

• 述评 •

从 Protect-AF 研究看左心耳封堵术的未来

潘文志 周达新 葛均波



作者简介:周达新,主任医师。现任上海市心血管病研究所先天性心脏病介入治疗和肺动脉高压组负责人,上海市药学会临床药物治疗专业委员会副主任委员,中华医学会心血管分会结构学组副组长。是国内最先开展先天性心脏病室间隔缺损介入治疗的少数专家之一,在先天性心脏病房间隔缺损、动脉导管未闭特别是大房间隔缺损的介入治疗领域处于中国领先地位。率先在中国开展经导管主动脉瓣植入术、经皮肺动脉瓣植入术、经导管二尖瓣修复术和经导管瓣周漏封堵术等新技术。

左心耳封堵术(left atrial appendage occlusion, LAAO)是近年来发展的通过微创导管术封堵左心耳以达到预防心房颤动患者发生血栓栓塞的新技术。Protect-AF(Watchman left atrial appendage system for embolic protection in patients with atrial fibrillation)研究^[1-4]是关于 LAAO 的第 1 个随机对照临床试验,本述评在分析该研究的基础上对 LAAO 的未来进行展望。

1 LAAO 的理论基础

心房颤动是临床上最常见的持续性心律失常,普通人群中心房颤动发病率为 0.5%~1.3%,随年龄增长,其发病率逐渐升高,年龄每增加 10 岁,心房颤动发病率约增加 1 倍,年龄≥80 岁人群的心房颤动发病率>10%^[5]。在中国,心房颤动患病率约为 0.61%,目前约有 1 000 万例心房颤动患者。心房颤动最主要的危害是导致心脏内血栓形成,血栓脱落后可导致脑卒中、脏器栓塞和外周血管栓塞等并发症。其中,脑卒中为心房颤动最常见和危害最大的并发症,非瓣膜性心房颤动患者发生脑卒中的风险是普通人群的 6 倍,临床上 1/5 的脑卒中是由心房颤动造成的。心房颤动导致脑卒中发生的风险随患者年龄的增加而增加,50~59 岁的心房颤动患者脑卒中发生风险为每年 1.5%,而 80~89 岁的心房颤动患者脑卒中发生风险达每年 23.5%^[6]。心房颤动患者脑卒中的临床特点是起病急骤(数十分

钟内可出现明显症状)且病情严重(致死率、致残率均>50%)。总之,心房颤动导致的脑卒中具有高龄、高发病率、高复发率和高死残率等 4 个特点,故预防心房颤动性脑卒中一直是临床上重要的课题。

目前,心房颤动性脑卒中的预防主要是口服华法林钠,规范化的华法林钠抗凝治疗可使心房颤动患者发生脑卒中的风险降低 2/3,而口服阿司匹林已被认为效果不佳。但长期口服华法林钠存在诸多问题:华法林钠在预防血栓的同时可造成出血并发症,华法林钠的作用受到许多食物、药物的影响,服用华法林钠需要患者频繁地到医院监测凝血功能。目前,心房颤动患者口服华法林钠的比例普遍较低,在中国更是低于 10%。能坚持长期服用华法林钠的患者比例很低,每年约有 30% 的患者因为各种原因不能继续华法林钠治疗^[6]。由于老年患者本身存在较高的出血风险,且往往不能定期到医院监测凝血指标,故其口服华法林钠的耐受性、依从性很低。然而,这些患者恰是发生脑卒中的高危人群,LAAO 为这些患者提供了新希望^[7]。

左心耳是从左心房伸出的耳状小囊,是左心房的一部分,是人类进化过程中遗留下的产物。在胚胎发育过程中,原始左心房变成左心耳,而原始左右肺静脉被并入左心房成为左心房的主要组成部分。左心耳的形态变化很大,大多呈狭长弯曲的腔室,有一狭窄的尖顶部,边缘有多个深陷的切迹使其呈分叶状,内有丰富的梳状肌和肌小梁,凹凸不平,易形成血栓。70% 的左心耳主轴明显弯曲或呈螺旋状,80% 具有多个分叶。左心耳的长度为 16~51 mm,开口最小直径为 5~27 mm,

最大直径为 10~40 mm。近期,有学者基于 CT 扫描将左心耳形态分为鸡翅形、仙人掌形、风向袋形和菜花形 4 种,以鸡翅形占多数(48%)。左心耳的形态与脑卒中的发生密切相关,鸡翅形者较少发生脑卒中^[8]。健康人在窦性心律下,左心耳因具有正常收缩能力而很少形成血栓。心房颤动时,左心耳明显增大,且失去有效的规律收缩,导致血液在左心耳淤积,易形成血栓。有临床研究^[9]结果显示,非瓣膜性心房颤动患者中,90%以上血栓的形成与左心耳有关。鉴于左心耳在心房颤动患者血栓形成中的重要地位,近年来针对左心耳的 LAAO 或外科手术治疗作为预防心房颤动患者发生脑卒中和血栓栓塞的手段受到关注。其中,LAAO 因为伤口小、无需开胸和体外循环,被认为更具临床应用前景。其技术原理是通过穿刺股静脉,沿着静脉入路将压缩的封堵装置依次送至右心房、房间隔、左心房,最后到达左心耳处,打开封堵器闭合左心耳。

2 LAAO 的发展历史

早在 20 世纪 20—30 年代,人们就注意到左心耳处易形成血栓。1952 年 Bailey 等^[10]发现,二尖瓣狭窄患者在行外科分离手术的同时结扎左心耳可明显减少栓塞的发生。1955 年,Belcher 等^[11]再次证实该结果。此后,外科发展了多种左心耳干预方法,包括结扎、缝合、钉合、切除、左心耳夹闭合和胸腔镜下左心耳闭合术等。大量研究证实,左心耳干预可降低高危患者栓塞事件发生率。美国心脏病学院/美国心脏协会/欧洲心脏病学会(ACC/AHA/ESC)在 2006 年心房颤动治疗指南中明确指出,左心耳的切除或者结扎能从根本上降低心房颤动患者血栓栓塞发生率。在外科手术时,对存在高危栓塞风险的患者行左心耳干预以减少术后心源性栓塞事件发生的方法已被许多心外科医师采用。然而外科左心耳结扎、简单荷包缝合和钉合完全闭塞的成功率较低,常存在残余漏。左心耳闭塞不完全,存在血栓栓塞风险,血栓形成和栓塞事件发生率较高。此外,外科左心耳干预术的创伤大,手术风险高,并发症发生率较高,一般只应用于因其他问题行心脏手术时同期切除左心耳,除了采用胸腔镜下左心耳闭合术几乎无医师单纯为了预防脑卒中而对心房颤动患者行左心耳干预术。

Nakai 等^[12]通过动物实验证实,LAAO 简单

易行,可完全闭塞左心耳,术后随访 2 d 至 6 个月堵闭器无移位、变形,表面无血栓形成,封堵左心耳后左心房血流动力学无明显变化。组织病理学检查结果显示,术后 1 个月左心房侧堵闭器表面内皮覆盖率为 90%,术后 3 个月为 100%。LAAO 最早于 2001 年 8 月应用于临床。最早使用的是 PLAATO 系统(普利第斯明尼苏达阿普利瓦医疗),主要入选对象为有华法林钠抗凝禁忌证的脑卒中高危心房颤动患者。2002 年,Sievert 等^[13]首次报道应用 PLAATO 封堵器预防心房颤动患者发生血栓栓塞事件的可行性。此后,Watchman 封堵装置、Amplatzer Cardiac Plug 装置、LARIAT 和其他新型装置被发明。一系列的研究相继展开,包括 ASAP(ASA plavix feasibility study with Watchman left atrial appendage closure technology)^[14]、PREVAIL(Watchman left atrial appendage closure device in patients with atrial fibrillation versus long-term warfarin therapy)^[15]、CAP(continued access protocol registry of patients undergoing watchman implantation)^[16]、Protect-AF 研究^[1-4]等。其中,Protect-AF 研究为第 1 个针对 LAAO 的随机对照临床试验,最具代表性。

3 Protect-AF 研究简介

Protect-AF 研究与既往研究最大的区别:首先,既往研究都是非对照研究,Protect-AF 研究是对比 LAAO 与华法林钠治疗的随机对照研究;其次,既往研究的入选对象为有抗凝禁忌证或者是抗凝风险高的患者,Protect-AF 研究的入选对象为可以耐受抗凝治疗的普通患者。Protect-AF 研究由 Mayo 医学中心牵头,研究时间为 2005—2008 年,研究结果发表于 2009 年的 *Lancet* 上^[1]。共入选美国和欧洲的 59 个研究中的 707 例心房颤动患者[CHADS₂ 评分(C 代表心力衰竭,H 代表高血压,A 代表年龄>75 岁,D 代表糖尿病,S₂ 代表卒中)>1 分],以 2:1 方式分配到 LAAO 组(使用 Watchman 器)和华法林钠组(口服华法林钠)。首要有效终点为脑卒中、心血管死亡或体循环栓塞的复合终点,首要安全性终点为大出血、心包积液和器械栓塞。结果显示,LAAO 组在有效终点方面不逊于华法林钠组(3.0/100 人年比 4.9/100 人年),但安全性终点发生率较高(7.4/100

人年比 4.4/100 人年)。LAAO 组的手术并发症发生率较高(心包积液为 4.8%,装置栓塞为 0.6%,大出血为 3.5%,操作相关卒中为 1.1%),而华法林钠组大出血(4.1%)和颅内出血发生率(2.5%)较高。提示,LAAO 在有效性上令人满意,但仍有手术并发症发生。

与所有的介入技术一样,LAAO 也有学习曲线,随着术者操作经验的积累和器械不断被改进,手术并发症必然会减少。Protect-AF 研究的后续注册研究也证实了该观点^[16]。该研究纳入 Protect-AF 研究中接受 LAAO 的患者(542 例)和后续接受 Watchman 装置置入的非随机注册患者(CAP 注册研究,460 例)。LAAO 组患者术中静脉注射肝素,使活化凝血时间(ACT)维持于 250~300 s,术后予口服华法林钠抗凝治疗 45 d,然后予口服阿司匹林、氯吡格雷双联抗血小板治疗至术后 6 个月,之后终身口服阿司匹林。安全性终点包括出血和手术相关事件(心包积液、脑卒中、装置栓塞)。Protect-AF 研究的安全性终点事件发生率为 7.7%,显著高于 CAP 注册研究的 3.7%($P=0.007$)。Protect-AF 研究前一半病例、后一半病例和 CAP 注册研究的安全性终点事件发生率分别为 10.0%、5.5%和 3.7%,差异有统计学意义($P=0.006$)。置入 7 d 内,Protect-AF 研究的严重心包积液发生率为 5.0%,占有所有安全性事件的 50%以上,显著高于 CAP 注册研究的 2.2%($P=0.019$)。Protect-AF 研究的手术相关卒中发生率为 0.9%,显著高于 CAP 注册研究的 0($P=0.039$)。这些数据显示,随着术者操作经验的积累,LAAO 的安全性明显提高。

Protect-AF 研究^[3]的长期随访和进一步分析结果显示,患者平均随访时间为(2.3±1.1)年,469 例患者(66.3%)至少完成了 2 年观察。意向性治疗原则(ITT)分析结果显示,LAAO 组和华法林钠组的首要有效终点(卒中、系统性栓塞和心源性死亡)发生率分别为 3.0%、4.3%,符合非劣性检验标准(>0.99);LAAO 组的主要安全性终点发生率为 5.5%,显著高于华法林钠组的 3.6%($OR=1.53$)。但符合方案集(PP)分析结果显示(剔除 69 例放弃手术者和 41 例器械植入失败患者),LAAO 组首要有效终点发生率为 2.5%,低于华法林钠组的 4.3%。由于 LAAO 组患者术后先要口服华法林钠 45 d 和进行双联抗血小板治疗 5 个月,研究者进一步分析了停药后两组有效终点的区别。结果显示,即使在停用华法林钠后,

LAAO 组首要有效终点发生率为 2.3%,仍低于华法林钠组的 4.1%;在停用双联抗血小板治疗后,LAAO 组的首要有效终点发生率为 2.3%,也是低于华法林钠组的 4.1%。该结果首次证实,LAAO 预防栓塞的有效性优于华法林钠。亚组分析结果还显示,对于有脑卒中或短暂脑缺血发作(TIA)患者,无论是采用 ITT 分析还是 PP 分析,LAAO 预防栓塞的有效率显著优于口服华法林钠(8.2%比 5.3%)。

4 LAAO 的展望

从适应证范围而言,LAAO 的适应证将来可能会拓宽,LAAO 的适合人群数量可能会大大增加。目前,LAAO 比较公认的适应证为有抗凝禁忌证或者抗凝风险高(出血风险高)的慢性心房颤动患者:① 心房颤动发生时间 >3 个月,持续性心房颤动,或长期持续性和永久性心房颤动患者(非风湿性瓣膜病所致);② 心房颤动卒中风险评分(CHADS₂ 评分) ≥ 2 分;③ 有华法林钠应用禁忌证或无法长期口服华法林钠,或者抗凝出血风险评分(HAS-BLED 评分) ≥ 3 分。2012,ESC/AHA/ACC 心房颤动管理指南^[17]提出,对于不能长期接受任何一种口服抗凝药治疗的血栓风险患者,可行经导管 LAAO(证据为 IIb, B)。然而,这些标准是建立在过去 LAAO 技术相对不成熟时所做研究的基础上。目前,LAAO 的技术已较前改进,Protect-AF 的后续研究结果也显示,相关并发症发生率已下降。此外,Protect-AF 研究进一步分析结果显示,LAAO 的效果可能优于口服华法林钠治疗,特别是对于已发生卒中者。提示,随着 LAAO 技术的提高和研究证据的积累,LAAO 也可能成为可耐受抗凝或出血风险不高的普通心房颤动患者的治疗手段。虽然左心耳有一定收缩和内分泌功能,有些学者担心封堵左心耳会产生一些不良反应,但是本课题组认为,心房颤动时左心耳功能已基本丧失,封堵左心耳对人体的影响可能较小,目前研究也未发现封堵左心耳的相关不良反应。封堵左心耳对心房颤动患者的长期影响尚需进一步研究。

从器械研发看,新型的器械将使 LAAO 更加安全、有效。目前上市的 LAAO 装置有 Watchman、ACP、PLAATO 等。有许多新型的 LAAO 装置正在研发中。先健科技(Lifetech)的 Lambre 封堵装置已在中国完成近 100 例的临床试验,初步结果令人满意,预计 2016 年上市。新

型的器械(如 Lambre)较原有的器械将有明显改进,在设计方面具有可回收、完全覆盖率高(残余分流少)、适应各种左心耳形态、器械柔软不易损伤心脏等优点,故安全性和有效性更高。

目前,心房颤动性脑卒中的药物预防主要依靠口服华法林钠,但长期口服华法林钠存在诸多问题。而一些新型的抗凝药物价格高,疗效并非完美,且不可避免出血并发症发生。近 10 多年来,心房颤动的射频消融治疗被广泛接受,但成功率不高(阵发性心房颤动约 80%,慢性、永久性心房颤动约 50%),有些患者需要反复多次进行射频消融,心房颤动消融成功率在短期内很难再有突破。预计在不久将来,阵发性心房颤动可能仍首选射频消融,而 LAAO 则有可能成为慢性心房颤动患者可选择的常规治疗手段。

参 考 文 献

- [1] HOLMES D R, REDDY V Y, TURI Z G, et al. Percutaneous closure of the left atrial appendage versus warfarin therapy for prevention of stroke in patients with atrial fibrillation: a randomised non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2009, 374(9689): 534-542.
- [2] REDDY V Y, HOLMES D, DOSHI S K, et al. Safety of percutaneous left atrial appendage closure: results from the Watchman Left Atrial Appendage System for Embolic Protection in Patients with AF (Protect-AF) clinical trial and the Continued Access Registry[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): 417-424.
- [3] REDDY V Y, DOSHI S K, SIEVERT H, et al. Percutaneous left atrial appendage closure for stroke prophylaxis in patients with atrial fibrillation: 2.3 year follow-up of the Protect-AF (Watchman left atrial appendage system for embolic protection in patients with atrial fibrillation) Trial[J]. *Circulation*, 2013, 127(6): 720-729.
- [4] ALLI O, DOSHI S, KAR S, et al. Quality of life assessment in the randomized Protect-AF (Percutaneous Closure of the left atrial appendage versus warfarin therapy for prevention of stroke in patients with atrial fibrillation) trial of patients at risk for stroke with nonvalvular atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(17): 1790-1798.
- [5] 黄从新, 张 澍, 马长生, 等. 心房颤动:目前的认识和治疗建议——2012[J]. *中华心律失常学杂志*, 2012, 16(4): 246-289.
- [6] 马长生. 心房颤动 2009 年进展回顾[J]. *上海医学*, 2010, 33(5): 397-399.
- [7] DIBIASE L, SANTANGELI P, ANSELMINO M, et al. Does the left atrial appendage morphology correlate with the risk of stroke in patients with atrial fibrillation? Results from a multicenter study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(6): 531-538.
- [8] AL-SAADY N M, OBEL O A, CAMM A J. Left atrial appendage: structure, function, and role in thromboembolism[J]. *Heart*, 1999, 82(5): 547-554.
- [9] BLACKSHEAR J L, ODELL J A. Appendage obliteration to reduce stroke in cardiac surgical patients with atrial fibrillation[J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 61(2): 755-759.
- [10] BAILEY C P, OLSEN A K, KEOWN K K, et al. Commissurotomy for mitral stenosis: technique for prevention of cerebral complications[J]. *J Am Med Assoc*, 1952, 149(12): 1085-1091.
- [11] BELCHER J R, SOMERVILLE W. Systemic embolism and left auricular thrombosis in relation to mitral valvotomy[J]. *Br Med J*, 1955, 2(4946): 1000-1003.
- [12] NAKAI T, LESH M D, GERSTENFELD E P, et al. Percutaneous left atrial appendage occlusion (PLAATO) for preventing cardioembolism: first experience in canine model[J]. *Circulation*, 2002, 105(18): 2217-2222.
- [13] SIEVERT H, LESH M D, TREPELS T, et al. Percutaneous left atrial appendage transcatheter occlusion to prevent stroke in high-risk patients with atrial fibrillation: early clinical experience[J]. *Circulation*, 2002, 105(16): 1887-1889.
- [14] REDDY V Y, MÖBIUS-WINKLER S, MILLER M A, et al. Left atrial appendage closure with the Watchman device in patients with a contraindication for oral anticoagulation: the ASAP study (ASA plavix feasibility study with Watchman left atrial appendage closure technology)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(25): 2551-2556.
- [15] HOLMES D R Jr, KAR S, PRICE M J, et al. Prospective randomized evaluation of the Watchman left atrial appendage Closure device in patients with atrial fibrillation versus long-term warfarin therapy: the PREVAIL trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(1): 1-12.
- [16] REDDY V Y, HOLMES D, DOSHI S K, et al. Safety of percutaneous left atrial appendage closure: results from the Watchman left atrial appendage system for embolic protection in patients with AF (Protect-AF) clinical trial and the continued access registry[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): 417-424.
- [17] CALKINS H, KUCK K H, CAPPATO R, et al. 2012 HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: recommendations for patient selection, procedural techniques, patient management and follow-up, definitions, endpoints, and research trial design[J]. *Heart Rhythm*, 2012, 9(4): 632-696. e21.

