表达整合素 $\beta 4$,但通过与三阴性乳腺癌细胞接触,可以表达整合素 $\beta 4$,对乳腺癌的发展和转移起一定的作用^[19]。在前列腺癌中,CAF 与癌细胞之间的接触增加了它们对 pH 值和缺氧等应激的敏感性,并维持了它们的增殖^[43]。在结直肠癌中,CAF 与癌细胞接触,通过释放外泌体影响癌细胞的增殖^[44]。这种共生关系是否会进一步促进肿瘤的转移性生长,仍然有待进一步研究。

3.3 CAFs 与耐药 癌症的治疗效果与是否耐药密切相关,而关于 CAF 与耐药的关系仍待进一步研究。据报道,在非小细胞肺癌中,CAF 释放的高水平 IL-6 可增强 TGF- β 诱导的上皮-间质转化和顺铂耐药性;而顺铂反过来促进癌细胞产生 TGF- β ,导致 CAF 激活^[45-46]。在胰腺癌中,CAF 不仅本身具有耐药性,而且通过在外泌体中传递的 mRNA 及其靶标 miR-146a 耐药^[47]。在前列腺癌中,CAF 可上调谷胱甘肽水平,抑制 ROS 的产生,以拮抗化疗诱导的前列腺癌细胞死亡^[48]。在乳腺癌中,CAF 表面的 CD10 和 GPR77 通过分泌 IL-6 和 IL-8 诱导化疗耐药^[10]。

4 靶向 CAFs 治疗癌症

CAF 在促进癌症中发挥着重要的作用。近年来,随着对 CAF 的生物学特性逐步了解,人们对其靶向治疗的研究也在增多。靶向 CAF 治疗癌症可以从分泌的因子以及下游信号通路作为出发点,也可从让 CAF 自身的活性变为静息状态着手,还可靶向 CAF 来源的细胞等。研究表明,用中和单抗阻断 CD10 和 GPR77 可减少乳腺癌异种移植模型中的肿瘤发生,并且增强其化疗敏感性^[10]。LOH 等^[49]发现,能够通过靶向 CAF 衍生的细胞因子和生长因子抑制肿瘤的侵袭和转移。临床前研究中,FAP 特异性 CAR-T 细胞促进了对 FAP 阳性 CAF 的特异性免疫攻击,同时具有抗肿瘤效果^[50]。已知 IL-6 和 JAK1-STAT3 通路参与 CAF 激活,通过靶向 JAK1-STAT3 通路从而促进 ECM 重塑^[51]。在宫颈癌小鼠模型中,使用伊马替尼阻断 CAF 中的 PDGFR 信号通路,显著减少了 FGF2 的产生,从而抑制了肿瘤血

管生成和癌细胞增殖^[52]。血管紧张素抑制剂氯沙坦可以减少乳腺癌和胰腺癌中 CAF 产生的胶原蛋白和透明质酸,从而影响这些恶性肿瘤的血管灌注和药物传递^[53]。PEGPH20 联合吉西他滨可提高晚期胰腺导管腺癌患者的生存率^[54]。

5 结语和展望

CAF 是肿瘤微环境中的重要组分,可影响肿瘤的恶性生物学行为,在多种肿瘤的发生、侵袭和转移中发挥关键作用。在肿瘤微环境中,CAF 通过与其他细胞相互作用,分泌大量细胞因子和趋化因子,促进肿瘤的发生和转移,影响肿瘤代谢以及耐药性。因此,深入了解 CAF 在肿瘤中的作用及机制,有助于为肿瘤治疗提供新思路。

参考文献

- [1] FOZZATTI L, CHENG S Y. Tumor cells and cancer-associated fibroblasts: a synergistic crosstalk to promote thyroid cancer [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2020, 35 (4): 673-680.
- [2] KALLURI R. The biology and function of fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 582-598.
- [3] RAAB S, KLINGENSTEIN M, LIEBAU S, et al. A comparative view on human somatic cell sources for iPSC generation [J]. *Stem Cells Int*, 2014, 2014: 768391.
- [4] OHLUND D, HANDLY-SANTANA A, BIFFI G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer [J]. *J Exp Med*, 2017, 214 (3): 579-596.
- [5] KOSTALLARI E, SHAH V H. Pericytes in the liver [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1122: 153-167.
- [6] OMARY M B, LUGEA A, LOWE A W, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 50-59.
- [7] CHEN X, SONG E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2): 99-115.
- [8] SHI Y, DU L, LIN L, et al. Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(1): 35-52.
- [9] ZEISBERG E M, POTENTA S, XIE L, et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (21): 10123-10128.
- [10] SU S, CHEN J, YAO H, et al. CD10(+) GPR77(+) cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 841-856.
- [11] OHLUND D, ELYADA E, TUVESON D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound [J]. *J Exp Med*, 2014,