(收稿日期:2014-03-31)

(本文编辑:王小燕)

晚期糖基化终产物修饰的低密度脂蛋白下调 小鼠骨髓来源肥大细胞白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 释放

黄 晓 赵馨娜 梁 春 吴宗贵

【摘要】 目的 观察晚期糖基化终产物(AGE)修饰的低密度脂蛋白(LDL, AGE-LDL)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠骨髓来源肥大细胞(mBMMCs)释放 IL-6 和 TNF- α 的影响,并探讨血红素加氧酶(HO)-1 对 mBMMCs 释放 IL-6 和 TNF- α 的影响。**方法** 从 C57BL/6 小鼠骨髓分离、培养 mBMMCs,经鉴定后,以 2×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板中,分别加入不含糖的反应液孵育 LDL(n-LDL) 50 $\mu\text{g/mL}$ (n-LDL 组)、AGE-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ (AGE-LDL 组)、LPS 100 ng/mL(LPS 组)、LPS 100 ng/mL+n-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ (LPS+n-LDL 组)、LPS 100 ng/mL+AGE-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ (LPS+AGE-LDL 组)、LPS 100 ng/mL+锌原卟啉(Znpp) 10 $\mu\text{mol/L}$ (LPS+Znpp 组)、LPS 100 ng/mL+n-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ +Znpp 10 $\mu\text{mol/L}$ (LPS+n-LDL+Znpp 组)、LPS 100 ng/mL+AGE-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ +Znpp 10 $\mu\text{mol/L}$ (LPS+AGE-LDL+Znpp 组),调节培养基终体积为 1 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 90 min。采用 ELISA 法检测 IL-6 和 TNF- α 水平,RT-PCR 检测 mBMMCs HO-1 mRNA 表达水平,Western 印迹法检测抗小鼠丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化 P38(p-P38)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)1/2 和 NF- κB 磷酸化 P65(p-P65)蛋白表达水平。**结果** LPS+AGE-LDL 组的 IL-6 水平显著低于 LPS 组和 LPS+n-LDL 组(P 值均 <0.01),TNF- α 水平显著低于 LPS 组($P<0.05$)。LPS+AGE-LDL+Znpp 组的 IL-6 和 TNF- α 表达水平均高于 LPS+AGE-LDL 组(P 值均 <0.01)。AGE-LDL 组的 HO-1 mRNA 相对表达量为 2.404 ± 0.576 ,显著高于 n-LDL 组的 1($P<0.05$)。AGE-LDL 组的 p-P38、p-ERK2 和 p-P65 蛋白表达率均显著高于对照组(P 值分别 <0.01 、 0.05),LPS 组与 LPS+AGE-LDL 组间的差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。**结论** AGE-LDL 可下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6 和 TNF- α 水平,此下调可能通过升高 HO-1 表达而起作用。AGE-LDL 可激活 MAPK P38、ERK 和 NF- κB 信号通路。AGE-LDL 可能通过 MAPK 下游通路影响 HO-1 的表达,进而下调炎症细胞因子表达水平。

【关键词】 晚期糖基化终产物;低密度脂蛋白;肥大细胞;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- α

Advanced glycation end products modified low density lipoprotein can down-regulate lipopolysaccharides-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor- α release in murine bone marrow derived mast cells HUANG Xiao, ZHAO Xinna, LIANG Chun, WU Zonggui. Department of Cardiology, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200433, China

Corresponding author: WU Zonggui

【Abstract】 Objective To investigate the effect of advanced glycation end product modified low density lipoprotein (AGE-LDL) on lipopolysaccharides (LPS)-induced interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) release by murine bone marrow derived mast cells (mBMMCs), and to explore the effect of heme oxygenase 1 (HO-1) on IL-6 and TNF- α . **Methods** mBMMCs were isolated from C57BL/6 murine bone marrow. The cells were cultured with 50 $\mu\text{g/mL}$ n-LDL (n-LDL group), 50 $\mu\text{g/mL}$ AGE-LDL (AGE-LDL group), 100 ng/mL LPS (LPS group), 100 ng/mL LPS plus 50 $\mu\text{g/mL}$ n-LDL (LPS+n-LDL group), 100 ng/mL LPS plus 50 $\mu\text{g/mL}$ AGE-LDL (LPS+AGE-LDL group), 100 ng/mL LPS plus 10 $\mu\text{mol/L}$ zinc protoporphyrin (LPS+Znpp group),

100 ng/mL LPS plus 50 μ g/mL n-LDL and 10 μ mol/L zinc protoporphyrin (LPS + n-LDL + Znpp group), 100 ng/mL LPS plus 50 μ g/mL AGE-LDL and 10 μ mol/L zinc protoporphyrin (LPS + AGE-LDL + Znpp group) at 2×10^6 on per well in 12 wells under 37 $^{\circ}$ C for 90 min, respectively. Levels of IL-6 and TNF- α in supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HO-1 mRNA expression was measured by real time polymerase chain reaction (PCR). Mitogen activated protein kinase (MAPK) p-P38, phosphorylation of extracellular signal regulated protein kinase (p-ERK) 1/2 and nuclear factor (NF) κ B p-P65 protein expression were measured by Western blot. **Results** IL-6 level in LPS + AGE-LDL group was significantly lower than those in LPS group and LPS + n-LDL group (both $P < 0.01$). TNF- α in LPS + AGE-LDL group was significantly lower than that in LPS group ($P < 0.05$). IL-6 and TNF- α levels in LPS + AGE-LDL + Znpp group were significantly higher than those in LPS + AGE-LDL group (all $P < 0.01$). HO-1 mRNA expression in AGE-LDL group was significantly higher than that in n-LDL group ($[2.404 \pm 0.576]$ vs. 1, $P < 0.05$). MAPK p-P38, p-ERK1/2 and NF- κ B p-P65 protein expression in AGE-LDL group were also significantly higher than those in n-LDL group ($P < 0.01$ or 0.05). But there were no significant differences in MAPK p-P38, p-ERK1/2 and NF- κ B p-P65 protein levels between LPS group and LPS + AGE-LDL group (all $P > 0.05$). **Conclusion** AGE-LDL can downregulate LPS-induced IL-6 and TNF- α release in mBMMCs, which may result from the up-regulation of HO-1. AGE-LDL can affect down-stream signaling of MAPK pathway, which up-regulates HO-1 expression and down-regulates the expression of inflammatory cytokines. (Shanghai Med J, 2015, 38: 5-9)

【Key words】 Advanced glycation end products; Low density lipoprotein; Mast cell; Interleukin-6; Tumor necrosis factor- α

低密度脂蛋白(LDL)在斑块处聚积与动脉粥样硬化(AS)的发生、发展密切相关。长期持续的高糖血症可使体内的 LDL 发生非酶化反应,最终形成晚期糖基化终产物(AGE)修饰的 LDL (AGE-LDL)^[1-2]。有研究^[3]结果显示,糖尿病患者的 AGE-LDL 水平明显升高。AGE-LDL 可诱导脐静脉内皮细胞凋亡^[4],降低血管活性物质一氧化氮(NO)的合成,调节血管细胞黏附分子(VCAM)-1 和巨噬细胞清道夫受体表达,减少 LDL 转运^[5],促进血小板聚集^[1],进而促进 AS 的形成与发展。肥大细胞是一类多效潜能细胞,通过介导免疫反应,参于多种疾病的发生和发展。人类肥大细胞可通过脱颗粒作用释放蛋白水解酶、组胺、细胞因子、生长因子和血管活性物质^[6]。有研究^[7-8]结果显示,AS 损伤的不同阶段均有肥大细胞聚集,并与损伤程度相关。激活的肥大细胞可以脱颗粒释放细胞内活性物质(如组胺、糜酶、类胰酶等),亦可释放多种炎性细胞因子。Min 等^[9]的研究结果显示,氧化 LDL(ox-LDL)可通过抑制 NF- κ B 进而抑制巨噬细胞分泌炎性细胞因子。然而 AGE-LDL 是否影响肥大细胞炎性细胞因子释放目前尚不明确。血红素加氧酶(HO)-1 是调节细胞内活性氧(ROS)水平的重要抗氧化酶。HO-1 可分解血红素生成胆绿素,进而生成胆红素,并具有抗炎性反应和抗凋亡的功能。HO-1

已被发现在 AS 斑块处高表达^[10],过表达的 HO-1 可抑制载脂蛋白(Apo)E 敲除小鼠 AS 病变的进展^[11]。AGE 修饰的白蛋白可诱导内皮细胞 HO-1 表达水平升高^[12],ox-LDL 可诱导巨噬细胞 HO-1 表达水平升高^[9]。AGE-LDL 能否诱导肥大细胞 HO-1 表达及其对肥大细胞炎性反应的影响尚未见报道。本研究旨在探讨 AGE-LDL 对脂多糖(LPS)介导的小鼠骨髓来源肥大细胞(mBMMCs) HO-1 表达、炎性细胞因子释放的影响及其相关机制。

1 方 法

1.1 实验动物 4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠均购自第二军医大学动物实验中心。

1.2 实验试剂 RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司),FBS(美国 GIBCO 公司),小鼠 IL-6 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒(北京达科为有限公司),青霉素-链霉素溶液(美国 MP 公司),重组小鼠 IL-3 和重组小鼠干细胞因子(SCF, PeproTech 公司),PBS、FITC 标记的抗小鼠 CD117(c-Kit)单克隆抗体和藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 Fc ϵ RI α 单克隆抗体(Biolegend 公司),流式缓冲液(Miltenyi Biotec 公司)。抗小鼠磷酸化 P65(p-P65)抗体、抗小鼠丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化 P38(p-P38)抗体、抗小鼠 MAPK 磷酸化细胞外调

节蛋白激酶(ERK)1/2(p-ERK1/2)抗体和抗小鼠 GAPDH 抗体(美国 Santa cruz 公司)。总蛋白提取细胞裂解缓冲液(RIPA 裂解液)、一抗稀释液、二抗稀释液和湿法转膜液均购自碧云天生物技术研究。TRIzol 试剂、反转录试剂盒、SYBR green 荧光定量试剂均购自 Takara 公司。锌原卟啉(Znpp)购自美国 MP 公司。

1.3 LDL 分离和纯化、AGE-LDL 制备 取健康人血清超速离心后得到 LDL,检测其蛋白浓度。经充分透析后,用含 EDTA 和蔗糖的高糖反应液在 37 ℃温度下孵育 14 d,以不含糖的反应液孵育 LDL 作为 n-LDL 进行对照。充分透析后经荧光检测 LDL 糖化程度。经 0.22 μm 无菌滤器过滤后加入保存液,置于-80 ℃长期保存备用。

1.4 mBMMCs 细胞分离与培养 4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,断颈处死,取双侧股骨和胫腓骨,以 2 mL 注射器取 RPMI 1640 培养基,将骨髓内细胞冲出,经过滤离心后,加入含 1%青霉素-链霉素、10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中,加入终质量浓度为 20 ng/mL 的 IL-3,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,每隔 3 d 行半量换液,于第 21 天加入终质量浓度为 40 ng/mL 的 SCF。培养 28 d 后行细胞鉴定。用 PE 标记的抗小鼠 FcεRIα 单克隆抗体和 FITC 标记的抗小鼠 CD117 单克隆抗体在 4 ℃孵育 30 min 后,以流式缓冲液洗涤 2 次,最后用 200 μL 流式缓冲液重悬后上机检测细胞表型,行肥大细胞鉴定。以 FcεRIα 和 CD117 表型均 > 90%为阳性。

1.5 ELISA 法检测 IL-6、TNF-α 表达 洗涤后的细胞重悬,等分成 200 μL/份,以 2×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板。分别加入 n-LDL 50 μg/mL (n-LDL 组)、AGE-LDL 50 μg/mL (AGE-LDL 组)、LPS 100 ng/mL (LPS 组)、LPS 100 ng/mL + n-LDL 50 μg/mL (LPS + n-LDL 组)、LPS 100 ng/mL + AGE-LDL 50 μg/mL (LPS + AGE-LDL 组),对照组加入等体积 DMSO、PBS,培养基终体积为 1 mL,置于 37 ℃中培养 90 min。HO-1 抑制试验细胞仍 2×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板。分别加入 LPS 100 ng/mL (LPS 组)、LPS 100 ng/mL + n-LDL 50 μg/mL (LPS + n-LDL 组)、LPS 100 ng/mL + AGE-LDL 50 μg/mL (LPS + AGE-LDL 组)、LPS 100 ng/mL + Znpp 10 μmol/L (LPS + Znpp 组)、LPS 100 ng/mL + n-LDL 50 μg/mL +

Znpp 10 μmol/L (LPS + n-LDL + Znpp 组)、LPS 100 ng/mL + AGE-LDL 50 μg/mL + Znpp 10 μmol/L (LPS + AGE-LDL + Znpp 组),培养基终体积为 1 mL,置于 37 ℃中培养 90 min。ELISA 的具体操作步骤按照试剂盒操作说明书进行。

1.6 RT-PCR 检测 洗涤后的细胞重悬,等分成 200 μL/份,以 2×10^6 /孔接种于 12 孔细胞培养板中。分别加入 n-LDL 50 μg/mL (n-LDL 组)、AGE-LDL 50 μg/mL (AGE-LDL 组),37 ℃培养 60 min,离心并洗涤细胞,以 TRIzol 试剂抽提总 RNA,cDNA 制备按照 Takara 反转录试剂盒说明书进行。RT-PCR 反应按照 Takara SYBR premix Ex Taq II 试剂说明书进行,反应体系为 10 μL。HO-1 引物:上游为 5'-AAT CGA GCA GAA CCA GCC TGA A-3',下游为 5'-AAC TCA GCA TTC TCG GCT TG-3'。β-actin:上游为 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3',下游为 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'。反应条件:第 1 阶段 95 ℃×10 s;第 2 阶段 60 ℃×30 s,72 ℃×15 s,重复 40 个循环;第 3 阶段 95 ℃×15 s,60 ℃×30 s,95 ℃×15 s。每个反应重复 3 次。

1.7 Western 印迹法 以冷 PBS 洗涤细胞 1 次,以含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 200 μL 裂解细胞 30 min,所有操作均在冰上进行。于 4 ℃以 $10\,000 \times g$ 离心 10 min,收集上层液体。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并转至聚二偏氟乙烯(PVDF)膜上。抗小鼠一抗抗体按 1:1 000 稀释,二抗按 1:10 000 稀释,根据说明书使用超敏 ECL 显色液进行检测。以上实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AGE-LDL 下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6、TNF-α 水平 LPS 组、LPS + n-LDL 组的 IL-6 和 TNF-α 水平分别显著高于对照组、n-LDL 组、AGE-LDL 组(*P* 值分别 < 0.01、0.05)。LPS + AGE-LDL 组的 IL-6 水平显著低于 LPS 组和 LPS + n-LDL 组(*P* 值均 < 0.01),但显著高于对照组(*P* <

0.05);TNF- α 水平显著低于 LPS 组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 AGE-LDL 下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6、TNF- α 的表达水平

(n=4, $\bar{x}\pm s$, pg/mL)		
组别	IL-6	TNF- α
对照	-1.764 $\pm$ 38.078	17.222 $\pm$ 28.897
n-LDL	25.814 $\pm$ 29.729	43.966 $\pm$ 22.074
AGE-LDL	20.412 $\pm$ 34.482	25.400 $\pm$ 30.352
LPS	375.032 $\pm$ 72.418 ^{②④⑤}	110.605 $\pm$ 31.106 ^{②④⑤}
LPS+n-LDL	384.319 $\pm$ 46.199 ^{②④⑤}	99.775 $\pm$ 21.421 ^{②④⑤}
LPS+AGE-LDL	95.183 $\pm$ 43.216 ^{①⑦⑧}	57.338 $\pm$ 23.890 ^⑥

与对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 n-LDL 组比较:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$;与 AGE-LDL 组比较:⑤ $P<0.01$;与 LPS 组比较:⑥ $P<0.05$,⑦ $P<0.01$;与 LPS+n-LDL 组比较:⑧ $P<0.01$

2.2 HO-1 对 AGE-LDL 下调 mBMMCs 释放 IL-6、TNF- α 的影响 LPS+Znpp 组、LPS+n-LDL+Znpp 组、LPS+AGE-LDL+Znpp 组的 IL-6 水平均显著高于 LPS 组、LPS+n-LDL 组、LPS+AGE-LDL 组(P 值均 <0.01),TNF- α 水平均显著高于 LPS+AGE-LDL 组(P 值均 <0.01)。见表 2。

2.3 HO-1 mRNA 检测 以 n-LDL 组 HO-1 mRNA 表达为 1, AGE-LDL 组的 HO-1 mRNA 相对表达量为 2.404 $\pm$ 0.576,显著高于 n-LDL 组($P<0.05$)。

2.4 AGE-LDL 对 mBMMCs MAPK 和 NF- κ B 信号通路激活的影响 AGE-LDL 组、LPS 组、LPS+AGE-LDL 组 p-P38、p-ERK2 和 p-P65 蛋白表达水平均显著高于对照组(P 值分别 <0.01 、 0.05)，

表 2 HO-1 抑制剂 Znpp 对 LPS 诱导 mBMMCs 释放 IL-6 和 TNF- α 的影响

(n=4, $\bar{x}\pm s$, pg/mL)		
组别	IL-6	TNF- α
LPS	363.507 $\pm$ 38.025	132.985 $\pm$ 44.707
LPS+n-LDL	326.074 $\pm$ 47.321	124.918 $\pm$ 24.925
LPS+AGE-LDL	148.451 $\pm$ 48.502 ^③	71.872 $\pm$ 34.589 ^①
LPS+Znpp	635.596 $\pm$ 66.741 ^{②③④}	167.032 $\pm$ 36.141 ^④
LPS+n-LDL+Znpp	642.124 $\pm$ 73.571 ^{②③④}	165.365 $\pm$ 30.037 ^④
LPS+AGE-LDL+Znpp	668.280 $\pm$ 55.333 ^{②③④}	179.843 $\pm$ 37.283 ^④

与 LPS 组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 LPS+n-LDL 组比较:③ $P<0.01$;与 LPS+AGE-LDL 组比较:④ $P<0.01$

LPS+AGE-LDL 组和 AGE-LDL 组的 p-P38 和 p-P65 蛋白表达水平均显著高于 n-LDL 组(P 值均 <0.01)。LPS 组的 p-ERK2、p-P65 蛋白表达均显著高于 n-LDL 组(P 值均 <0.05)。见图 1、表 3。

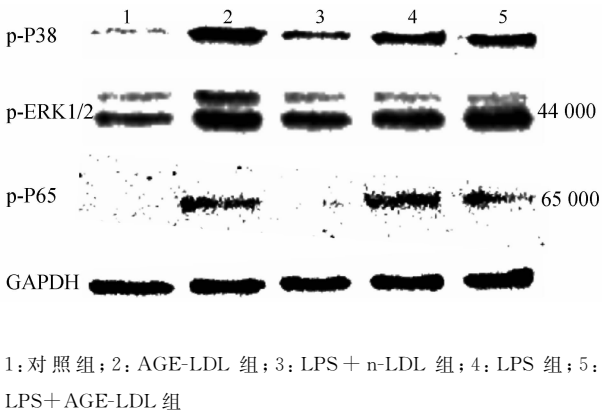


图 1 AGE-LDL 对 mBMMCs MAPK 和 NF- κ B 信号通路激活影响的电泳图

表 3 AGE-LDL 对 mBMMCs MAPK 和 NF- κ B 信号通路激活的影响

(n=3, $\bar{x}\pm s$)				
组别	p-P38/GAPDH	p-ERK1/GAPDH	p-ERK2/GAPDH	p-P65/GAPDH
对照	1.00 $\pm$ 0.00	0.87 $\pm$ 0.32	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
AGE-LDL	2.85 $\pm$ 0.61 ^{②④}	0.85 $\pm$ 0.36	1.71 $\pm$ 0.42 ^②	3.56 $\pm$ 0.59 ^{①③}
n-LDL	1.42 $\pm$ 0.37 ^④	0.94 $\pm$ 0.53	1.41 $\pm$ 0.17	1.49 $\pm$ 0.23
LPS	2.19 $\pm$ 0.50 ^①	1.11 $\pm$ 0.44	1.94 $\pm$ 0.14 ^{②③}	3.97 $\pm$ 1.29 ^{②③}
LPS+AGE-LDL	2.93 $\pm$ 0.68 ^{②④}	0.76 $\pm$ 0.22	1.60 $\pm$ 0.24 ^①	4.92 $\pm$ 1.94 ^{②④}

与对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 n-LDL 组比较:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$

3 讨 论

炎性反应在 AS 的发生和发展过程中起重要作用。Toll 样受体 4(TLR4)是 LPS 在体内的受体,同时也是 resistin、IL-1 等促炎因子的受体,被认为与 AS 的发生和发展密切相关。TLR4 激活可促进 AS 早期病变处内膜下泡沫细胞聚集^[13]。TLR4 受体激活可介导细胞释放如 IL-6、TNF- α

等多种炎性细胞因子。AGE-LDL 水平升高是 AS 的危险因素。本研究发现,AGE-LDL 单独刺激 mBMMCs 并不影响 IL-6 和 TNF- α 释放水平,非糖基化的 n-LDL 也对 LPS 介导的 IL-6 和 TNF- α 释放无明显影响,然而 AGE-LDL 却可以下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6 和 TNF- α 水平,提示 AGE-LDL 具有抗炎性反应作用。Min 等^[11]的研究结果显示,ox-LDL 可抑制 LPS 诱导

Raw264.7 巨噬细胞释放炎性细胞因子,但这种抑制作用并非通过提高 HO-1 表达水平实现的。本研究结果显示,HO-1 抑制剂 Znpp 可使 AGE-LDL 对 mBMMCs 炎性细胞因子释放的下调作用消失,且 AGE-LDL 可诱导 mBMMCs 中 HO-1 mRNA 表达增加,提示 AGE-LDL 可能是通过升高 HO-1 表达,进而下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6 和 TNF- α 水平。MAPK 和 NF- κ B 信号通路是 TLR4 受体激活介导炎性细胞因子释放的重要信号通路。巨噬细胞中 HO-1 表达受到 MAPK P38 调节,MAPK P38 抑制剂可抑制 HO-1 表达^[14-15]。本研究发现,AGE-LDL 可上调 mBMMCs MAPK p-P38、p-ERK1/2 和 NF- κ B p-P65 蛋白表达,而 n-LDL 对其无明显影响,然而 AGE-LDL 并不影响 LPS 诱导的 MAPK p-P38、p-ERK1/2 和 NF- κ B p-P65 蛋白表达。提示 AGE-LDL 可能通过下游通路影响 HO-1 表达,进而下调炎性细胞因子表达。

综上所述,AGE-LDL 可抑制 LPS 诱导 mBMMCs 释放 IL-6 和 TNF- α 。AGE-LDL 通过上调 HO-1 mRNA 表达,下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6 和 TNF- α 水平。AGE-LDL 可激活 MAPK P38、ERK 和 NF- κ B 信号通路,AGE-LDL 可能通过影响 MAPK 和 NF- κ B 下游信号通路下调 LPS 诱导 mBMMCs 释放的 IL-6 和 TNF- α 水平。

参 考 文 献

[1] FERRETTI G, RABINI R A, BACCHETTI T, et al. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5): 2180-2184.

[2] TAMES F J, MACKNESS M I, ARROL S, et al. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects [J]. Atherosclerosis, 1992, 93(3): 237-244.

[3] SILVA J A, ESCOBAR A, COLLINS T J, et al. Unstable angina. A comparison of angiographic findings between diabetic and nondiabetic patients[J]. Circulation, 1995, 92(7): 1731-1736.

[4] ARTWOHL M, GRAIER W F, RODEN M, et al. Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells [J]. Diabetes, 2003, 52(5): 1240-1247.

[5] BUCALA R, MAKITA Z, VEGA G, et al. Modification of

low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(20): 9441-9445.

[6] 王超凡, 徐亚伟. 肥大细胞在慢性心力衰竭进展中的作用 [J]. 上海医学, 2012, 35(9): 812-815.

[7] JEZIORSKA M, MCCOLLUM C, WOOLLEY D E. Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages[J]. J Pathol, 1998, 185(1): 10-17.

[8] KOVANEN P T. Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 5): 857-861.

[9] MIN K J, CHO K H, KWON T K. The effect of oxidized low density lipoprotein (oxLDL)-induced heme oxygenase-1 on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Cell Signal, 2012, 24(6): 1215-1221.

[10] WANG L J, LEE T S, LEE F Y, et al. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions [J]. Am J Pathol, 1998, 152(3): 711-720.

[11] JUAN S H, LEE T S, TSENG K W, et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2001, 104(13): 1519-1525.

[12] HE M, SIOW R C, SUGDEN D, et al. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011, 21(4): 277-285.

[13] HIGASHIMORI M, TATRO J B, MOORE K J, et al. Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 50-57.

[14] HA Y M, HAM S A, KIM Y M, et al. β 1-adrenergic receptor-mediated HO-1 induction, via PI3K and p38 MAPK, by isoproterenol in RAW 264.7 cells leads to inhibition of HMGB1 release in LPS-activated RAW 264.7 cells and increases in survival rate of CLP-induced septic mice[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(7): 769-777.

[15] ITOH T, KOKETSU M, YOKOTA N, et al. Reduced scytonemin isolated from Nostoc commune suppresses LPS/IFN γ -induced NO production in murine macrophage RAW264 cells by inducing hemeoxygenase-1 expression via the Nrf2/ARE pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 69: 330-338.

(收稿日期:2013-03-28)

(本文编辑:王小燕)

上海市静安区行血液透析治疗的终末期肾病患者流行病学调查

顾 波 乔 勤 马 骏

【摘要】 目的 回顾性调查上海市静安区行血液透析治疗的终末期肾病(ESRD)患者的流行病学特征。**方法** 收集 2011 年 1 月—2013 年 12 月在上海市静安区中心医院血液透析室行血液透析治疗的 ESRD 患者 224 例,分析其性别、年龄、原发病构成、不同透析持续时间患者的转归、死亡原因分布、医疗保险模式、主观营养状况评估(SGA)和生活质量的简单评估(包括工作状态、生活自理能力和每年住院次数)。**结果** 上海市静安区行血液透析治疗 ESRD 患者的男女之比为 1.41:1,平均年龄为(66.5±16.1)岁,其中 60~79 岁者占 49.1%。原发病构成中慢性肾炎占第 1 位(35.3%),其次为糖尿病肾病(26.3%)和高血压肾病(21.0%)。近 3 年新增的行血液透析治疗 ESRD 患者中,糖尿病肾病与慢性肾炎同居第 1 位(均占 30.2%),其次为高血压肾病(19.8%),但三者间构成比的差异无统计学意义($P=0.642$)。224 例行血液透析治疗的 ESRD 患者的血液透析持续时间均 ≥ 3 个月,仍在上海市静安区中心医院继续行血液透析者占 43.8%,死亡患者占 32.6%,转上海其他医院者占 16.5%,肾移植者占 1.3%。其中,透析 3 个月 $\sim < 1$ 年的患者最多(59 例),病死率(42.4%)也最高(P 值均 < 0.05)。各种死亡原因中 ≥ 60 岁患者的构成比均显著高于 < 60 岁患者(P 值均 < 0.05)。糖尿病肾病患者总体病死率最高(37.0%,27/73),其次为慢性肾炎(24.7%,18/73)和高血压肾病患者(23.3%,17/73, P 值均 < 0.05)。死亡原因以脑血管卒中、心血管事件和肺部感染为主。医疗保险模式以重大疾病医疗保险为主(占 80.4%),其次为外地报销(占 12.9%)。 ≥ 60 岁患者的轻、中度营养不良和重度营养不良发生率均显著高于 < 60 岁患者(P 值均 < 0.05)。生活质量评估中,不能自理和自理但依赖家人分别占 37.9%和 22.3%;住院次数 0~1 次/年 94 例(42.0%),2~5 次/年 69 例(30.8%), ≥ 6 次/年 61 例(27.2%)。**结论** 上海市静安区行血液透析治疗的 ESRD 患者以老年患者居多,新增糖尿病肾病例数增长速度最快,尽管以重大疾病医疗保险为主,但患者的营养状况较差、并发症多、自理能力较差、住院次数较多、病死率较高。

【关键词】 终末期肾病; 血液透析; 流行病学

Epidemiological investigation of end stage renal disease patients receiving hemodialysis in Jing'an District in Shanghai * GU Bo, QIAO Qin, MA Jun. * Department of Nephrology, Central Hospital of Jing'an District, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective To retrospectively investigate the epidemiological characteristics of end stage renal disease (ESRD) patients receiving hemodialysis in Jing'an District of Shanghai. **Methods** Clinical data of 224 ESRD patients who received hemodialysis in the Central Hospital of Jing'an District in Shanghai between January 2011 and December 2013 were collected. Gender, age, primary disease, dialysis duration and clinical outcome, cause of death, medical insurance pattern, subjective global nutritional assessment (SGA) and simple assessment of quality of life (including work status, self-care ability and hospitalized time per year) were investigated. **Results** The ratio of male to female was 1.41:1 in the 224 hemodialysis patients, with an average age of (66.5±16.1) years and the largest portion of 60-79 years old (49.1%). Chronic glomerulonephritis (35.3%) was the most common primary disease, followed by diabetic nephropathy (26.3%) and hypertensive nephropathy (21.0%). In the latest three years, the growth rates of diabetic nephropathy, chronic glomerulonephritis and hypertensive nephropathy were 30.2%, 30.2% and 19.8%; diabetic nephropathy was the one growing fastest in primary diseases, but there was no significant difference in the growth rates between the

three primary diseases ($P = 0.642$). Among the 224 patients, the percentages of continuous dialysis, death, transferring to other hospital and renal transplant were 43.8%, 32.6%, 16.5% and 1.3%, respectively. The mortality rate in the patients aged over 60 years old was significantly higher than that in those aged less than 60 years old ($P < 0.05$). The primary disease with the highest fatality (37%, 27/73) was diabetic nephropathy, followed by chronic glomerulonephritis (24.7%, 18/73) and hypertensive nephropathy (23.3%, 17/73). Cerebrovascular accident, cardiovascular event and lung infection were in the major of death. Serious illness health care was the most important medical insurance pattern (80.4%), followed by the field reimbursement (12.9%). Nutritional status in the patients aged over 60 years old was worse than that in those aged less than 60 years old (both $P < 0.05$). In the assessment of quality of life, the percentages of the patients who had no self-care ability and had strong dependence on family was 37.9% and 22.3%, respectively; there were 94 cases (42.0%) with 0—1 hospitalization time per year, 69 cases (30.8%) with 2—5 hospitalization times and 61 cases (27.2%) with 6 and more hospitalization times. **Conclusion** The elderly and diabetic nephropathy patients are the majority of ESRD patients receiving hemodialysis in Jing'an District of Shanghai. The growth rate of diabetic nephropathy is fastest among primary diseases. Although most patients have medical insurance, poor nutritional status, many complications, low self-care ability and frequent hospitalization and high mortality exist in elderly and diabetic nephropathy ESRD patients. (Shanghai Med J, 2015, 38: 10-14)

【Key words】 End stage renal disease; Hemodialysis; Epidemiology

终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)是指由各种肾脏疾病引起的肾脏功能不可逆衰退的终末阶段,患者只能依赖肾替代治疗(包括肾移植、血液透析和腹膜透析)来维持正常生命需要,属于慢性病范畴。近年来 ESRD 在全球的发病率逐年升高,且其预后差、医疗花费高,已成为全球范围内严重危害人类健康、加重经济负担的公共卫生问题。由于经济和卫生保健的发展不平衡,不同国家、不同地区间 ESRD 的构成和治疗也存在很大差异。在中国,即使在各方面发展均较为迅速的上海市,由于地理位置、人口导向、区域结构等不同,不同区域间行血液透析治疗的 ESRD 患者也存在各自的特点。本研究对 2011 年 1 月—2013 年 12 月上海市静安区中心医院 224 例行血液透析治疗的 ESRD 患者的年龄、原发病构成、治疗转归、死亡原因、营养状况和生存质量等资料进行分析,了解该区域行血液透析治疗的 ESRD 患者的区域特点,为临床诊断、治疗,以及降低 ESRD 发病率和病死率提供研究思路,为政府卫生行政部门制订决策提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2011 年 1 月—2013 年 12 月在上海市静安区中心医院血液透析室行血液透析治疗且持续时间 ≥ 3 个月的 ESRD 患者 224 例,其中男 131 例、女 93 例,年龄均 ≥ 22 岁。排除因急性肾衰竭、药物中毒行血液透析治疗的患者。