- 211(8):1503-1523.
- [12] WANG W, ZOU W. Amino acids and their transporters in t cell immunity and cancer therapy[J]. *Mol Cell*, 2020, 80(3):384-395.
 - [13] CLAESSEON-WELSH L, WELSH M. VEGFA and tumour angiogenesis[J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2):114-127.
 - [14] AVGUSTINOVA A, IRAVANI M, ROBERTSON D, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10305.
 - [15] SHERMAN M H, YU R T, ENGLE D D, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy[J]. *Cell*, 2014, 159(1):80-93.
 - [16] WAGHRAY M, YALAMANCHILI M, DZIUBINSKI M, et al. GM-CSF mediates mesenchymal-epithelial cross-talk in pancreatic cancer[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(8):886-899.
 - [17] VENNIN C, MELENEC P, ROUET R, et al. CAF hierarchy driven by pancreatic cancer cell p53-status creates a pro-metastatic and chemoresistant environment via perlecan[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3637.
 - [18] BIFFI G, ONI T E, SPIELMAN B, et al. IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGFbeta to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2):282-301.
 - [19] SUNG J S, KANG C W, KANG S, et al. ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts [J]. *Oncogene*, 2020, 39(3):664-676.
 - [20] CAI X, WANG K C, MENG Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in cellular homeostasis and disease progression[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:673599.
 - [21] DOZIER J, ZHENG H, ADUSUMILLI P S. Immunotherapy for malignant pleural mesothelioma: current status and future directions[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2017, 6(3):315-324.
 - [22] LECA J, MARTINEZ S, LAC S, et al. Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6⁺ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11):4140-4156.
 - [23] HUANG Z, FENG Y. Exosomes derived from hypoxic colorectal cancer cells promote angiogenesis through wnt4-induced beta-catenin signaling in endothelial cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(5):651-661.
 - [24] ZALCMAN G, MAZIERES J, MARGERY J, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial[J]. *The Lancet*, 2016, 387(10026):1405-1414.
 - [25] HUANG M, LI Y, ZHANG H, et al. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44⁺ CD24⁻ cells through SDF-1/CXCR4 interaction[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:80.
 - [26] SEINO T, KAWASAKI S, SHIMOKAWA M, et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(3):454-467.
 - [27] COSTA A, KIEFFER Y, SCHOLER-DAHIREL A, et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):463-479.
 - [28] AVAGLIANO A, GRANATO G, RUOCCO M R, et al. Metabolic reprogramming of cancer associated fibroblasts: the slavery of stromal fibroblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:6075403.
 - [29] CHEN X, GUAN Z, LU J, et al. Synergistic antitumor effects of cMet inhibitor in combination with anti-VEGF in colorectal cancer patient-derived xenograft models[J]. *J Cancer*, 2018, 9(7):1207-1217.
 - [30] LIM S Y, YUZHALLIN A E, GORDON-WEEKS A N, et al. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2016, 35(44):5735-5745.
 - [31] NAJAFI M, FARHOOD B, MORTEZAEE K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):2782-2790.
 - [32] LIU Y, GENG Y H, YANG H, et al. Extracellular ATP drives breast cancer cell migration and metastasis via S100A4 production by cancer cells and fibroblasts [J]. *Cancer Lett*, 2018, 430:1-10.
 - [33] LI M, LI M, YIN T, et al. Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2476-2484.
 - [34] LING Z, YANG X, CHEN X, et al. CCL2 promotes cell migration by inducing epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(6):477-482.
 - [35] YU Y, BLOKHUIS B R, GARSSSEN J, et al. A transcriptional insight into the impact of colon cancer cells on mast cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7):1689.
 - [36] SCHOFFSKI P, CRESTA S, MAYER I A, et al. A phase Ib study of pictilisib (GDC-0941) in combination with paclitaxel, with and without bevacizumab or trastuzumab, and with letrozole in advanced breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1):109.
 - [37] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):191.
 - [38] WARRIER S, MARIMUTHU R, SEKHAR S, et al. sFRP-mediated Wnt sequestration as a potential thera-

- peutic target for Alzheimer's disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 75: 104-111.
- [39] CALON A, ESPINET E, PALOMO-PONCE S, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(5): 571-584.
- [40] LIU T, ZHOU L, LI D, et al. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 60.
- [41] RUHLAND M K, LOZA A J, CAPIETTO A H, et al. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11762.
- [42] WINKLER J, ABISOYE-OGUNNIYAN A, METCALF K J, et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5120.
- [43] JANSSENS R, STRUYF S, PROOST P. The unique structural and functional features of CXCL12 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(4): 299-311.
- [44] GU C, WANG X, LONG T, et al. FSTL1 interacts with VIM and promotes colorectal cancer metastasis via activating the focal adhesion signalling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 654.
- [45] SEOANE J, GOMIS R R. TGF-beta family signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(12): a022277.
- [46] WANG W, ZHAO M, CUI L, et al. Characterization of a novel HDAC/RXR/HtrA1 signaling axis as a novel target to overcome cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 134.
- [47] RICHARDS K E, ZELENIAK A E, FISHEL M L, et al. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(13): 1770-1778.
- [48] SAJJABOONTAWEE N, SUPASITTHUMRONG T, TUN-VIRACHAISAKUL C, et al. Lower thiol, glutathione, and glutathione peroxidase levels in prostate cancer: a meta-analysis study[J]. *Aging Male*, 2020, 23(5): 1533-1544.
- [49] LOH J J, LI T W, ZHOU L, et al. FSTL1 secreted by activated fibroblasts promotes hepatocellular carcinoma metastasis and stemness [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(22): 5692-5705.
- [50] BUGHDA R, DIMOU P, D'SOUZA R R, et al. Fibroblast activation protein (FAP)-targeted car-T cells: launching an attack on tumor stroma [J]. *Immunotargets Ther*, 2021, 10: 313-323.
- [51] SIERSBAEK R, SCABIA V, NAGARAJAN S, et al. IL6/STAT3 signaling hijacks estrogen receptor alpha enhancers to drive breast cancer metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(3): 412-423.
- [52] LIU Z, CHEN H, LV F, et al. Sequential release of paclitaxel and imatinib from core-shell microparticles prepared by coaxial electrospray for vaginal therapy of cervical cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8760.
- [53] YAO H, XU K, ZHOU J, et al. A tumor microenvironment destroyer for efficient cancer suppression[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(1): 450-462.
- [54] RUSSELL J, GRKOVSKI M, O'DONOGHUE I J, et al. Predicting gemcitabine delivery by (18)F-fac pet in murine models of pancreatic cancer[J]. *J Nucl Med*, 2021, 62(2): 195-200.

(收稿日期: 2021-12-28 修回日期: 2022-05-12)

(上接第 2291 页)

- [12] 卢小娟, 罗秋平, 汪红艳, 等. HBsAg 阳性产妇乙型肝炎感染状况及新生儿血清中 HBsAg 和 HBsAb 水平分析[J]. *海南医学*, 2020, 31(7): 879-881.
- [13] YIP T, WONG G. Current knowledge of occult hepatitis B infection and clinical implications[J]. *Seminars Liver Dis*, 2019, 5(7): 247-252.
- [14] 辛梦, 冯东峰, 殷蓓蓓, 等. 乙型肝炎病毒相关性肝癌 TACE 术后干扰素治疗临床观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(9): 50-56.
- [15] 张杰. 干扰素联合替诺福韦治疗慢性乙型肝炎疗效分析[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(18): 2172-2174.
- [16] KAPATAIS A, LABROPOULOS P, OURANOU E, et al. Loss of HbsAg is enough to discontinue long-term therapy with Nucleos(T)ide analogues in HbeAg negative CHB patients in real clinical practice[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(1): S513-S514.
- [17] 张小梅, 雷青松, 秦波, 等. 泛素特异性蛋白酶 18 抑制 IFN α 抗 HBV 活性但并不抑制 IFN- λ 抗 HBV 的活性[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(9): 954-961.
- [18] 陈胜, 林昌锋, 陈积武. 肝苏片联合聚乙二醇化干扰素 α -2a 治疗慢性乙型病毒性肝炎的疗效观察[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(8): 214-218.
- [19] LIU K, XIE M, LU X, et al. Mutations within the major hydrophilic region (MHR) of hepatitis B virus from individuals with simultaneous HBsAg and anti-HBs in Guangzhou, Southern China[J]. *J Med Virol*, 2018, 7(12): 224-230.
- [20] 张晓飏, 宋锐锋, 李芙蓉. 外周血单个核细胞干扰素刺激基因表达水平与慢性乙型肝炎 HBV 复制的关系[J]. *肝脏*, 2019, 24(8): 214-219.

(收稿日期: 2021-12-12 修回日期: 2022-04-28)

• 短篇论著 •

4 项指标在急性呼吸窘迫综合征患者严重程度和预后评估中的价值*

高 敏¹, 吴 艺¹, 高守君¹, 郝丽琴²

1. 雅安市人民医院急诊科, 四川雅安 625000; 2. 雅安市第四人民医院老年科, 四川雅安 625000

摘 要:目的 分析 4 项指标对急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者严重程度和预后的评估价值。方法 选择 2018 年 1 月至 2021 年 1 月雅安市人民医院收治的 94 例 ARDS 患者, 根据病情严重程度分为轻度组 45 例、中度组 26 例、重度组 23 例, 根据患者治疗后生存情况分为生存组 64 例和死亡组 30 例。比较各组血清白细胞介素-8(IL-8)、C 反应蛋白(CRP)、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)及 N 末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP)水平。结果 重度组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平高于中度组、轻度组, 中度组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平高于轻度组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与生存组相比, 死亡组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平较高, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 炎症因子 IL-8、CRP、HMGB1 和 NT-proBNP 水平可作为判断 ARDS 严重程度和评估患者预后的指标。

关键词:急性呼吸窘迫综合征; 炎症因子; N 末端 B 型脑钠肽前体; 病情; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.025 **中图法分类号:**R441.8

文章编号:1673-4130(2022)18-2298-04 **文献标志码:**A

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是呼吸系统的重症疾病, 其病因为肺内外多种因素, 如烧伤、休克、严重感染等损伤肺泡上皮细胞及肺毛细血管内皮细胞, 进而导致肺泡水肿及弥漫性肺间质纤维化等^[1-2]。即使近些年医疗技术不断进步、呼吸支持技术持续发展, ARDS 病死率依然接近 40%^[3-4]。有学者认为, 对 ARDS 患者病情进行准确的评估有利于对该病患者的针对性治疗, 以改善预后, 因此寻找反映 ARDS 病情和预后的临床标志物成为临床研究的热点^[5-6]。本研究以 94 例 ARDS 患者作为研究对象, 探讨白细胞介素-8(IL-8)、C 反应蛋白(CRP)、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)及 N 末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP)水平判断 ARDS 病情严重程度及预后的价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 1 月至 2021 年 1 月雅安市人民医院收治的 94 例 ARDS 患者作为研究对象, 根据德国重症医学会制定的 ARDS 诊断标准^[7]将患者以病情严重程度分为轻度组 45 例、中度组 26 例、重度组 23 例。其中轻度组男 24 例、女 21 例, 年龄 32~74 岁、平均(58.47±12.83)岁, 体质量指数(BMI) 18~27 kg/m²、平均(22.65±3.26) kg/m²; 中度组男 14 例、女 12 例, 年龄 29~71 岁、平均(57.86±11.97)

岁, BMI 18~27 kg/m²、平均(22.41±3.74) kg/m²; 重度组男 11 例、女 12 例, 年龄 33~75 岁、平均(58.19±12.02)岁, BMI 18~26 kg/m²、平均(22.39±3.09) kg/m²。3 组性别、年龄、BMI 比较差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。纳入标准: (1)符合 ARDS 相关诊断标准^[7]; (2)年龄≥18 岁; (3)发病时间<24 h。排除标准: (1)合并严重肝肾功能不全; (2)患有恶性肿瘤; (3)妊娠或哺乳期妇女; (4)合并免疫系统疾病或心脏基础疾病; (5)合并严重精神或心理障碍难以配合研究。研究已获得雅安市人民医院伦理委员会批准, 患者及家属对本研究知情同意。