1.2 调查方法 以回顾性查阅病史为主,同时与主管医师交流,并直面或电话询问患者或家属,采取表格登记的形式进行调查。

1.3 观察项目 ① 行血液透析治疗的 ESRD 患者的性别和年龄分布;② 原发病构成和 3 年内原发病新增患者的情况;③ 透析持续时间和转归;④ 死亡原因分布;⑤ 医疗保险模式;⑥ 主观营养状况评估(SGA);⑦ 生活质量的简单评估,包括工作状态、生活自理能力和医院依赖程度(每年住院次数)。其中 SGA 包括体重下降的程度,饮食变化,消化系统症状(如恶心、呕吐、腹泻等),生理功能状况,皮脂肌肉消耗程度(主要根据体格检查和体表测量结果进行判断),结果判断为营养良好、轻-中度营养不良、重度营养不良。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计学软件。将调查表整理后经 Excel 2003 建立数据库并进行描述性分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。计数资料以频数(n)和构成比(%)表示,组间比较采用 Pearson χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行血液透析治疗的 ESRD 患者的性别和年龄分布 224 例行血液透析治疗的 ESRD 患者中,男 131 例(58.5%),女 93 例(41.5%),男女比例为 1.41:1。平均年龄为(66.5 $\pm$ 16.1)岁,男性平均年龄为(63.7 $\pm$ 16.4)岁,女性平均年龄为(70.5 $\pm$

14.9)岁。20~39岁 20例(8.9%),40~59岁45例(20.1%),60~79岁110例(49.1%),≥80岁49例(21.9%)。其中年龄<60岁者占29.0%(65/224),≥60岁者占71.0%(159/224)。

2.2 行血液透析治疗的 ESRD 患者原发病构成和 3 年内新增患者的情况 224 例行血液透析治疗的 ESRD 患者中,慢性肾炎 79 例(35.3%),糖尿病肾病 59 例(26.3%),高血压肾病 47 例(21.0%),多囊肾 11 例(4.9%),痛风性肾病 9 例(4.0%),狼疮性肾病 4 例(1.8%),梗阻性肾病 6 例(2.7%),慢性肾盂肾炎 5 例(2.2%),其他 4 例(1.8%)。其中首次诊断为 ESRD 并首次行血液透析治疗的患者(即新增加的行血液透析治疗的 ESRD 患者)96 例,分别为慢性肾炎 29 例(30.2%)、糖尿病肾病 29 例(30.2%)、高血压肾病 19 例(19.8%)、多囊肾 6 例(6.3%)、痛风性肾病 4 例(4.2%)、狼疮

性肾病 2 例(2.1%)、梗阻性肾病 3 例(3.1%)、慢性肾盂肾炎 1 例(1.0%)、其他 3 例(3.1%)。新增患者的原发病以糖尿病肾病与慢性肾炎同居第 1 位(均占 30.2%),其次为高血压肾病(19.8%),但三者间构成比的差异无统计学意义($\chi^2=0.886$, $P=0.642$)。

2.3 不同血液透析时间 ESRD 患者的转归 224 例 ESRD 患者的血液透析持续时间均≥3 个月,其中继续在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的患者 98 例(43.8%),转上海其他医院 37 例(16.5%),转外地医院 13 例(5.8%),肾移植 3 例(1.3%),死亡 73 例(32.6%)。血液透析持续时间3个月~<1年的患者构成比最高,为12.9%(59例),病死率(42.4%)也最高。血液透析持续时间≥10年的患者14例,最长透析持续时间为20年。见表1。

表 1 不同血液透析时间 ESRD 患者的转归

[n(%)]						
透析持续时间	N	继续透析中	转上海其他医院	转外地医院	肾移植	死亡
3个月~<1年	59	25(42.4)	4(6.8)	3(5.1)	2(3.4)	25(42.4)
1~<2年	29	13(44.8)	4(13.8)	1(3.4)	0	11(37.9)①
2~<3年	29	11(37.9)	7(24.1)	3(10.3)	0	8(27.6)①
3~<4年	25	9(36.0)	4(16.0)	2(8.0)	1(4.0)	9(36.0)①
4~<5年	19	7(36.8)	3(15.8)	1(5.3)	0	8(42.1)①
5年~<10年	49	26(53.1)	12(24.5)	1(2.0)	0	10(20.4)①
≥10年	14	7(50.0)	3(21.4)	2(14.3)	0	2(14.3)①

与透析时间为3个月~<1年患者比较:①P<0.05

2.4 行血液透析治疗的 ESRD 患者的死亡原因分布 共死亡 73 例,死亡原因分别为脑卒中23例(31.5%)、心血管事件 20 例(27.4%)、肺部感染 18 例(24.7%)、其他 9 例(12.3%)、放弃治疗3例(4.1%)。各种死亡原因中,<60 岁患者的构成比

均显著低于≥60 岁患者(P 值均<0.05)。糖尿病肾病患者总体病死率最高(37.0%,27/73),其次为慢性肾炎(24.7%,18/73)和高血压肾病患者(23.3%,17/73,P 值均<0.05)。见表2。

表 2 ESRD 血液透析患者的死亡原因分布

[n(%)]							
死亡原因	n	年龄		原发病			
		<60岁	≥60岁	慢性肾炎	糖尿病肾病	高血压肾病	其他
脑卒中	23	6(26.1)	17(73.9)①	6(26.1)	9(39.1)	5(21.7)	3(13.0)
心血管事件	20	0	20(100.0)①	5(25.0)	7(35.0)	3(15.0)	5(25.0)
肺部感染	18	0	18(100.0)①	6(33.3)	6(33.3)	5(27.8)	1(5.6)
其他	9	1(11.1)	8(88.9)①	1(11.1)	4(44.4)	3(33.3)	1(11.1)
放弃	3	0	3(100.0)①	0	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)

与<60岁患者比较:①P<0.05

2.5 行血液透析治疗的 ESRD 患者的医疗保险模式 医疗保险模式以重大疾病医疗保险为主,为180例(80.4%);其次为外地报销,为29例(12.9%);三类医疗保险和丧失劳动力分别为

10 例(4.5%)和 5 例(2.2%)。

2.6 行血液透析治疗的 ESRD 患者的 SGA 总体营养良好、轻-中度营养不良和重度营养不良的发生率分别为45.1%(101/224)、37.5%(84/224)

和 17.4%(39/224)。 ≥ 60 岁患者营养不良、轻-中度营养不良和重度营养不良的发生率分别为 52.5%(53/101)、79.8%(67/84)和 100.0%(39/39), <60 岁患者分别为 47.5%(48/101)、20.2%(17/84)和 0。 ≥ 60 岁患者轻-中度营养不良和重度营养不良的发生率均显著高于 <60 岁患者(P 值均 <0.05)。

2.7 行血液透析治疗的 ESRD 患者生活质量简单评估 ① 工作状态:以退休患者居多,为 164 例(73.2%);其次为在职,27 例(12.1%);早退 19 例(8.5%);无业 14 例(6.2%)。② 生活自理能力:完全自理仅 89 例(39.7%),不能自理 85 例(37.9%),自理但依赖家人 50 例(22.3%)。③ 住院次数:0~1 次/年 94 例(42.0%),2~5 次/年 69 例(30.8%), ≥ 6 次/年 61 例(27.2%)。

3 讨 论

上海市是中国经济和社会发展最为迅速的城市之一,静安区地处上海市中心,尽管全区面积只有 7.62 平方公里,但人口密度高、流动性大,是上海市各区县中经济发展最发达、社会医疗保障最完善的地区之一。本研究发现,在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的 ESRD 患者中男性(58.5%)和女性(41.5%)患者的构成比与上海市 2013 年末的统计结果(分别为 59%、41%)相仿^[1]。行血液透析治疗的 ESRD 患者的平均年龄为(66.5 $\pm$ 16.1)岁,60~79 岁者的构成比最高(49.1%), ≥ 80 岁者居第 2 位(21.9%);而上海市 2013 年末统计的行血液透析治疗的患者中 60~79 岁患者(39.1%)居首位,40~60 岁患者(38.1%)居第 2 位。表明在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的 ESRD 患者中老年患者比例更大。中国多项流行病学调查资料显示,2010 年 >65 岁老年人慢性肾脏病(CKD)的患病率高达 32%~37%^[2];2006 年全国各大中城市行血液透析治疗的 ESRD 患者中 >60 岁者占 49.2%^[3],与 2013 年末上海市的统计结果(49.3%)相仿^[1],但远低于本研究中 ≥ 60 岁老年患者的构成比(71.0%)。

SGA 是目前评估行血液透析和腹膜透析的 ESRD 患者营养状况的方法之一^[4]。行血液透析治疗的 ESRD 老年患者,由于体力和营养状况下降、并发症增多,使得生活质量下降,病死率升高。

本研究结果显示, ≥ 60 岁患者的重度营养不良和轻-中度营养不良的发生率均显著高于 <60 岁的患者。生活质量简单评估结果显示,老年患者自理能力差,平均每年住院次数多,对家人和医院较依赖。行血液透析治疗的 ESRD 患者中死亡 73 例,死亡原因排在前 3 位的仍是脑卒中、心血管事件和肺部感染。在各种死亡原因中, ≥ 60 岁患者的构成比均显著高于 <60 岁患者。

本研究结果显示,在原发病的构成中,仍以慢性肾炎(35.3%)、糖尿病肾病(26.3%)和高血压肾病(21.0%)占前 3 位。这与上海市 2013 年末统计的行血液透析治疗患者的原发病构成^[1]一致。但对 2011 年 1 月—2013 年 12 月 3 年的新增加的行血液透析治疗的 ESRD 患者而言,在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的 ESRD 患者中糖尿病肾病、慢性肾炎的构成比最高,均为 30.2%,其次为高血压肾病(19.8%)。而上海市 2013 年新增加的行血液透析治疗的患者中慢性肾炎仍居首位(39.92%),其次是糖尿病肾病和高血压肾病(均为 14.88%)^[1]。提示,在上海市静安区中心医院新增加的 ESRD 患者中,糖尿病肾病增长速度远快于上海市。这可能与静安区经济发展较快和老年患者居多有关。最新研究结果显示,中国各地糖尿病肾病呈快速增长趋势,其中糖尿病患病率已达总人口的 9.7%^[5]。此外,本研究结果还发现糖尿病肾病所致死亡也居首位(37.0%),慢性肾炎和高血压肾病分别为 24.7%和 23.3%。国内外研究^[6-7]结果也表明,糖尿病所致 ESRD 患者的死亡风险高于非糖尿病 ESRD 患者。糖尿病肾病患者容易发生严重的心脑血管并发症,且其预后较非糖尿病 ESRD 患者差。

本研究结果显示,在不同透析持续时间的患者中,透析持续时间 3 个月~ <1 年的患者最多(26.3%),其病死率也最高;透析时间 <5 年的患者中,每年的死亡人数与在透析人数基本持平;透析时间 ≥ 5 年的患者死亡人数明显下降,而透析人数趋于平稳。这可能与在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的 ESRD 患者中以老年患者和糖尿病肾病患者居多有关。国内外研究也发现,血液透析第 1 年患者的病死率和退出率普遍较高。北京市 109 家单位血液透析中心登记的 2007、2008 年度与透析龄相关的数据^[8]分析结果显示,男性、首次透析、年龄 >60 岁和原发病为糖尿病是

造成透析患者退出偏快的原因。因为老年患者和糖尿病肾病患者身体素质差,合并症多,难以耐受或拒绝接受血液透析治疗,从而导致死亡比例相对较高。

上海市针对行血液透析治疗的 ESRD 患者,根据不同户籍、不同年龄,以及是否缴纳医疗保险金、退休、伤残等因素,目前共有重大疾病医疗保险、三类医疗保险、丧生劳动力和外地报销 4 种最常见的医疗保险方案,其中以重大疾病医疗保险报销额度最大,退休或早退职工可以享受 95% 医疗保险,个人仅支付 5% 的医疗费用,在职职工需要支付 20% 的医疗费用。本研究结果显示,上海市静安区中心医院 ≥ 60 岁患者占 71.0%,退休和早退患者占 81.7%,且以上海市城镇户籍为多,因此重大疾病医疗保险患者居首位(80.4%),其次为外地报销患者(12.9%)。由于每例行血液透析治疗的 ESRD 患者每年要花费 14 300 美元,而 2003 年中国城镇和农村人均可支配收入分别为 1 210 和 375 美元^[9],如果完全自费,中国一般家庭均难以承担。要解决这些问题,首先要扩大重大疾病医疗保险范围。中国从 2003 年起在城镇进一步扩大基本城镇医疗保险,代替 1999 年设立的公费医疗保险和职工医疗保险,目的是到 2020 年覆盖所有城镇居民。基本城镇医疗保险对于行血液透析治疗的 ESRD 患者,个人只需支付透析费用的 10%;在农村建立新农村合作医疗保险,2010 年覆盖所有农村居民,个人去城镇医院透析中心只需支付透析费用的 35%~45%。在这方面,就全国来看,上海的医疗保险(包括社会基金、单位职工医疗保险和个人自付等几个部分)是做得最好的,上海市重大疾病医疗保险在国内的报销额度也是最高的。其次需要有全国流通的医疗保险制度,目前很多地方正在尝试,如长三角地区就已经在逐渐尝试跨省市报销。然而,上海市的血液透析重大疾病医疗保险仍以打包形式(包含血液透析治疗和相关药品等)进行,服务包内容过多会带来诸多供方管理和政策投机问题,不足又会影响患者对服务的利用。因此,应该对打包服务内容进行谨慎设置,同时加强监管。

综上所述,在上海市静安区中心医院行血液透析治疗的 ESRD 患者中,老龄化和糖尿病肾病增长速度较快,尽管有重大疾病医疗保险,但这类患者的营养状况相对较差,并发症多,生活质量下

降,对家人和医院的依赖性较高。在发达国家中,血液透析中心是 ESRD 患者最普遍的透析选择(52%~94%),其次为家庭透析(5%~39%)和腹膜透析(1%~8%)^[10]。本课题组认为,要解决 ESRD 患者行血液透析治疗的问题,首先,应加强对老年和糖尿病患者 CKD 的早期防治,尽量减少进入 ESRD 阶段的患者数。其次,这类患者本身生存期不长,5 年生存率较低,更加需要社会和家庭关心。既然很多地方都设立老年医院、肿瘤患者的临终关怀医院,那么可否尝试在二级区域医院内设立老年养老式血液透析中心,在社区医院内设立腹膜透析。最后,可以统一标准,以进一步合理分配社会医疗资源,便于医政部门监管,减少浪费和投机行为发生。

参 考 文 献

- [1] 上海市血液透析质量控制中心,上海市肾内科临床质量控制中心,上海市医学会肾脏病分会,等. 2013 上海市透析登记报告[R]. 上海:上海市血液透析质量控制中心,2013.
- [2] ZHANG L, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815-822.
- [3] 唐 盛, 龚智峰, 彭小梅, 等. 老年终末期肾病患者流行病学调查分析[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(5): 613-614.
- [4] 吴一帆, 何丽换, 傅立哲, 等. 主观综合营养评估法在慢性肾脏病患者中的运用[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1892-1895.
- [5] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [6] 吕文律, 滕 杰, 邹建洲, 等. 老年维持性血液透析患者生存分析[J]. 中国血液净化, 2012, 11(6): 298-302.
- [7] RACKIS S, ZAPUTOVIC L, VUJICIC B, et al. Comparison of survival between diabetic and non-diabetic patients on maintenance hemodialysis: a single-centre experience[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 75(2): 169-175.
- [8] 陈凤镔, 李冀军. 血液透析患者透析龄分布规律方程的建立和验证[J]. 中国血液净化, 2013, 12(8): 411-414, 424.
- [9] ZHANG L, WANG H. Chronic kidney disease epidemic: cost and health care implications in China [J]. Semin Nephrol, 2009, 29(5): 483-486.
- [10] BROWN E A, JOHANSSON L. Dialysis options for end-stage renal disease in older people[J]. Nephron Clin Pract, 2011, 119(Suppl 1): c10-c13.