1.2 方法 患者入院后进入重症监护室, 监测心电图, 根据病情使用呼吸机正压通气, 使用抗菌药物治疗感染, 给予肠内营养支持治疗, 并维持水、电解质和酸碱内环境稳定。根据患者入院后 1 个月生存情况将其分为生存组 64 例和死亡组 30 例。

1.3 观察指标 (1)不同严重程度 ARDS 患者血清炎症因子及 NT-proBNP 水平: 患者进入重症监护室后第 1 天抽取 4 mL 静脉血, 离心处理后取上清液, 使用酶联免疫吸附试验检测轻度组、中度组和重度组血清 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平。(2)不同预后 ARDS 患者血清炎症因子及 NT-proBNP 水平: 于患者入院后即刻检测生存组和死亡组 IL-8、CRP、

* 基金项目: 四川省医学科研课题(S18030)。

HMGB1、NT-proBNP 水平。(3)分析血清炎症因子及 NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度的相关性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析;以受试者工作特征(ROC)曲线分析血清炎症因子及 NT-proBNP 水平预测 ARDS 患者死亡的价值;相关性分析行 Spearman 相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血清炎症因子及 NT-proBNP 水平比较 3 组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 生存组与死亡组血清炎症因子及 NT-proBNP 水平比较 与生存组相比,死亡组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 血清炎症因子及 NT-proBNP 水平预测 ARDS

患者死亡的 ROC 曲线分析 IL-8 ≥ 125.960 ng/L、CRP ≥ 17.049 mg/L、HMGB1 ≥ 30.439 μ g/L、NT-proBNP ≥ 3972.770 ng/L 是预测 ARDS 患者死亡的最佳截断值,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 3。

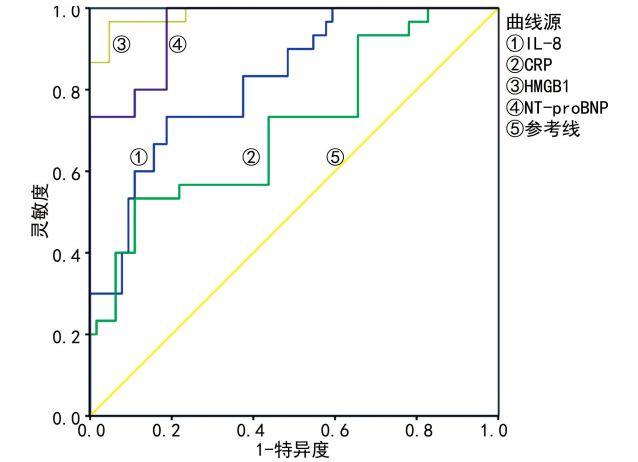


图 1 血清炎症因子及 NT-proBNP 水平预测 ARDS 患者死亡的 ROC 曲线

表 1 3 组血清炎症因子及 NT-proBNP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-8(ng/L)	CRP(mg/L)	HMGB1(μ g/L)	NT-proBNP(ng/L)
轻度组	45	116.39 $\pm$ 32.48	16.26 $\pm$ 3.58	18.27 $\pm$ 7.36	1582.47 $\pm$ 584.26
中度组	26	126.95 $\pm$ 37.63 ^a	18.92 $\pm$ 4.77 ^a	29.73 $\pm$ 8.29 ^a	2419.71 $\pm$ 782.59 ^a
重度组	23	131.08 $\pm$ 35.57 ^{ab}	21.75 $\pm$ 4.19 ^{ab}	40.98 $\pm$ 11.25 ^{ab}	4386.65 $\pm$ 1185.92 ^{ab}
<i>F</i>		5.375	49.304	53.644	89.051
<i>P</i>		0.005	<0.001	<0.001	<0.001

注:与轻度组相比,^a $P < 0.05$;与中度组相比,^b $P < 0.05$ 。

表 2 生存组与死亡组血清炎症因子及 NT-proBNP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-8(ng/L)	CRP(mg/L)	HMGB1(μ g/L)	NT-proBNP(ng/L)
生存组	64	116.18 $\pm$ 33.20	17.58 $\pm$ 3.49	22.05 $\pm$ 7.80	1397.65 $\pm$ 399.52
死亡组	30	137.26 $\pm$ 38.09	19.96 $\pm$ 4.12	37.55 $\pm$ 9.51	4852.24 $\pm$ 975.02
<i>t</i>		2.736	2.907	8.363	24.414
<i>P</i>		0.008	0.005	<0.001	<0.001

表 3 血清炎症因子及 NT-proBNP 水平预测 ARDS 患者死亡的 ROC 曲线分析

指标	曲线下面积	标准误	<i>P</i>	曲线下面积的 95%CI	最佳截断值	灵敏度	特异度
IL-8	0.822	0.044	<0.001	0.735~0.909	125.960 ng/L	0.733	0.912
CRP	0.709	0.059	0.001	0.593~0.926	17.049 mg/L	0.733	0.562
HMGB1	0.988	0.009	<0.001	0.970~1.000	30.439 μ g/L	0.867	0.969
NT-proBNP	0.955	0.019	<0.001	0.919~0.992	3972.770 ng/L	0.733	0.891

2.4 血清炎症因子及 NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度的相关性 ARDS 患者的血清炎症因子

及 NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度均呈正相关($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 血清炎症因子及 NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度的相关性

ARDS 病情严重程度	IL-8		CRP		HMGB1		NT-proBNP	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
轻度	0.522	0.002	0.482	0.005	0.493	0.004	0.476	0.004
中度	0.498	0.004	0.493	0.005	0.589	<0.001	0.436	0.006
重度	0.541	0.002	0.537	0.004	0.442	0.005	0.481	0.004

3 讨 论

随着医疗行业的发展,肺保护性通气策略、肺复张等治疗方法的提出,临床对 ARDS 的诊疗水平逐渐提高,患者治疗后的成功率也有了一定提升^[8-11]。但由于缺乏有效的治疗手段和监测指标,导致其致死率仍较高^[12]。目前已有研究证实 NT-proBNP 对诊断急性呼吸衰竭有较好的价值,NT-proBNP 同 ARDS 病情的严重程度也表现出一定的相关性^[7],本研究将进一步研究炎症因子 IL-8、CRP、HMGB1 和 NT-proBNP 水平在判断 ARDS 严重程度和预后评估中的价值。

本研究结果显示,轻、中、重 3 组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),此外,与生存组相比,死亡组 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平均较高,提示 IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 对于 ARDS 病情严重程度和预后的评估有一定价值。HMGB1 作为是一种高度保守的核蛋白,过去临床研究中的关注点主要在于 HMGB1 核蛋白的作用,直到 HMGB1 在脓毒症中作为一种炎症介质参与发病,其晚期促炎作用逐渐被人们认识,HMGB1 因此成为近些年临床研究的热点之一^[12]。研究显示,HMGB1 可导致肺部炎症反应,表现为肺出血、肺泡充血、炎症细胞因子表达水平升高等^[13]。ARDS 患者由于机体受损,HMGB1 以非典型方式到达细胞外,通过与特定受体结合,如晚期糖基化终产物受体(RAGE)等,进而诱导靶细胞释放黏附分子、趋化因子和炎症因子,引起炎症反应,导致机体损伤^[14]。有学者研究发现,在 ARDS 的病情进展中,HMGB1 起到重要作用,HMGB1 与多种炎症因子相互作用,可加重炎症反应,进而加重肺部受损,导致病情加重、疾病进展^[15]。王冉等^[16]通过研究血清标志物在 100 例 ARDS 患者疾病进展和预后中的预测价值,发现在众多血清标志物中,HMGB1 预测 ARDS 发生的灵敏度和特异度最高,其结论与本研究结果相似。

本研究结果显示,ARDS 患者的血清炎症因子及

NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度呈正相关,经 ROC 曲线分析证实,IL-8 ≥ 125.960 ng/L、CRP ≥ 17.049 mg/L、HMGB1 ≥ 30.439 μ g/L、NT-proBNP $\geq 3\,972.770$ ng/L 是预测 ARDS 患者死亡的最佳截断值,提示以上指标可用于判断 ARDS 病情严重程度和预后。IL-8 对细胞间黏附分子和中性粒细胞表面细胞因子受体的表达具有调节作用,通过促进细胞间的相互作用加重局部炎症反应,逐渐损伤肺泡毛细血管膜,既往研究中对血清 IL-8 水平的研究较多,部分动物实验及临床试验都显示该指标水平可反映肺组织的损伤程度,桑智慧等^[17]研究显示,患者血清和呼出气冷凝液中 IL-8 水平均随着 ARDS 患者病情加重而升高,此外,死亡患者 IL-8 水平明显较高。CRP 是一种急性期蛋白,主要由肝脏合成,因心脑血管事件、手术、创伤和感染等对机体造成损伤时,其表达水平可明显提高^[18]。NT-proBNP 因具备较好的稳定性、长半衰期和简单的检测方式,受到临床研究的广泛关注,研究显示,IL-8 和肿瘤坏死因子- α 等炎症因子可刺激脑钠肽(BNP)基因转录,导致 NT-proBNP 水平升高^[19]。

IL-8、CRP、HMGB1、NT-proBNP 水平与 ARDS 病情严重程度均呈正相关,此外 IL-8 ≥ 125.960 ng/L、CRP ≥ 17.049 mg/L、HMGB1 ≥ 30.439 μ g/L、NT-proBNP $\geq 3\,972.770$ ng/L 是预测 ARDS 患者死亡的最佳截断值,临床可将其用于判断 ARDS 的严重程度或预测预后。

参考文献

[1] GOLIGHER E C, TOMLINSON G, HAJAGE D, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome and posterior probability of mortality benefit in a post hoc bayesian analysis of a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2018, 320 (21): 2251-2259.

[2] PANZER A, LYNCH S, LANGELIER C, et al. Lung microbiota is related to smoking status and to development of acute respiratory distress syndrome in critically ill