(收稿日期:2014-07-06)

(本文编辑:许海燕)

• 论 著 •

乙型肝炎病毒相关性肾炎患者肾小管上皮细胞凋亡的病理学特点

何 平 闵 南 闵柳畅 冯国和 李德天

【摘要】 目的 探讨在乙型肝炎病毒(HBV)相关性肾炎(HBV-GN)中,HBV X(HBx)蛋白与肾小管上皮细胞凋亡之间的关系及其可能的信号机制。**方法** 采用 TUNEL 法检测 HBV-GN 患者肾组织中细胞凋亡情况,并计算凋亡指数(AI)。采用免疫组织化学方法检测肾组织 HBx 蛋白、信号转导子和转录活化子3(STAT3)和磷酸化 STAT3(p-STAT3)水平,并对肾组织 HBx 蛋白表达水平及其 AI 进行相关性分析。**结果** 86%(19/22)的 HBV-GN 患者的肾小管上皮细胞内有 HBx 蛋白表达,而对照组无表达。HBV-GN 组 HBx 蛋白、p-STAT3、STAT3、Bax 的表达水平和 AI 均显著高于对照组(P 值均 <0.05),Bcl-2 的表达水平和 Bcl-2/Bax 比值均显著低于对照组(P 值均 <0.05),且 HBV-GN 患者的 AI 与肾脏 HBx 蛋白表达($r=0.612, P=0.032$)、24 h 尿蛋白定量($r=0.824, P=0.020$)均呈正相关。**结论** 肾小管上皮细胞凋亡是 HBV-GN 肾脏病理的重要病变之一。STAT3 信号蛋白活化和 Bcl-2/Bax 比值降低可能参与其中。

【关键词】 凋亡;乙型肝炎病毒 X 蛋白;信号转导;HK-2 细胞系;Baxter;B 细胞淋巴瘤-2

Pathological study on renal tubular epithelial cell apoptosis in patients with hepatitis B virus-associated glomerulonephritis * HE Ping, MIN Nan, MIN Liuchang, FENG Guohe, LI Detian. Department of Nephrology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China
Corresponding author: LI Detian. E-mail: lidetian@sj-hospital.org

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between hepatitis B virus(HBV) X protein (HBx) and renal tubular epithelial cell apoptosis in HBV-associated glomerulonephritis (HBV-GN) and the possible signaling mechanism. **Methods** Cell apoptosis in nephridial tissue of patients with HBV-GN was determined by terminal oxynucleotidyl transferase mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL) method, then apoptosis index was calculated. HBx, phosphorylated signal transducers and activators of transcription 3 (p-STAT3) and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) were determined by immunohistochemical assay. Correlation analysis was conducted between HBx expression in nephridial tissue and apoptosis index. **Results** There was no HBx expression in control group, whereas HBx was expressed in 86% HBV-GN patients (19/22). The expressions of HBx, p-STAT3, STAT3 and Baxter (Bax), and apoptosis index in HBV-GN group were significantly higher than those in control group (all $P<0.05$), while the expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2/Bax in HBV-GN group were significantly lower than those in control group (both $P<0.05$). Apoptosis index had linear correlation with HBx expression ($r=0.612, P=0.032$) and 24 h urine protein ($r=0.824, P=0.020$). **Conclusion** Renal tubular epithelial cell apoptosis is one of the major pathological changes of HBV-GN. STAT3 signaling protein activation and decreased ratio of Bcl-2 to Bax may be involved. (Shanghai Med J, 2015, 38; 15-18)

【Key words】 Apoptosis; Hepatitis B virus X protein; Signal transducers and activators of transcription signaling pathway; HK-2 cells; Baxter; B-cell lymphoma-2

基金项目:辽宁省教育厅科学研究资助项目(L2013295)

作者单位:110004 辽宁沈阳,中国医科大学附属盛京医院肾内科(何平、闵南、闵柳畅、李德天),感染科(冯国和)

通信作者:李德天,电子邮箱为 lidetian@sj-hospital.org

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球范围内重要的公共卫生问题之一,长期以来中国、东南亚和非洲为高流行区。HBV 感染不仅可引起急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌

等,还可引起肾损伤。据统计,8%~20%的乙型肝炎患者伴有 HBV 相关性肾炎(HBV-associated glomerulonephritis, HBV-GN)^[1]。HBV-GN 相关问题如 HBV 感染与肾小球肾炎发病之间的关系,及其致病方式、治疗方案等,一直是传染病学、肾脏病学临床和基础研究的热点问题。HBV X (HBx)基因是 HBV 基因组中最小的开放性读码框,其编码长度为 154 个氨基酸的蛋白。HBx 基因序列在嗜肝病毒科中高度保守,提示在 HBV 的生物学功能上具有重要意义。有研究^[2]结果显示,HBx 蛋白可以激活 Ras-Raf-丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)、P38 MAPK、酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号转导子和转录活化因子(STAT)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、酪氨酸激酶(Src)等信号通路参与宿主细胞增殖或凋亡过程。其中 JAK/STAT 信号通路与细胞的增殖、分化、凋亡等密切相关。本研究拟在研究 HBV-GN 患者肾组织细胞凋亡病理学特点的基础上,检测肾组织中 HBx 蛋白的表达情况,并分析两者的相关性,为 HBx 蛋白在 HBV-GN 中的直接致病作用提供病理学依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择中国医科大学附属盛京医院自 2004 年 11 月—2011 年 3 月间经肾穿刺活组织检查明确诊断为 HBV-GN 的患者(HBV-GN 组)22 例,男 17 例,女 5 例,年龄 15~57 岁,平均年龄为(42.6±2.9)岁。所有患者均经 HBV 血清学检测证实存在 HBV 感染,并在 B 超引导下经皮肾穿刺活组织检查术获得肾组织,经病理学检查证实均为 HBV-GN,符合 1990 年北京 HBV-GN 座谈会拟定的标准^[3]。另选择同期在中国医科大学附属盛京医院行手术治疗的肾外伤或肾癌患者(对照组)5 例,男 4 例,女 1 例,年龄 23~72 岁,平均年龄为(35.5±3.4)岁,取其距病灶旁最远切缘的正常肾组织蜡块。

1.2 材料 小鼠抗 STAT3 抗体、磷酸化兔抗 STAT3(p-STAT3)抗体购自美国 CST 公司,兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥, TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司,兔抗 HBx 单克隆抗体购自 Chemicon 公司。

1.3 免疫组织化学检测 肾组织石蜡切片厚约

3 μm ,常规脱蜡至水,按试剂盒说明操作。对免疫组织化学图片行半定量分析:每张图片随机选取 20 个视野,应用日本 Olympus 摄像系统和日本 MetaMorph/C-5050/BX41 型显微图像分析系统测定积分光密度值。

1.4 TUNEL 检测 肾组织石蜡切片厚约 3 μm ,按试剂盒说明书所示步骤进行操作。计算凋亡指数(apoptosis index, AI):在光学显微镜下,每张切片随机选取 20 个高倍镜视野($\times 400$),分别检测每个高倍镜视野内 TUNEL 阳性细胞数,计算并比较平均每个高倍镜视野内阳性细胞的百分率。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验,采用一元线性相关与回归分析各因素与 HBV-GN 患者肾小管上皮细胞 AI 的关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV-GN 组患者临床和病理资料 HBV-GN 组患者中,以肾病综合征为表现者 15 例(68.2%),以血尿、蛋白尿为表现者 3 例(13.6%),以持续性蛋白尿为表现者 4 例(18.2%),所有患者的肾功能均正常。光学显微镜下,病理分期为膜性肾病Ⅲ期 3 例,膜性肾病Ⅱ期 9 例,膜性肾病Ⅰ期 10 例。免疫荧光检测显示,22 例 HBV-GN 患者的肾组织均呈沿肾小球毛细血管壁强度为十至十+的 HBV 表面抗原(HBsAg)细颗粒状沉积,其中 3 例同时伴有系膜区的少量沉积;均存在强度为十至十+的 IgG、IgM、C3 细颗粒状沉积,其中 15 例患者存在强度为十至十+的 Clq 沉积,16 例存在强度为十至十+的 IgA 沉积。

2.2 肾组织中 HBx 蛋白的表达 86%(19/22)的 HBV-GN 患者肾小管上皮细胞内可见 HBx 蛋白表达。光学显微镜下可见,HBV-GN 组肾小管上皮细胞细胞质染色,呈棕黄色、深褐色颗粒,而对照组无 HBx 蛋白表达,见图 1(见插页)。HBV-GN 组 HBx 蛋白的表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),见表 1。

2.3 肾组织中 STAT3 和 p-STAT3 的表达 对照组有少量 p-STAT3 表达,主要表达于肾小管上皮细胞的细胞质中;HBV-GN 组 p-STAT3 表达较多,在细胞质、细胞核(主要在近曲小管上皮细胞细胞核和集合管上皮细胞细胞核)中均有表达,

见图 2(见插页)。对照组和 HBV-GN 组均有 STAT3 表达,且均表达于肾小管上皮细胞的细胞质中,见图 3(见插页)。HBV-GN 组 p-STAT3、STAT3 的表达水平均显著高于对照组(P 值均 <0.05),见表 1。

2.4 肾组织中 Bcl-2 和 Bax 表达 对照组 Bcl-2 呈高水平表达,主要表达于肾小管上皮细胞的细

胞质中,见图 4(见插页)。对照组 Bax 表达较少,而 HBV-GN 组表达较多,主要表达于肾小管上皮细胞细胞质中,见图 5(见插页)。HBV-GN 组 Bcl-2 的表达水平和 Bcl-2/Bax 比值显著低于对照组(P 值均 <0.05),而 Bax 的表达水平显著高于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组患者肾组织 HBx 蛋白、p-STAT3、STAT3、Bcl-2、Bax 的表达水平比较

($\bar{x} \pm s$)							
组别	<i>n</i>	HBx 蛋白	p-STAT3	STAT3	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照	5	0	0.08±0.02	0.18±0.03	0.34±0.05	0.11±0.03	3.09±0.12
HBV-GN	22	0.24±0.03 ^①	0.17±0.04 ^①	0.32±0.04 ^①	0.16±0.04 ^①	0.26±0.04 ^①	0.61±0.04 ^①

与对照组比较:① $P<0.05$

2.5 肾小管上皮细胞 AI 的比较 HBV-GN 组患者肾小管-间质区均可见 TUNEL 阳性细胞,AI 为(16.82±3.35)%;肾小球内少见。对照组 TUNEL 阳性信号仅见于个别肾小管上皮细胞,AI 为(1.06±0.43)%。HBV-GN 组肾小管上皮细胞 AI 显著高于对照组($P<0.05$)。见图 6(见插页)。

2.6 HBV-GN 患者肾小管上皮细胞 AI 与 HBx 蛋白表达、24 h 尿蛋白定量和 HBV-DNA 定量的相关性 HBV-GN 患者的肾小管上皮细胞 AI 与 HBx 蛋白表达($r=0.612,P=0.032$)、24 h 尿蛋白定量($r=0.824,P=0.020$)均呈正相关性。24 h 尿蛋白定量 ≥ 3.5 g/d 患者的肾小管上皮细胞 AI 值为(18.23±2.42)%,显著高于 24 h 尿蛋白定量 <3.5 g/d 患者的(13.15±3.34)%($P=0.019$),但肾小管上皮细胞 AI 与 HBV-DNA 定量不相关($P=0.738$)。

3 讨 论

于艳等^[4]采用原位杂交的方法检测了 HBV-GN 患者肾组织中 HBx mRNA 的存在和分布情况,结果证实,HBV-GN 患者肾组织中有 HBx mRNA 表达,且主要分布于肾小管上皮细胞的细胞质内,还见于少数肾小球上皮、内皮、系膜细胞的细胞质等处;肾小管上皮细胞内 HBx mRNA 的阳性率显著高于肾小球($P<0.01$),与 Lai 等^[5]检测 HBV-GN 患者肾组织内 HBV DNA 和(或) mRNA 的结果一致。且 HBx mRNA 检测阳性率高达 82.5%,证实了 HBV 可能以肾脏细胞(尤其是肾小管上皮细胞)为宿主细胞进行转录、复制,

也进一步支持了 HBV 可直接感染肾脏并原位复制而致病的观点。

HBV-GN 虽然有一定的自发缓解倾向,但仍有部分患者的临床症状持续存在,在成人中可高达 40%~70%,甚至最终进展至终末期肾病。孙莉静等^[6]分析了 HBV-GN 患者的肾脏病理学检查资料,结果显示,HBV-GN 组较对照组肾细胞 AI 明显升高,凋亡细胞多分布于近端、远端肾小管和集合管上皮细胞,在肾小球内少见。表明肾小管上皮细胞凋亡是 HBV-GN 肾脏病理的重要病变之一,但其引起肾小管上皮细胞凋亡的原因和相关信号通路不详。

有研究^[7-8]结果表明,多种肾脏疾病的发生和发展除与细胞凋亡密切相关外,还伴随着凋亡相关基因表达的变化,Bax/Bcl-2 比值升高决定了细胞走向死亡并进入细胞凋亡的执行期,通过一系列复杂的级联反应和细胞内的途径导致细胞发生凋亡^[9]。

本研究采用 TUNEL 法检测肾组织凋亡细胞发现,HBV-GN 组患者肾小管-间质区均可见 TUNEL 阳性细胞,AI 为(16.82±3.35)%;在肾小球内少见。对照组 TUNEL 阳性信号仅见于个别肾小管上皮细胞,AI 为(1.06±0.43)%。对照组中 Bcl-2 呈高水平表达,主要表达于肾小管上皮细胞的细胞质中。对照组中 Bax 表达较少,而在 HBV-GN 组中表达较多,主要表达于肾小管上皮细胞的细胞质中。HBV-GN 组 Bcl-2 的表达水平显著低于对照组,而 Bax 的表达水平显著高于对照组。表明 Bax/Bcl-2 比值变化参与 HBV-GN 的肾小管上皮细胞凋亡。p-STAT3 在对照组有少

量表达,而在 HBV-GN 组表达较多;对照组和 HBV-GN 组均有 STAT3 表达,且均表达于肾小管上皮细胞的细胞质中。HBV-GN 组 p-STAT3、STAT3 的表达水平均显著高于对照组。表明在 HBV-GN 中,STAT3 蛋白磷酸化可能参与肾小管上皮细胞的凋亡。

近年,Hong 等^[10]将 HBx 基因转染至人肾小管近端上皮细胞(HK-2)内,通过 TUNEL 法检测到 HK-2 细胞凋亡,但具体机制及其信号通路等尚不明确。本研究结果显示,在 86% 的 HBV-GN 患者肾小管上皮细胞内可见 HBx 表达,HBV-GN 组患者肾小管上皮细胞 AI 显著高于对照组,且其 AI 与肾脏 HBx 蛋白表达呈正相关,Bcl-2/Bax 比值降低。此结果从病理学角度证明,肾小管上皮细胞凋亡是 HBV-GN 肾脏病理的重要病变之一,STAT3 信号蛋白活化和 Bcl-2/Bax 比值降低可能参与其中,但此推断仍需后续的实验进一步阐述和证明。

参 考 文 献

[1] HAN S H. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B[J]. Clin Liver Dis, 2004, 8(2): 403-418.

[2] 何 平, 冯国和. 乙型肝炎病毒相关性肾炎中病毒直接损伤肾组织作用机制研究现状[J]. 中华传染病杂志, 2012, 30 (2): 123-125.

[3] 中华内科杂志编委会. 乙型肝炎病毒相关性肾炎座谈会纪

要[J]. 中华内科杂志, 1990, 29(9): 519-521.

[4] 于 艳, 张 静, 王汉民, 等. 乙型肝炎病毒相关性肾炎肾组织中 HBx、MHBst mRNA 的表达及其意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 915-916, 918.

[5] LAI K N, HO R T, TAM J S, et al. Detection of hepatitis B virus DNA and RNA in kidneys of HBV related glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 1996, 50(6): 1965-1977.

[6] 孙莉静, 于建平, 袁伟杰, 等. Bcl-2 和 Bax 在乙型肝炎病毒相关性肾炎患者肾组织中的表达[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(5): 492-494.

[7] KANG B P, URBONAS A, BADDOO A, et al. IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(5): F1013-F1024.

[8] QIU L Q, SINNIAH R, I-HONG HSU S. Downregulation of Bcl-2 by podocytes is associated with progressive glomerular injury and clinical indices of poor renal prognosis in human IgA nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (1): 79-90.

[9] YANG B, JOHNSON T S, THOMAS G L, et al. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2002, 62(4): 1301-1313.

[10] HONG L, ZHANG J, MIN J, et al. A role for MHBst167/ HBx in hepatitis B virus-induced renal tubular cell apoptosis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(7): 2125-2133.

(收稿日期:2014-03-27)

(本文编辑:许海燕)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《上海医学》杂志对一稿两投问题处理的声明

为维护《上海医学》杂志的声誉和广大读者的利益,现将本刊对一稿两投问题的处理声明如下。① 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管两篇文稿在文字的表达和叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要,疾病的诊断标准和防治指南,有关组织达成的共识性文件,新闻报道类文稿,以及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿,上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。② 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,不可再将该文投寄给他刊。③ 请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。④ 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿通知,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与本刊编辑部联系并申述理由。⑤ 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。⑥ 一稿两投一经证实,将择期在杂志中刊出其作者单位和姓名以及撤消该论文的通知,对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,2 年内将拒绝在《上海医学》杂志发表,并就此事件向作者所在单位和本领域内的其他科技期刊进行通报。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂对脑缺血再灌注大鼠 Fractalkine 表达的影响

张 宁 刘 元 刘运海 姚 帅

【摘要】 目的 观察不同剂量过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂马来罗格列酮对脑缺血再灌注大鼠 Fractalkine (FKN) 表达的影响, 探讨 PPAR γ 激动剂对脑缺血再灌注损伤的作用和机制。**方法** 取健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 将其随机分入假手术组、缺血再灌注模型组 (模型组)、马来罗格列酮 0.5 mg/kg 组 (小剂量组)、马来罗格列酮 2 mg/kg 组 (中剂量组)、马来罗格列酮 5 mg/kg 组 (大剂量组), 每组 12 只。假手术组和模型组以相同体积的 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 分别于缺血 2 h、再灌注 24 h 后处死大鼠。马来罗格列酮小剂量组、中剂量组、大剂量组大鼠于缺血即刻和缺血 2 h 后经胃管分别灌入马来罗格列酮 0.5、2 和 5 mg/kg。参考 Longa 线栓法制备大脑中动脉栓塞模型。分别采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法观察脑梗死体积, H-E 染色观察缺血周边区病理学变化, 免疫组织化学法检测 FKN 阳性细胞表达情况。**结果** 中剂量组和大剂量组的 Longa 评分均显著低于模型组 (P 值均 <0.05), 脑梗死体积均显著小于模型组 (P 值均 <0.05), 平均光密度 (AOD) 值均显著低于模型组 (P 值均 <0.05)。小剂量组和模型组大鼠的 AOD 值均显著高于假手术组 (P 值均 <0.01)。**结论** 马来罗格列酮对脑缺血再灌注损伤的保护作用可能与下调 FKN 表达有关, 且以大、中剂量的效果较好。

【关键词】 缺血再灌注; 马来罗格列酮; 炎症反应因子; Fractalkine

Effect of peroxisome-proliferator activated receptor gamma γ excitomotor on Fractalkine expression in rats after cerebral ischemia-reperfusion ZHANG Ning, LIU Yuan, LIU Yunhai, YAO Shuai. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hu'nan, China