- trauma patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 1 (197):621-631.
- [3] ABBAS M, PATEL B, CHEN Q, et al. Involvement of the bufadienolides in the detection and therapy of the acute respiratory distress syndrome[J]. *Lung*, 2017, 195 (3): 323-332.
- [4] MOHAMMED A, ALGHETAA H, ZHOU J, et al. Protective effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol against enterotoxin-induced acute respiratory distress syndrome is mediated by modulation of microbiota[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(22):5078-5095.
- [5] BOS L D, SCHOUTEN L R, VUGHT L V, et al. Identification and validation of distinct biological phenotypes in patients with acute respiratory distress syndrome by cluster analysis[J]. *Thorax*, 2017, 72(10):876-883.
- [6] GERARD L, BIDOUL T, CASTANARES-ZAPATERO D, et al. Open lung biopsy in nonresolving acute respiratory distress syndrome commonly identifies corticosteroid-sensitive pathologies, associated with better outcome [J]. *Crit Care Med*, 2018, 46(6):907-914.
- [7] RUBENFELD G, CALDWELL E, SLUTSKY A S, et al. Acute respiratory distress syndrome (ARDSs): the berlin definition[J]. *Polskie Archiwum Medycyny Wewntrznej*, 2012, 103(5/6):319-327.
- [8] 黄慧, 朱伟旺, 李伟坚. 小牛脾提取物注射液联合应用甲泼尼龙对 ARDS 患者炎性因子及治疗效果的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(3):198-201.
- [9] 张军艳, 石志红. 无创机械通气联合乌司他丁治疗 ARDS 患者疗效及安全性分析[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(9): 684-687.
- [10] KON Z N, BITTLE G J, PASRIJA C, et al. Venovenous versus venoarterial extracorporeal membrane oxygenation for adult patients with acute respiratory distress syndrome requiring precannulation hemodynamic support: a review of the ELSO registry[J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 104(2):645-649.
- [11] ZINTER M S, ORWOLL B E, SPICER A C, et al. Incorporating inflammation into mortality risk in pediatric acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 2017, 45(5):858-866.
- [12] THEN E, UHLENHOPP D, LOPEZ M, et al. S3214 acute respiratory distress syndrome (ARDS) and inflammatory bowel disease (IBD): a nationwide retrospective study[J]. *Am J Gastroenter*, 2020, 115(1):1684-1685.
- [13] SUCHANKOVA M, DURMANOVA V, TIBENSKA E, et al. High mobility group box 1 protein in bronchoalveolar lavage fluid and correlation with other inflammatory markers in pulmonary diseases [J]. *Sarcoidosis, Vasc Diffuse Lung Dis*, 2018, 35(3):268-275.
- [14] SABOUR S. Lung ultrasound compared to CT in patients with acute respiratory distress syndrome: methodological issue on diagnostic accuracy and agreement[J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(3):262-263.
- [15] SHEKAR K, MCAULEY D F, BRODIE D. Will not breathing on extracorporeal membrane oxygenation help one survive acute respiratory distress syndrome? [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(12):1901-1904.
- [16] 王冉, 张巧, 马千里, 等. 血清学生物标志物对急性呼吸窘迫综合征进展及预后的预测研究[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(19):1926-1932.
- [17] 桑智慧, 邢佳丽, 陈建荣. 急性呼吸窘迫综合征患者呼出气冷凝液和血清中 IL-8 检测的临床意义[J]. *临床急诊杂志*, 2017, 18(10):735-739.
- [18] 郑伟钢, 蒋文芳. C-反应蛋白与血清白蛋白比值预测感染性休克患者发生急性呼吸窘迫综合征的价值分析[J]. *解放军预防医学杂志*, 2019, 37(6):24-25.
- [19] GUILLAMAT-PRATS R, PUIG F, CAMPRUBÍ-RIMBLAS M, et al. Intratracheal instillation of alveolar type II cells enhances recovery from acute lung injury in rats [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2018, 37(6):782-791.

(收稿日期:2021-12-20 修回日期:2022-04-28)

分层递进模式在临床免疫学住院医师规范化培训中的应用与探索^{*}

张利改,吴 宇,裴 妤,唱 凯[△]

陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038

摘 要:检验医师规范化培训是医学生毕业后教育的重要组成部分,是培养合格检验医师的重要途径。然而,参加检验医学住院医师规范化培训的学员主要来自两种专业(临床专业和检验专业),其对检验的认知不同,临床能力不同,采用分层递进的培养模式才能达到培训目的。该文结合临床免疫学检验的特点,探讨了临床免疫学分层递进培养的一系列方案和措施,旨在为培养出能担任检验与临床之间沟通桥梁的合格检验医师提供参考。

关键词:临床免疫学; 规范化培训; 分层递进

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 18. 026

中图法分类号:G424. 1

文章编号:1673-4130(2022)18-2302-03

文献标志码:B

随着医疗模式向循证医学的转变以及精准医疗理念的提出,临床医师对检验的需求不断增加,既懂检验又懂临床的检验医师是临床迫切需求的。检验医学住院医师规范化培训(以下简称住培)是培养合格检验医师的重要途径^[1]。临床免疫学作为检验医学住培的一个亚专业,在多种疾病的诊疗过程中发挥着重要作用。临床免疫学检测方法复杂,项目多样,然而检验医学住培学员的来源不同,能力有差异,传统的教育模式不能满足培养高质量检验人才的需求。近年来提出的分层递进的教育模式充分考虑了这种差异,针对不同层次的学员设立不同的教学目标,安排不同的教学内容,不但可以使所有学员完成教学大纲要求的内容,还能让高水平的学员得到更高层次的培养^[2-3]。基于对分层递进模式的应用,结合临床免疫学检验的特点,本科室制订了一系列方案和措施,旨在提高临床免疫学的住培教学质量,培养出合格的检验医师。

1 依据教学大纲,制订分层轮转方案和培训目标

以往临床免疫学的培养模式不分学员级别和来源,学员均在免疫组一次性轮转 4 个月,统一安排固定的教学计划,无差异化地完成相同的培训内容。然而,由于检验医学住培学员的来源分为临床专业和检验专业,其对检验的认知不同,临床实践能力不同,如无差异化集中开展理论授课、技能培训,则不利于学员临床能力的培养和住培质量的提高^[4-5]。为实现住培学员的整体进步,实施分层递进的培训模式可以满足不同学员的需求。分层就是将住院医师按临床能力的差异分为不同层次,递进就是为不同水平的住院医师设置不同的“台阶”,让他们的能力得到循序渐

进、螺旋式的提升^[6-7]。临床免疫学分层轮转方案是根据学员的不同级别来制订的,二年级学员在免疫组的轮转时间定为 3 个月,培训目标是熟悉临床免疫学的工作流程、掌握所开设检验项目的检测原理及临床意义、掌握基本检验技能,具备独立分析常规检验报告的能力,并可以在带教老师的指导下与临床进行沟通;三年级的学员在免疫组的轮转时间为 1 个月,该阶段主要是通过参与查房和病例讨论,培养学员独立分析、解释异常检验报告的能力,学员可以单独参加会诊、疑难病例讨论等临床活动。同时,再根据学员的来源差异设置不同的培训目标:对于临床专业的学员,他们临床思维能力较强但对检验知识不够熟悉,对其培养的目标是学习基础检验知识和基本检验技能的同时,通过案例分析强化其临床思维能力;而对于检验专业的学员,则是在提升检验技能的同时,进行临床思维的锻炼。最终所有学员都能达到可以为临床诊疗提供建议和咨询,实现能独立参与临床沟通、会诊的培训目标,都能担负起检验医师的职责。

2 依据教学大纲,设计递进式教学内容

分层递进模式是一种承认并针对住院医师的个体差异,因材施教、差异化教学,使不同水平的住院医师都能在自身基础上实现合理成长的教学模式^[8-10]。依据教学大纲,将临床免疫学所涉及的理论和技能培训内容细化,并根据检测方法的复杂程度及所涉及专业知识的难易程度将内容进行分级:I 级为金标准法涉及检验项目的原理和操作技能的培训;II 级为以酶联免疫吸附试验、免疫印迹技术为基础的检验项目的原理和操作技能的培训;III 级为以化学发光和荧光免疫技术为基础的检验项目的原理和操作技能的培训;

^{*} 基金项目:重庆市技术创新与应用示范专项社会民生类重点研发项目(cstc2018jscx-mszdX0025)。

[△] 通信作者,E-mail:changkai0203@163.com。

Ⅳ级为以流式细胞技术和电泳技术为基础的检验项目的原理和操作技能的培训以及临床沟通能力的培养(表 1)。对于临床专业来源的学员,因其检验医学基础相对薄弱,需从难度等级为Ⅰ级的理论和技能培训内容开始逐级递进培训,同时他们具有一定的临床基础,可以通过报告审核过程中遇到的常见病、多发

病的病例分析,来进一步提升他们的临床思维和临床沟通能力。对于检验专业的学员,其临床免疫学的基础知识和检验技能已有一定的储备,教学的重点是检验项目的临床应用和Ⅲ级、Ⅳ级的培训内容,并通过和同级别的临床专业的学员组成学习小组,相互学习,促进临床思维模式的建立。

表 1 临床免疫学专业住培教学内容

理论培训内容	技能培训内容	难度等级
结核抗体的检测、心肌型脂肪酸结合蛋白的检测所涉及的理论知识	分析前质量控制:离心要求、检测时限,影响因素等,金标法检测的操作流程	Ⅰ级
丙型肝炎的检测、甲型肝炎的检测、幽门螺杆菌的分型、自身抗体谱、过敏原特异性 IgE 的检测等所涉及的理论知识	酶联免疫反应技术操作,全自动酶标仪的规范操作、日常维护与保养,全自动免疫印迹仪的规范操作、校准、日常维护与保养	Ⅱ级
肿瘤标志物、乙型肝炎标志物、甲状腺激素、垂体激素、性激素、心肌损伤标志物、骨质疏松标志物等的检测所涉及的理论知识	全自动化学发光免疫分析仪的使用维护和保养,免疫荧光标本制作,荧光显微镜的规范操作,室内质控、室间质评的方法与数据分析能力	Ⅲ级
血清 M 蛋白分型、轻链测定、淋巴细胞亚群的检测等所涉及的理论知识	流式细胞仪和电泳分析仪的规范操作、结果分析与判读、仪器维护与保养,室内质控、室间质评的方法与数据分析能力,参加临床会诊或沟通、参加免疫专业相关的疑难病例分析	Ⅳ级

3 教学方式的改变

传统的授课式教学方式以老师讲解 PPT 为主,学员被动接收,缺乏主动思考,容易造成学员的学习主动性不强,思维模式固化,动手能力欠佳^[11]。问题式教学法、案例式教学法、以团队为基础的教学法等^[12-14]教学方式相较于传统教学方式,可以提高学员的参与度,调动学员的积极性,有助于提高学习效率。将这些教学法与分层递进模式相结合,则培训效果可以得到进一步的提升^[15-18]。临床免疫学采用以学员为主体结合小组讨论的案例教学法开展教学,以临床上的典型病例作为教学病例,将要讨论病例的主要信息提供给学员,然后由学员通过电子病历查询系统查阅该病例的相关检验、检查结果和诊疗过程,将患者资料补充完整,并通过查阅资料、文献检索、请教老师等途径对病例进行分析讨论,提出自己的观点,再由带教老师进行重难点的解析及问题解答,最后对该病例所涉及的检验前、检验中、检验后的相关专业知

识,检验结果的临床应用等内容进行汇总。结合分层递进模式,根据学员的级别和来源不同调整分析病例的参与度,低年级的检验专业学员收集相关的病例资料进行文献检索,高年级的临床专业学员主要是发散临床思维,对收集的病例资料综合分析。学员通过分工合作、互相配合、讨论学习,不但加深了其对疾病诊疗思路的认识,也能激发学习兴趣和讨论热情,更能锻炼独立思考和解决问题以及团队协作的能力,可以更有效地提升学员的临床思维。

对于Ⅰ、Ⅱ级的技能培训,在带教老师的监督下实行“老带新”带教,由检验专业的学员带教临床专业

的学员,演练并讲解整个操作流程,带教老师适时补充。这个过程可以使检验专业的学员的检验技能得到锻炼和提升,而临床专业的学员则是因同学之间的相互学习,使得交流更加顺畅,从而加深对该项技能的理解。并且在教学过程中,由教学主任和教学组长以及各专业组长组成督导组对教学过程实施不定期的督导,针对带教老师的带教过程及学员的学习态度进行评价,并通过提问的方式了解学员掌握程度,指出存在问题、给出改进建议。通过这种方式,可以及时发现带教过程中存在的问题,并及时纠正、改进,进一步提高检验医师的胜任力,从而促进住培质量的提高。

4 建立分级题库,完善考核制度

4.1 理论题库 按照考核大纲的要求,建立理论考核题库,题库的分级主要是在表 1 的培训内容分级基础上再根据试题性质,如概念性、理解性、综合分析性等难易程度的不同进行分级。