Corresponding author: ZHANG Ning. E-mail: zhnxyy63@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of rosiglitazone maleate, an excitomotor of peroxisome-proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), on the expression of Fractalkine (FKN) after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Methods** Sixty healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups ($n=12$): sham operation group, NS control group, low-dose rosiglitazone group (0.5 mg/kg), moderate-dose rosiglitazone group (2 mg/kg) and high-dose rosiglitazone group (5 mg/kg). Rosiglitazone maleate (0.5, 2 and 5 mg/kg) was given by stomach catheter immediately and 2 h after middle cerebral artery occlusion in three rosiglitazone groups, respectively. Isometric 0.9% sodium chloride solution was perfused in sham operation group and NS control group. The rats were sacrificed at 2 h after brain ischemia and 24 h after reperfusion, respectively. Focal cerebral ischemia was induced by the intraluminal suture for middle cerebral artery occlusion. Cerebral infarction area was measured by 2, 3, 5-triphenyl four azole nitrogen chloride (TTC) staining. The pathologic changes were observed by hematoxylin and eosin (H-E) staining. The protein expression of FKN was measured by immunohistochemical method. **Results** The Longa rating of moderate and high dose rosiglitazone groups were significantly lower than that of NS control group (both $P<0.05$). Cerebral infarction volume and AOD value of moderate and high dose rosiglitazone groups were significantly less than that of NS control group (both $P<0.05$). AOD values of low dose rosiglitazone group and NS control group were significantly higher than that of sham operation group (both $P<0.01$). **Conclusion** Rosiglitazone can ameliorate the brain ischemic injury after middle

cerebral artery occlusion by decreasing the expression of FKN. Moderate and high doses are more effective than low dose. (Shanghai Med J, 2015, 38; 19-22)

【Key words】 Ischemia-reperfusion; Rosiglitazone; Inflammatory factor; Fractalkine

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome-proliferator activated receptor gamma, PPAR γ) 是一种配体激活型转录调控因子, 激活后可调控多种基因的转录和表达, 参与体内多种病理生理过程。近年研究发现, PPAR γ 与心、脑、肾、肺、肠道等重要脏器的缺血性病理损伤关系密切, 然而其详细机制至今仍不完全明确。Fractalkine (FKN) 即 CX3CL1, 属于 CX3C 家族, 是新近发现的一类比较独特的趋化因子, 兼有特殊的黏附和趋化的双重活性功能, 是目前发现的唯一一种不依赖黏附因子而能够介导炎症反应细胞和炎症反应介质黏附内皮细胞的趋化因子。有研究^[1-2]结果显示, FKN 独特的结构和生物特性使其可能在缺血再灌注损伤中起到重要作用。本研究在成功建立大鼠脑缺血再灌注模型的基础上, 观察再灌注后脑组织 FKN 阳性细胞的表达, 以及马来酸罗格列酮对其表达的影响, 以探讨 PPAR γ 在脑缺血再灌注损伤中的作用机制, 为临床防治缺血性脑血管疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验药品 马来酸罗格列酮 (rosiglitazone) 购自葛兰素史克公司, FKN 抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗大鼠、PV6001 二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒均由北京中杉金桥生物公司提供, 其余试剂由中南大学湘雅医院神经内科实验室提供。

1.2 仪器 石蜡切片机购自德国徕卡公司, 生物光学显微镜照相机购自日本 Olympus 公司, HPIAS-1000 彩色病理图像分析系统购自武大影像工程公司, 生物组织石蜡包埋机购自孝感市亚光医用电子技术有限公司, Motic 病理图像分析系统购自厦门麦克奥迪公司。

1.3 实验动物与分组 250~280 g 清洁级健康雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只 (由湘雅医学院动物实验中心提供), 被随机分入假手术组、缺血再灌注模型组 (模型组)、马来酸罗格列酮 0.5 mg/kg 组 (小剂量组)、马来酸罗格列酮 2 mg/kg 组 (中剂量组)、马来酸罗格列酮 5 mg/kg 组 (大剂量组), 每组 12 只。假手术组和

模型组大鼠以相同体积的 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 分别于缺血 2 h、再灌注 24 h 后处死大鼠。小剂量组、中剂量组、大剂量组大鼠于缺血即刻和缺血 2 h 后经胃管分别灌入马来酸罗格列酮 0.5、2 和 5 mg/kg。参考 Longa 线栓法制备局灶性大脑中动脉脑缺血模型。采用 Longa 评分法进行大鼠神经功能缺损评分: 0 分为正常, 无神经功能缺损; 1 分为左侧前爪不能完全伸展, 轻度神经功能缺损; 2 分为行走时大鼠向左侧 (瘫痪侧) 转圈, 中度神经功能缺损; 3 分为行走时大鼠身体向左侧 (瘫痪侧) 倾倒, 重度神经功能缺损; 4 分为不能自发行走, 有意识丧失。Longa 评分为 1~3 分表明造模成功。剔除无神经功能缺损、有呼吸困难、提前死亡和处死时有蛛网膜下腔出血的大鼠, 并严格按实验条件进行相应补充。

每组各取 6 只麻醉后大鼠, 取其自额极起 4~11 mm 处的脑组织, 经 4% 多聚甲醛固定过夜, 依次脱水、透明、浸蜡、包埋。将包埋好的石蜡组织修块, 自大脑向后以冠状切面连续切片, 切片厚度为 5 μ m, 收集含缺血区的脑片贴片、烤片以备免疫组织化学染色。各组其他大鼠脑组织留作 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色。

1.4 病理学观察 石蜡切片经 H-E 染色后, 于光学显微镜下观察脑组织缺血半暗带的病理学改变和炎症细胞浸润情况。

1.5 TTC 染色与脑梗死体积测定 缺血再灌注 24 h 后, 每组取 6 只大鼠, 麻醉后断头、取脑, 置于一 20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻 30 min 后, 将其切成 1.2 mm 厚的脑片, 迅速置于 2% TTC 磷酸缓冲液中, 避光, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 30 min。正常组织染为红色, 梗死组织为白色。在 10% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后拍照, 经扫描仪将底片扫描入计算机后, 应用病理图形分析仪测量脑梗死体积。采用梯形法计算: 脑梗死体积 = $t(A_1 + A_2 + A_3 \cdots + A_n) - (A_1 + A_n)t/2$ (t 为切片厚度, A 为脑梗死面积)。

1.6 免疫组织化学染色检测 采用免疫组织化学法检测大鼠缺血侧 FKN 阳性细胞的表达, 操作均按试剂盒说明严格进行, 室温显色, 在光学显微镜下观察脑缺血侧顶叶皮质 FKN 阳性细胞的表达情况, 每只大鼠观察 2 张切片。FKN 阳性细胞

成像特点:镜下细胞结构清晰,阳性颗粒定位于细胞膜上,呈棕黄色,且着色明显高于背景。在光学显微镜下随机选取 10 个高倍镜视野($\times 400$)采集图片,应用 Image-proplus 图像分析软件测量每张切片中所选区域的平均光密度(AOD)值。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 Newman-Student 多重比较的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经功能缺损评分 大鼠于麻醉后 2~3 h 清醒,假手术组大鼠清醒后未见明显的神经功能缺损症状和体征,其他 4 组大鼠出现左前肢乏力,身体左侧偏斜或旋转,甚至向左侧跌倒。中剂量组和大剂量组大鼠的 Longa 评分均显著低于模型组(P 值均 < 0.05)。见表 1。

2.2 缺血再灌注后脑梗死体积的变化 缺血再灌注后,假手术组大鼠脑组织未见梗死灶,模型组大鼠右侧额顶叶和纹状体均可见较明显的苍白梗死灶,见图 1(见插页)。中剂量组和大剂量组大鼠的脑梗死体积均显著小于模型组(P 值均 < 0.05)。见表 1。

2.3 脑缺血再灌注后缺血半暗带 FKN 阳性细胞的表达 免疫组织化学染色检测结果显示,假手术组仅见极少量 FKN 阳性细胞的表达,而其他 4 组大鼠 FKN 阳性细胞表达增多,见图 2(见插页)。中剂量组和大剂量组大鼠的 AOD 值均显著低于模型组(P 值均 < 0.05),小剂量组和模型组大鼠的 AOD 值均显著高于假手术组(P 值均 < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠 Longa 评分、脑梗死体积、AOD 值的比较
($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Longa 评分 (分)	脑梗死体积 (mm ³)	AOD 值
假手术	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.075 $\pm$ 0.010
模型	2.50 $\pm$ 0.55	24.47 $\pm$ 2.71	0.411 $\pm$ 0.023 ^②
小剂量	2.33 $\pm$ 0.52	23.38 $\pm$ 1.44	0.387 $\pm$ 0.036 ^②
中剂量	1.50 $\pm$ 0.55 ^①	18.45 $\pm$ 1.28 ^①	0.235 $\pm$ 0.024 ^①
大剂量	1.33 $\pm$ 0.52 ^②	16.80 $\pm$ 1.73 ^①	0.218 $\pm$ 0.017 ^①

与模型组比较:① $P < 0.05$;与假手术组比较:② $P < 0.01$

2.4 病理组织学观察 H-E 染色结果显示,假手术组大鼠脑组织结构正常;模型组大鼠呈典型脑梗死改变,即梗死区域神经元细胞数量少,细胞核

碎裂溶解,神经元固缩、坏死,坏死灶边缘有白细胞浸润。与模型组相比,大剂量组和中剂量组大鼠的脑梗死灶较小,光学显微镜高倍镜视野中见两组大鼠细胞肿胀坏死的程度较轻,坏死灶边缘炎性细胞浸润较少。见图 3(见插页)。

3 讨 论

随着人们饮食生活方式的改变和人类社会逐渐呈老龄化趋势,缺血性脑卒中已成为人类致死、致残的主要病因之一。炎症反应作为脑梗死神经细胞缺血坏死的中心机制之一,其机制研究已成为目前研究的热点。FKN 是新近发现的一种兼有黏附和趋化双重活性的特殊的趋化因子,形态学上 FKN 阳性细胞表达主要位于神经元细胞,在血管内皮细胞中也偶有表达,主要为细胞膜着色,呈棕黄色。最近研究发现,FKN 在缺血再灌注损伤出现的炎症反应中可能发挥了重要作用,Frijns 等^[3]发现再灌注 24~48 h,FKN 阳性细胞在缺血半暗带周边解剖形态完整的神经元细胞中的表达明显增多。有研究^[4]结果证实,短暂性脑缺血中 FKN-CX3CR1 这一信号通路可能参与促进小胶质细胞/巨噬细胞和白细胞在缺血反应处的聚集。更近一步的研究^[5]结果显示,CX3CR1 基因缺失大鼠在脑缺血再灌注后表现出脑梗死面积明显缩小和炎症反应减轻,且 IL-1 β 和 TNF- α 表达减少,中性粒细胞浸润减少。心肌缺血再灌注损伤炎症反应机制的类似研究也发现,FKN 及其受体 CX3CR1 在其中起到了重要作用^[6]。本研究结果显示,中剂量组和大剂量组大鼠的 AOD 值均显著低于模型组,且模型组大鼠呈典型的脑梗死改变,即梗死区域神经元细胞数量少,细胞核碎裂溶解,神经元固缩、坏死,坏死灶边缘有白细胞浸润。此外,模型组大鼠脑缺血再灌注 24 h 后 FKN 阳性细胞表达明显增加,相应切片 FKN 阳性细胞表达区域白细胞和巨噬细胞浸润聚集较明显,与上述国外研究结果相似。该结果表明,FKN 可能在缺血再灌注所致的炎症反应中起重要作用,FKN 阳性细胞表达增多可能促进再灌注损伤的炎症反应,使神经元坏死增多,脑损伤程度加重。其机制可能与以下几个方面有关:① FKN 对 T 淋巴细胞、单核细胞有较强的趋化活性,激活浸润的白细胞可以产生释放活性氧、自由基、金属蛋白酶分解和细胞毒性等,从而导致脑损伤;② FKN 以不依

赖选择素和整合素的方式捕获或吸引白细胞紧密黏附^[7],以诱导静息的单核细胞,静息或 IL-2 活化的 CD8⁺ T 淋巴细胞,以及 IL-2 活化的自然杀伤细胞(NK)与内皮细胞紧密黏附、变形,最终穿过血管;③ FKN 与 CX3CR 结合能激活小胶质细胞功能,早期诱导小胶质细胞,从而激活炎症反应介质 IL-1 β 、TNF- α 和氧自由基等参与炎症反应^[8-11]。

PPAR γ 是一种配体激活型转录调控因子,属于核受体超家族成员。马来酸罗格列酮是 PPAR γ 特异激动剂,其激活受体后参与体内糖代谢、脂代谢、炎症反应^[12]、细胞增殖、分化和细胞凋亡等多种病理生理过程。近年有研究^[13]发现,马来酸罗格列酮能减轻实验性肠道、肺、心脏的缺血再灌注损伤,而且可以缩小脑缺血再灌注时的梗死体积,减轻病理损伤,促进神经功能恢复,而 GW9662 等 PPAR γ 拮抗剂则可逆转或者抑制该保护作用。PPAR γ 激动剂对 FKN 的表达和功能有调节作用。动物实验^[14]证实,马来酸罗格列酮可以下调 FKN 的表达,其机制可能与抑制炎症反应介质引起的 NF- κ B 激活有关。本研究结果显示,中、大剂量的马来酸罗格列酮可以减轻缺血再灌注大鼠偏瘫侧肢体神经功能损伤程度,缩小脑梗死体积,减少神经细胞缺血坏死处 FKN 阳性细胞的表达。表明 PPAR γ 激动剂能改善脑缺血再灌注损伤,其机制可能是通过下调 FKN 阳性细胞表达,减少炎症细胞浸润和炎症因子表达,从而起到保护脑组织,改善缺血性脑卒中预后的作用,且 2、5 mg/kg 剂量的马来酸罗格列酮的效果较为显著。

马来酸罗格列酮作为胰岛素增敏剂在糖尿病的治疗中被广泛应用,而糖尿病为缺血性脑卒中最重要发病因素之一,糖尿病的治疗对防治脑卒中具有重要意义。本研究结果提示,马来酸罗格列酮可能通过抑制大鼠脑缺血再灌注损伤后 FKN 阳性细胞的表达起到保护脑组织和改善脑卒中预后的作用,这无疑为合并糖尿病的缺血性脑卒中患者发病前后的综合治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] YOSHIDA T, KURELLA M, BEATO F, et al. Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5): 1646-1654.

[2] GODA S, IMAI T, YOSHIE O, et al. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms[J]. *J Immunol*, 2000, 164(8): 4313-4320.

[3] FRIJNS C J, KAPPELLE L J. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease[J]. *Stroke*, 2002, 33(8): 2115-2122.

[4] TAROZZO G, CAMPANELLA M, GHIANI M, et al. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 15(10): 1663-1668.

[5] DeNES A, FERENCZI S, HALÁSZ J, et al. Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(10): 1707-1721.

[6] FRANGOIANNIS N G. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1877-1893.

[7] FONG A M, ROBINSON L A, STEEBER D A, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8): 1413-1419.

[8] CARDONA A E, PIORO E P, SASSE M E, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(7): 917-924.

[9] JUNG S, ALIBERTI J, GRAEMMEL P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(11): 4106-4114.

[10] DAVALOS D, GRUTZENDLER J, YANG G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo* [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(6): 752-758.

[11] NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo[J]. *Science*, 2005, 308(5726): 1314-1318.

[12] 徐小华, 朱大龙, 俞 匀. 马来酸罗格列酮对糖耐量受损合并代谢综合征患者细胞因子的影响[J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26(15): 1170-1172.

[13] VICTOR N A, WANDER E W, GAMBOA J, et al. Altered PPARgamma expression and activation after transient focal ischemia in rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 24(6): 1653-1663.

[14] PADILLA J, KAUR K, CAO H J, et al. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells[J]. *J Immunol*, 2000, 165(12): 6941-6948.

(收稿日期:2013-12-01)
(本文编辑:许海燕)

• 论 著 •

双腔微导管在冠状动脉慢性完全闭塞病变中的应用

徐泽升 彭万忠 宋志远 马增才 葛均波

【摘要】 目的 总结双腔微导管在冠状动脉慢性完全闭塞(CTO)病变介入治疗中应用的安全性和有效性。**方法** 8 例 CTO 患者的介入治疗过程中应用了双腔微导管,其中 7 例为左前降支闭塞,1 例为右冠状动脉闭塞。**结果** 8 例患者罪犯血管均为 CTO 伴分支病变,前向导丝技术成功 2 例,逆向导丝技术 6 例;双腔微导管经前向引导导管应用 7 例,经逆向侧支循环途径应用 1 例。8 例患者 CTO 病变均成功开通,且均未发生并发症。**结论** 双腔微导管用于 CTO 伴分支病变的介入治疗安全、有效。

【关键词】 慢性完全闭塞病变;经皮冠状动脉介入治疗;双腔微导管

Application of adjunctive double-lumen microcatheter in intervention of chronic total occlusion * XU Zesheng, PENG Wanzhong, SONG Zhiyuan, MA Zengcai, GE Junbo * Department of Cardiology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, Hebei, China

Corresponding author: GE Junbo. E-mail: ge.junbo@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the safety and efficacy of adjunctive double-lumen microcatheter in the intervention of chronic total occlusion. **Methods** Eight patients with chronic total occlusion were treated by adjunctive double-lumen microcatheter. The culprit vessel was left anterior descending coronary artery in 7 patients and right coronary artery in one patient. **Results** The target lesions of eight had all total occlusion with side branch. Antegrade technique was successful in 2 patients, and retrograde technique was successful in 6 patients. Retrograde technique was used in 6 patients, and antegrade technique was applied in 2 patients. Adjunctive double-lumen microcatheter was used through antegrade guiding catheter in 7 patients and through retrograde guiding catheter in one patient. All occlusion lesions were successfully treated and no perioperative complications occurred. **Conclusion** Adjunctive double-lumen microcatheter is safe and effective for chronic total occlusion with bifurcation. (Shanghai Med J, 2015, 38: 23-25)

【Key words】 Chronic total occlusion; Percutaneous coronary interventional therapy; Adjunctive double-lumen microcatheter

新器械的研发是提高冠状动脉慢性完全闭塞病变(CTO)介入治疗成功率的关键因素之一。在 CTO 介入治疗早期,临床医师专注于冠状动脉导丝的研制。近期研发的不同类型微导管倍受关注,逆向导丝技术的广泛应用,使 CTO 介入治疗的成功率有所提高,但介入治疗的成功率差别较大,为 80%~96.0%^[1-3]。从经典的微导管(Finecross)到螺旋穿透微导管(Tornus)^[4],再到扩张微导管(Corsair)^[5],满足了不同 CTO 病变类型介入治疗的需求。近期研发的双腔微导管(adjunctive double-lumen microcatheter)丰富了微导管家族的内容,双腔微导管(Crusade,日本 Osaka 公司)研制的目的是将其应用于冠状动脉分叉病变的介入治疗。目前冠状动脉 CTO 病变的介入治疗是心血管介入治疗的难点之一,由于其成功率低,并发症发生率高,被称为心血管介入领域的“最后堡垒”。闭塞处存在分支、无残端的开口闭塞、闭塞时间长等因素进一步增加了技术难度,使成功率明显降低^[6]。在 CTO 病变中,双腔微导管巧妙地利用闭塞处存在分支,端孔导丝稳定微导管以提供支撑力,加上逆向导丝技术的应用,提高了 CTO 伴分支病变的治疗成功率。本研究旨在观察双腔微导管在 CTO 介入治疗中的应用价值。

作者单位: 061001 河北沧州,沧州市中心医院心内科(徐泽升、彭万忠、宋志远、马增才);复旦大学附属中山医院心内科,上海市心血管病研究所(葛均波)

通信作者: 葛均波,电子邮箱为 ge.junbo@zs-hospital.sh.cn

技术失败后,改用逆向导丝技术。应用 RG3(长度为 330 cm)导丝 3 例,微导管交接技术 2 例,再转换成前向导丝:RG3 从前向引导导管引出体外,通过 RG3 的头端进行球囊扩张,扩张后引起严重的冠状动脉夹层或闭塞处分支形成,前向导丝无法进入远端真腔,沿 RG3 的头端送入双腔微导管,双腔微导管跨越夹层,沿双腔微导管的侧孔送入前向导丝,前向导丝顺利进入主支血管的真腔(见图 7、8,见插页)。另 1 例患者也是 LAD 中段闭塞,闭塞处发出 S1,LAD 闭塞处为成角病变,前向应用双腔微导管、U 型导丝技术均不能成功。遂逆行导丝进入 S1,双腔微导管经过侧支循环逆行进入 S1,侧孔导丝逆行进入主支血管(图 9、10,见插页),手术成功。

2.3 双腔微导管端孔、侧孔导丝的选择 端孔导丝 NS 4 例,BMW 4 例。侧孔导丝 Pilot50 导丝 4 例,Pilot150 导丝 1 例,Miracle3 导丝 2 例,Miracle6 导丝 2 例,Ultimatee3 导丝 1 例,Fielder XT 导丝 1 例。

2.4 住院和随访情况 在住院期间无 1 例患者发生并发症和死亡,随访 3~36 个月无主要不良心脏事件发生。

3 讨 论

本研究中,2 例患者应用前向导丝技术成功,其 CTO 闭塞处存在大的分支,断端不明确。双腔微导管的应用,化弊为利,端孔分支导丝可以固定双腔微导管,侧孔导丝可以寻找方向穿刺病变,并更换不同类型的导丝,成功开通闭塞处存在分支的 CTO 病变。双腔微导管的操作经验与技巧:端孔导丝选用常用工作导丝(BMW、NS),可以增加双腔微导管的支撑力,又不易引起导丝穿孔,而侧孔导丝选择中等硬度的导丝(Pilot50、Miracle)起步,逐步增加导丝的硬度,穿刺闭塞近端纤维帽,侧孔导丝容易“顶”到断端,依靠双腔微导管提供的支撑力,使侧孔导丝穿刺闭塞近端纤维帽的成功率提高。

对于闭塞段严重冠状动脉夹层的患者,前向冠状动脉导丝无法通过严重的冠状动脉夹层进入远端真腔。本研究中,5 例前向导丝技术失败的复杂 CTO 患者应用 RG3 导丝或微导管交接技术^[7],将逆向导丝转换成前向导丝,由于采用反向往前向和逆行导引钢丝内膜下寻径技术

(CART),应用双腔微导管,经逆向导丝,由端孔送双腔微导管到夹层远端,再经侧孔送入另 1 根导丝,这样侧孔导丝跨越冠状动脉夹层段,调整方向,前向导丝顺利进入主支远端真腔,与 Chiu^[8]报道的经验相似。

本研究中,1 例患者逆向应用双腔微导管成功,逆向导丝反复进入 S1,逆向送入双腔微导管成功,双腔微导管的头端直径大于扩张微导管,通过性较扩张微导管差。本例患者的间隔支侧支粗大且迂曲少,双腔微导管能通过间隔支侧支循环,是本例成功的重要条件。

本课题组的初步经验表明,双腔微导管用于 CTO 伴分支病变是一种有效、操作简单、可靠的方法,可提高复杂 CTO 介入手术的成功率。双腔微导管逆向途径的应用还需要积累更多的经验。

参 考 文 献

- [1] RATHORE S, KATOH O, MATSUO H, et al. Retrograde percutaneous recanalization of chronic total occlusion of the coronary arteries: procedural outcomes and predictors of success in contemporary practice[J]. Circ Cardiovasc Interv, 2009, 2(2): 124-132.
- [2] KIMURA M, KATOH O, TSUCHIKANE E, et al. The efficacy of a bilateral approach for treating lesions with chronic total occlusions the CART (controlled antegrade and retrograde subintimal tracking) registry [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2009, 2(11): 1135-1141.
- [3] 葛 雷, 马健英, 秦 晴, 等. 中国冠状动脉慢性闭塞病变介入治疗现状初步调查[J]. 上海医学, 2009, 32(12): 1049-1052.
- [4] 葛均波, 黄 东, 张 峰, 等. 螺旋穿透微导管(Tornus)在冠状动脉慢性完全闭塞病变介入治疗中的应用[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2008, 16(4): 184-186.
- [5] 葛均波, 葛 雷, 马剑英, 等. 扩张微导管在冠状动脉慢性完全闭塞病变中的应用[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2010, 18(1): 1-4.
- [6] 李晨光, 沈 怡, 戴宇翔, 等. 冠状动脉慢性完全闭塞性病变治疗策略选择的相关影响因素[J]. 上海医学, 2012, 35(3): 210-215.
- [7] MURAMATSU T, TSUKAHARA R, ITO Y. “Rendezvous in coronary” technique with the retrograde approach for chronic total occlusion[J]. J Invasive Cardiol, 2010, 22(9): E179-E182.
- [8] CHIU C A. Recanalization of difficult bifurcation lesions using adjunctive double-lumen microcatheter support: two case reports [J]. J Invasive Cardiol, 2010, 22(6): E99-E103.

(收稿日期:2014-02-02)

(本文编辑:王小燕)

• 论 著 •

左西孟旦治疗心力衰竭效果的 Meta 分析

江明芳 尚亚东 乔 亮 俞瑞群 张家美

【摘要】 目的 评价左西孟旦治疗心力衰竭的临床疗效和安全性。**方法** 计算机检索中国知网(CNKI)、中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisk)、维普中文科技期刊数据库(VIP)、万方数据库、PubMed 和 Cochrane library 中有关左西孟旦(左西孟旦组)与其他某一种药物(多巴酚丁胺或米力农或呋塞米或安慰剂,对照组)治疗心力衰竭的疗效对比研究。应用 RevMan5.2.4 软件对各项随机对照研究的左心室射血分数(LVEF)、B 型脑钠肽(BNP)水平、每搏量(SV)、左心室舒张末内径(LVEDD)和临床疗效进行 Meta 分析。**结果** 共纳入 12 个临床随机对照研究,共 699 例患者,与对照组相比,左西孟旦组的临床疗效显著提高($RR=3.27, 95\%CI$ 为 $1.81\sim5.92, P<0.0001$), LVEF[加权均数差(WMD)= $3.72, 95\%CI$ 为 $2.84\sim4.61$], SV 值(WMD= $10.78, 95\%CI$ 为 $5.27\sim16.29$)均显著升高(P 值均 <0.0001), BNP 水平显著降低(WMD= $458.48, 95\%CI$ 为 $395.55\sim521.42, P<0.01$), LVEDD 的差异无统计学意义(WMD= $0.92, 95\%CI$ 为 $-0.73\sim2.58, P=0.27$)。8 篇文献提及具体不良反应,经减小药物剂量等处理后症状消失。**结论** 应用左西孟旦治疗心力衰竭安全、可靠,值得在临床推广应用。

【关键词】 左西孟旦; 心力衰竭; Meta 分析

Meta-analysis of clinical curative effect of levosimendan injection on heart failure * JIANG Mingfang, SHANG Yadong, QIAO Liang, YU Ruiqun, ZHANG Jiamei. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui, China

Corresponding author: ZHANG Jiamei. E-mail: Zhangjm72321888@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the safety and efficacy of levosimendan injection for heart failure. **Methods** The literatures on randomized controlled trials (RCTs) between levosimendan and placebos (dobutamine, milrinone, frusemide, etc) for treating heart failure were searched in China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Chinese Biomedical disk (CBMdisk), VIP Chinese periodical database (VIP), Wanfang database, PubMed and Cochrane library. The left ventricular ejection fraction (LVEF), brain natriuretic peptide (BNP), stroke volume (SV), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and clinical outcome were investigated by RevMan 5.2.4 software for meta-analysis. **Results** Eventually, 12 RCTs (699 patients) were enrolled in the study. Compared with control group, clinical symptoms were significantly improved after levosimendan application ($RR=3.27, 95\%CI: 1.81-5.92, P<0.0001$); LVEF ($WMD=3.72, 95\%CI: 2.84-4.61$) and SV ($WMD=10.78, 95\%CI: 5.27-16.29$) were significantly increased (both $P<0.0001$); BNP level was significantly decreased ($WMD=458.48, 95\%CI: 395.55-521.42, P<0.01$); but LVEDD was not reduced ($WMD=0.92, 95\%CI: -0.73-2.58, P=0.27$). Adverse reaction related to levosimendan injection was mentioned in 8 trials, but the symptoms disappeared after reducing the dose of levosimendan. **Conclusion** Levosimendan is safe and reliable in the treatment of heart failure. It can be widely used in clinic. (Shanghai Med J, 2015, 38; 26-31)

【Key words】 Levosimendan; Heart failure; Meta-analysis

目前,中国最新的心力衰竭治疗指南^[1]推荐

应用利尿剂、血管紧张转换素酶抑制剂(ACEI)、 β 肾上腺素能受体阻滞剂、醛固酮受体拮抗剂和正性肌力药物治疗心力衰竭。早期应用小剂量多巴胺联合呋塞米较单独应用利尿剂能更有效地改善

作者单位:233030 安徽蚌埠,蚌埠医学院(江明芳、尚亚东);
上海市中西医结合医院(乔亮、俞瑞群、张家美)
通信作者:张家美,电子邮箱为 Zhangjm72321888@sina.com

体液潴留和心力衰竭症状,保护脏器功能^[2]。左西孟旦作为一种新型的钙增敏剂,其主要作用机制是通过与心肌细胞上肌钙蛋白 C 结合,增加肌丝对钙的敏感性,从而增强心肌收缩,并通过介导 ATP 敏感的钾通道,起到扩张冠状动脉和外周血管,以及改善顿抑心肌的作用,从而减轻缺血并纠正血流动力学紊乱。因此,这种不增加心肌氧耗的正性肌力药得到越来越多的临床医师关注。本研究拟通过对左西孟旦治疗心力衰竭的临床随机对照试验(RCT)进行 Meta 分析、评价,以进一步了解左西孟旦注射液治疗心力衰竭的临床疗效和安全性。

1 对象与方法

1.1 文献资料纳入标准和排除标准 纳入标准:

① 研究类型为临床 RCT;② 研究对象均符合心力衰竭的诊断标准^[3],纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级为Ⅲ或Ⅳ级,原发病包括冠状动脉性心脏病、风湿性心脏病、缺血性心肌病、扩张型心肌病、高血压性心脏病等;③ 干预措施,对照组患者在应用符合现代心力衰竭治疗指南的常规治疗的基础上加用多巴酚丁胺或米力农或其他安慰剂,左西孟旦组患者在常规治疗的基础上加用左西孟旦注射液治疗,两组患者的治疗时间均 ≥ 24 h;④ 观察指标为 B 型脑钠肽(BNP)水平、每搏量(SV)、左心室射血分数(LVEF)、左心室舒张末内径(LVEDD)、临床疗效和安全性指标。排除标准:以急性心肌梗死、严重的瓣膜疾病和心包疾病、恶性肿瘤、恶性致死性心律失常所致心力衰竭为主要研究对象的临床研究文献;动物实验和机制研究的文献;个案报道和综述、经验报道;实验设计不严谨,统计方法不恰当,数据分析与讨论中不一致。

1.2 检索策略 计算机检索:中国知网(CNKI)、中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisk)、维普中文科技期刊数据库(VIP)、万方数据库、PubMed 和 Cochrane library 等。检索关键词:左西孟旦注射液、心力衰竭、心功能不全、Levosimendan、heart failure、cardiac failure。检索时间为建库至 2014 年 2 月 28 日。

1.3 文献筛选和资料提取 由两名研究者分别独立检索文献,阅读文题和摘要,根据文献资料

纳入和排除标准选择资料,并根据 Cochrane Reviews Handbook 简单法^[4]评价文献质量,意见不一致时通过请教专家或讨论决定。

1.4 统计学处理 应用 Revman 5.2.4 统计学软件。计量资料以 RR 、加权均数差(WMD)、95% CI 作为效应指标。2 个和 2 个以上采用同一疗效指标的研究首先进行异质性检验,若 $P > 0.1$ 或 $I^2 < 50\%$,表示各研究间异质性小,可以采用固定效应模型进行分析; $P \leq 0.1$ 或 $I^2 \geq 50\%$,表示各研究间存在异质性,进一步查找产生异质性的原因,然后采用随机效应模型进行分析。各统计检测结果以森林图表示;发表偏倚采用倒漏斗图表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 文献检索结果 通过数据库和其他途径初步检出文献 378 篇,纳入 12 篇 RCT^[5-16],其中英文文献 6 篇,中文文献 6 篇。

2.2 文献的基本情况和质量评级 12 个 RCT 纳入 699 例心力衰竭患者,2 个 RCT 未明确提及性别,10 个 RCT 提及性别构成,男性占 66.7% (393/589),女性占 33.3% (196/589)。12 个 RCT 均提及年龄,年龄为 40~80 岁, NYHA 心功能分级为Ⅲ或Ⅳ级。12 个 RCT 均将静脉注射左西孟旦注射液作为干预手段,治疗剂量多为起始剂量 10~12 $\mu\text{g}/\text{kg}$,10 min 后以 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 持续静脉滴注 24 h;或以 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 持续静脉滴注 24 h。临床疗效:显效为 NYHA 心功能分级提高 ≥ 2 级,有效为分级提高 1 级,无效为分级提高 < 1 级,恶化为分级降低或死亡;总有效率=显效率+有效率。根据随机分配方案产生、分配方案隐藏、盲法、数据结果不完整、选择性报告结果、有无其他影响真实性因素等方面评价文献质量,符合要求为 A 级,不清楚为 B 级,否为 C 级;如果各评价条目均为 A 级,所有评价指标均详细描述,质量评为 A 级;若有 ≥ 1 个条目为 B 级,所有评价指标中至少有 1 项指标提及但未详细描述,质量评为 B 级;如果有 ≥ 1 个条目为 C 级,所有评价指标中至少 1 项指标为不充分或未使用,质量评为 C 级。12 篇文献的基本情况和质量评级见表 1。