4.2 技能题库 技能考核的题库也是根据大纲的要求,针对不同年级和来源的学员,按照表 1 中技能培训的等级,设置难易程度不等的考核试题,并将每一个操作步骤根据其复杂性和重要性进行赋分。

每结束一个阶段的培训,就进行一个阶段性的考核,通过考核结果,带教老师可以及时发现带教中的不足并及时了解学员的薄弱点,以便改进培训方法和补充教学内容,达到以考促教、以考促学的目的。

5 带教老师依据年资进行分级

从符合国家临床医师规范化培训相关要求的

工作人员中遴选教学经验丰富、专业技能扎实的老师组

成本专业组的教学队伍,并将带教老师根据年资进行分级,低年资的带教老师主要负责Ⅰ级和Ⅱ级的理论和技能培训,高年资、有丰富临床经验的带教老师负责Ⅲ级、Ⅳ级的带教工作以及临床思维能力的培养,这样更有利于高年级的学员得到更优的师资资源,确保所有学员能力、水平得到提升。同时,带教老师也要定期参加国家和省部级组织的规范化培训师资培训班,或是到规培教育体系较为成熟的医院学习新的教学方法,吸取各地专家的教学经验,提高带教老师自身的教学水平,并不定期参与与专业技能相关的培训,提高老师的专业技能,从而更好地完成教学目标。

6 小 结

培养合格的检验医师需要切实有效的教育模式来保证教学质量。临床免疫学具有复杂性和多样性的特点,对于岗位胜任力不同的住培学员,分层递进培养模式使得所有学员在完成住培大纲相关培训要求的同时自身能力也得到提升。在今后的培训工作中,临床免疫学亚专业组将持续改进,不断积累和总结经验,完善培训体系,使住培结业时所有学员能够在检验项目的选择、检验标本的正确采集、检验结果的解读及疑难病例分析中为临床提供服务^[19],成为能为临床疾病的诊疗提供帮助的合格检验医师。

参考文献

[1] 姜连生,吴洪坤,王洪泓,等. 检验医师规范化培训临床教学设置及现状思考[J]. 检验医学与临床,2021,18(23): 3493-3495.

[2] 侯鑫,唐天友,章龙珍,等. 分层教学在放疗科住院医师规范化培训中的应用[J]. 继续医学教育,2021,35(9): 23-24.

[3] 姜晓莹,陈予宁,冯雪颖,等. 胜任力为导向的住院医师分层递进式培训模式研究[J]. 中国高等医学教育,2020,34(1):14-15.

[4] 许丽莉,姜林娣,陈世耀,等. 分层次课程设置在内科住院医师规范化培训中的应用[J]. 中国毕业后医学教育,2018,2(3):173-175.

[5] 田仰华,赵允伍,李泉,等. 不同身份来源住院医师规范化培训有效性探析与优化研究[J]. 皖西学院学报,2019,35(3):47-50.

[6] RYAN S W ,ANDREW J B,COLETTE T O H,et al. A multicenter prospective comparison of the accreditation council for graduate medical education milestones:clinical competency committee vs. resident self-assessment[J]. J

Surg Edu,2017,74(6):8-14.

[7] SANDHU G,MAGAS C P,ROBINSON A B,et al. Progressive entrustment to achieve resident autonomy in the operating room:a national qualitative study with general surgery faculty and residents[J]. Annal Surg,2017,265(6):1134-1140.

[8] 柯冀,张立军,马山,等. 分层递进式微创外科技能培训在外科住院医师规范化培训中的应用实践[J]. 中国毕业后医学教育,2020,4(5):457-461.

[9] 邓晶,粟翠英,俞飞虹,等. 超声医学科不同专业住院医师规范化分层培训的体会[J]. 教育教学论坛,2018,10(49):79-80.

[10] 王莉,田李芳,高法,等. 分层分段式教学在住院医师规范化培训中的探索与实践[J]. 医学教育研究与实践,2018,26(4):704-707.

[11] 战京燕,姜景秋,王少坤,等. 我国全科住院医师规范化培训教学模式及应用效果研究[J]. 中国全科医学,2021,24(19):2401-2407.

[12] 张钰,余更生,韦红,等. 基于 CTU 模式的临床教学查房在儿科住院医师规范化培训中的应用[J]. 中华医学教育探索杂志,2017,16(12):1270-1273.

[13] 张明,唐子. 微信结合 CBL 及 TBL 教学法在急诊住院医师培训中的应用[J]. 中华急诊医学杂志,2019,28(2): 264-267.

[14] 胡凯峰,许力,夏亚斌,等. CBL 联合 PBL 教学法在普外科住院医师规范化培训中的应用[J]. 中华全科医学,2020,18(5):849-851.

[15] 王玲洁,张凝,吴立群,等. 分层递进式 CBL 教学法的教学效果分析[J]. 诊断学理论与实践,2020,19(6):638-642.

[16] HICKS P J,MARGOLIS M J,CARRACCIO C L,et al. A novel workplace-based assessment for competency-based decisions and learner feedback[J]. Med Teach,2018,40(11):1-8.

[17] 袁贤凤,刘卫华,邓兰,等. 以立项形式开展分层递进院级专项教改课题对提高住院医师规范化培训质量的作用研究[J]. 中国毕业后医学教育,2022,6(1):65-69.

[18] 高昉,陈燕,姜雪峰,等. 分层递进式情景模拟教学在内科专业住院医师规范化培训中的探讨与实践[J]. 中国毕业后医学教育,2021,5(5):426-430.

[19] 黎四维,郑芳,涂建成,等. 医学检验专业住院医师规范化培训的实践与思考[J]. 中国毕业后医学教育,2021,5(1):19-21.