文献	发表时间 (年)	<i>N</i>	男/女 (<i>n/n</i>)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	干预措施 (左西孟旦组/对照组)	治疗时间 (h)	观察指标
李春华 ^[5]	2007	40		65.85±9.65	左西孟旦/多巴酚丁胺	72	LVEF、SV、LVESV、 LVEDV
苏丽军等 ^[6]	2008	26	19/7	57.08±17.01	左西孟旦/多巴酚丁胺	72	生化指标、LVEF、SV
殷泉忠等 ^[7]	2012	50	17/33	59±9	左西孟旦/米力农	72	LVEF、BNP、LVEDD、 24 h 尿量
陈云红等 ^[8]	2013	43	28/15		左西孟旦/多巴酚丁胺	24	SV、LVEF、血钾、血钙
李文霞等 ^[9]	2013	29	17/12	66.2±4.5	左西孟旦/常规治疗	24	BNP、尾加压素、 LVDD、LVEF
陆洋等 ^[10]	2013	37	31/6	56.27±9.42	左西孟旦/多巴酚丁胺	24	LVEF、SV、BNP、hs-CRP、 IL-6、TNF-α
Kurt 等 ^[11]	2010	29	17/12	63.31±11.87	左西孟旦/常规治疗	24	LVEF、BNP、BUN、血钾
Parissis 等 ^[12]	2007	42	35/7	66±8	左西孟旦/安慰剂	24	BNP、LVEF、6MWT
Kasikcioglu 等 ^[13]	2005	15		59±10	左西孟旦/安慰剂	24	LVDD、LVEF、LVDS、HR
Ikonomidis 等 ^[14]	2007	21	19/2	63±8	左西孟旦/安慰剂	24	LVEF、BNP、E/A 组
Parissis ^[15]	2006	17	16/1	67±6	左西孟旦/安慰剂	720	LVEDD、LVEF、BNP、hs-CRP
Malfatto 等 ^[16]	2012	22	16/6	70.5±7.2	左西孟旦/呋塞米	12	LVEF、BNP、LVEDV

hs-CRP:超敏CRP;BUN:尿素氮;6MWT:6 min 步行距离;HR:心率;LVESV:左心室收缩末容积;LVEDV:左心室舒张末容积;LVDD:左心室舒张末内径;E/A 值:E 峰与 A 峰流速比值

床疗效显著高于对照组($RR=3.27, 95\%CI$ 为 $1.81\sim5.92, P<0.0001$), 见图 1。



LVEF 值显著高于对照组 ($WMD=3.72, 95\%CI$ 为 $2.84\sim4.61, P<0.0001$), 见图 2。

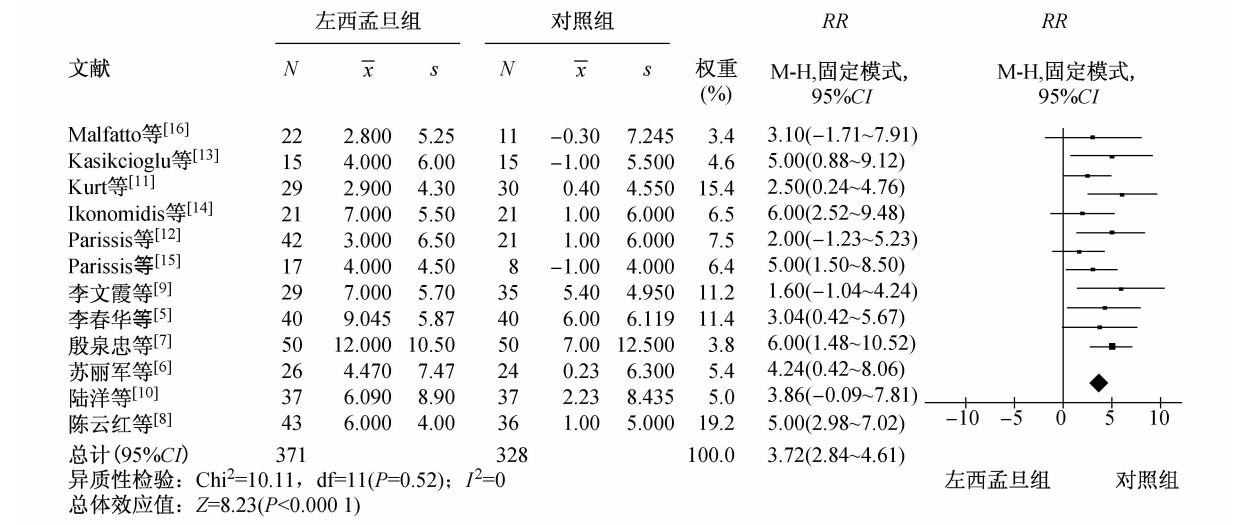


图 2 LVEF 改善情况

2.5 SV 共纳入 4 个 RCT^[5,6,8,10], 4 个研究间无 且组能有效增加心脏的 SV (WMD = 10. 78, 异质性 (I² = 0, P = 1. 00), 与对照组相比, 左西孟 95%CI 为 5. 27~16. 29, P<0. 000 1), 见图 3。

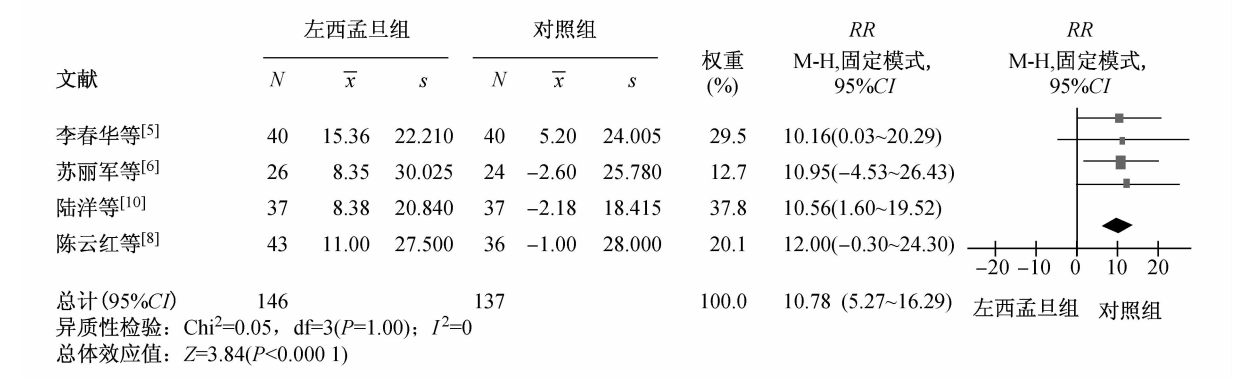


图 3 SV 改善情况

2.6 BNP 共纳入 5 个 RCT^[7,10,12,14,16], 5 个研究 孟旦组能有效降低 BNP 水平 (WMD = 458. 48, 95% CI 为 395. 55~521. 42, P<0. 000 01), 见图 4。

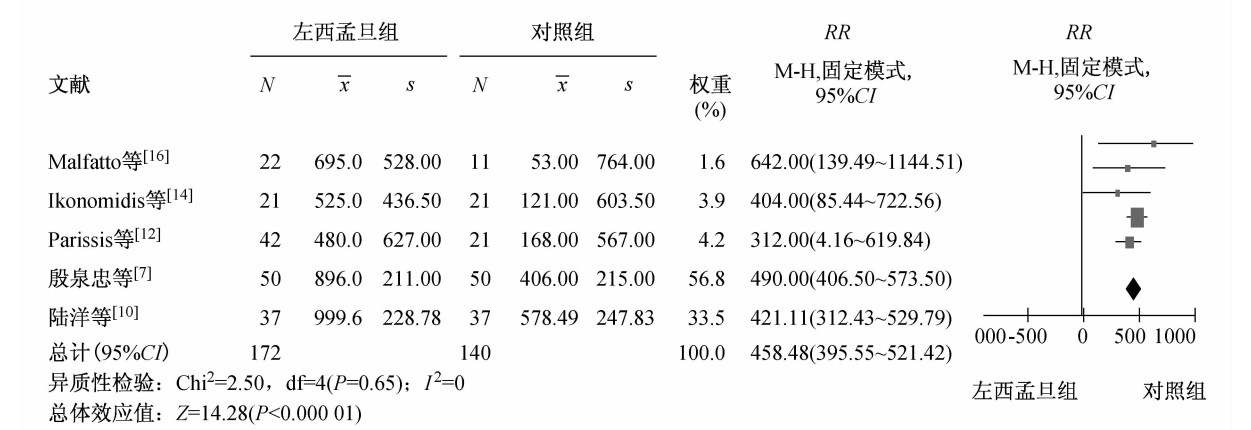


图 4 BNP 改善情况

2.7 LVEDD 共纳入 4 个 RCT^[7,9,13,15], 4 个研究 西孟旦组 LVEDD 的差异无统计学意义 (WMD = 间无异质性 (I² = 39%, P = 0. 18), 与对照组相比, 左 0. 92, 95%CI 为 -0. 73~2. 58, P = 0. 27), 见图 5。

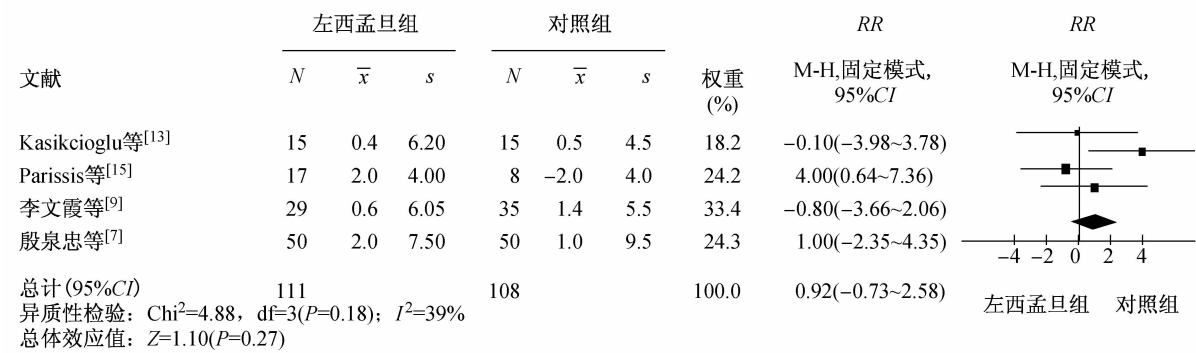


图 5 LVEDD 改善情况

2.8 不良反应 12 篇文献中,8 篇提及具体不良反应,4 篇未提及,均为静脉输液过程中由左西孟旦扩血管作用产生的不适症状,如头痛、低血压、低血钾等,予减小药物剂量等处理后症状消失。8 篇提及不良反应的文献中,4 篇^[5-6,8,10]将左西孟旦与多巴酚丁胺进行比较,左西孟旦组出现不良反应 37 例,多巴酚丁胺组 32 例,两组间不良反应发生率的差异无统计学意义($\chi^2=0.151$, $P=0.698$);2 篇^[9,11]将左西孟旦与常规治疗进行比较,两组间不良反应率发生的差异无统计学意义($\chi^2=0.873$, $P=0.350$);1 篇^[12]将左西孟旦与安慰剂进行比较,两组间不良反应发生率的差异无统计学意义($\chi^2=2.716$, $P=0.099$);另 1 篇^[7]也将左西孟旦与安慰剂进行比较,两组间不良反应率的差异无统计学意义($\chi^2=1.772$, $P=0.183$)。

2.9 发表文献偏倚 进一步行 Egger 检验, Egger 检验系数为 0.832 3($P=0.449$),纳入文献无发表偏倚。见图 6。

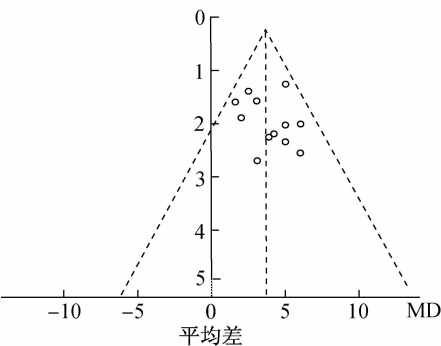


图 6 纳入文献发表偏倚

3 讨 论

左西孟旦作为一种新型的钙增敏剂,因其具有正性肌力作用而被应用于治疗心力衰竭,主要

作用机制如下。① 增加肌钙蛋白对钙的敏感性:左西孟旦可直接与肌钙蛋白结合,使钙离子诱导的促进心肌收缩的构象保持稳定,从而增加心肌收缩力,且在增加心肌收缩力的同时不影响心脏的舒张功能^[17]。② 扩血管作用:左西孟旦可激活 ATP 敏感型钾通道,使其开放,扩张血管,增加冠状动脉和其他脏器的血供^[18]。

本分析结果显示,在心力衰竭的治疗过程中加用左西孟旦,能显著提高临床疗效,增加 LVEF 和 SV,降低 BNP 水平。有研究^[19]结果表明,心力衰竭超声指数能客观、简便地评价心力衰竭的程度,LVEDD 是评价心脏舒张功能的重要指标,并被作为心力衰竭超声指数的构成部分。但本分析结果显示,左西孟旦并不能减小 LVEDD。由于目前很多研究都未把 LVEDD 纳入观察指标,使左西孟旦对心力衰竭的远期疗效不能得到更好的评估,需要更多、更大的临床研究来进一步验证。左西孟旦组与对照组间不良反应发生率的差异无统计学意义,且均为输液过程中由左西孟旦扩血管作用产生的头痛、低血压等,予减小药物剂量等处理后症状消失。

本 Meta 分析的局限性如下。① 由于本次纳入的文献均未实施双盲原则,存在着偏倚风险,使得纳入的 12 篇文献的总体质量较差,可能对整个评价的可靠性产生影响。② 有 4 篇文献的研究对象数量<50 例。③ 最长的观察时间为 30 d,无 1 篇文献提及治疗后患者的再入院率和病死率等指标,故目前关于左西孟旦对心力衰竭患者的远期疗效尚不能明确。

综上所述,在心力衰竭的基础治疗上加用左西孟旦,能有效地改善临床症状和相关指标,且不良反应少,患者耐受性好,值得在临床推广应用。但对于其远期预后尚缺乏有力证据,需要更多设

计合理、多中心、大样本、随机对照、双盲试验来进一步验证。

参 考 文 献

[1] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 98-122.

[2] 胡立群, 顾 晔, 高 波, 等. 早期应用小剂量多巴胺联合呋塞米对合并体液潴留心力衰竭的治疗价值[J]. 上海医学, 2010, 33(7): 623-625.

[3] ZIPES D P, LIBBY P, BONOW R O. 心脏病学[M]. 陈灏珠, 译. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 512-531.

[4] HIGGINS J P T, GREEN S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0 [updated March 2011][M/OL]. The Cochrane Collaboration, 2011. <http://handbook.cochrane.org/>

[5] 李春华. 静脉注射左西孟旦与多巴酚丁胺治疗心功能Ⅲ—Ⅳ级心力衰竭的对比研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2007.

[6] 苏丽军, 白小娟, 王 标, 等. 左西孟旦注射液治疗充血性心力衰竭的疗效评价[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(2): 263-266.

[7] 殷泉忠, 崔俊友, 郑若龙, 等. 左西孟旦治疗慢性心力衰竭急性失代偿患者的临床观察[J]. 江苏大学学报(医学版), 2012, 22(5): 448-451.

[8] 陈云红, 陈景开, 刘 海, 等. 左西孟旦与多巴酚丁胺治疗急性失代偿心力衰竭患者的疗效比较[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(2): 237-239.

[9] 李文霞, 许 云, 皇甫卫忠. 左西孟旦注射液对慢性心力衰竭患者血浆 NT-proBNP、尾加压素水平的影响[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(8): 583-585.

[10] 陆 洋, 张跃明, 颜永进. 左西孟旦对急性心力衰竭患者 NT-proBNP 和炎症反应标志物的影响[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(11): 1515-1517, 1520.

[11] KURT I H, YAVUZER K, BATUR M K. Short-term effect of levosimendan on free light chain kappa and lambda levels in patients with decompensated chronic heart failure

[J]. Heart Vessels, 2010, 25(5): 392-399.

[12] PARISSIS J T, PAPADOPOULOS C, NIKOLAOU M, et al. Effects of levosimendan on quality of life and emotional stress in advanced heart failure patients[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(4): 263-268.

[13] KASIKCIOGLU H A, UNAL S, TARTAN Z, et al. Effects of levosimendan on left ventricular functional remodelling and exercise intolerance: a tissue Doppler study[J]. J Int Med Res, 2005, 33(4): 397-405.

[14] IKONOMIDIS I, PARISSIS J T, PARASKEVAIDIS I, et al. Effects of levosimendan on coronary artery flow and cardiac performance in patients with advanced heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2007, 9(12): 1172-1177.

[15] PARISSIS J T, ADAMOPOULOS S, FARMAKIS D, et al. Effects of serial levosimendan infusions on left ventricular performance and plasma biomarkers of myocardial injury and neurohormonal and immune activation in patients with advanced heart failure[J]. Heart, 2006, 92(12): 1768-1772.

[16] MALFATTO G, DELLA ROSA F, VILLANI A, et al. Intermittent levosimendan infusions in advanced heart failure: favourable effects on left ventricular function, neurohormonal balance, and one-year survival [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 60(5): 450-455.

[17] DUYGU H, NALBANTGIL S, OZERKAN F, et al. Effects of levosimendan on left atrial functions in patients with ischemic heart failure[J]. Clin Cardiol, 2008, 31(12): 607-613.

[18] 张宇辉, 卿恩明, 张 健, 等. 国产左西孟旦与多巴酚丁胺治疗急性失代偿性心力衰竭患者血液动力学和疗效对比观察[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(8): 555-558.

[19] 戴 敏, 杨俊华, 徐苏丹, 等. 应用心衰超声指数评价舒张性心力衰竭的临床价值[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(21): 1706-1708.

(收稿日期:2014-08-01)

(本文编辑:王小燕)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《上海医学》杂志对二次发表问题处理的声明

以往为了扩大读者面和迅速传播研究的结果, 允许论文以不同语种再次发表。随着我国科技、经济的飞速发展, 国际交流日益频繁, 以中文发表的研究结果可能被 Medline 检索到, 经《上海医学》第四届编委会集体讨论, 现将我刊对二次发表的处理声明如下: ① 2011 年 1 月 1 日起, 本刊不再接受不同语种的二次发表; ② 在专业学术会议上交流的论文, 在全文刊出时, 应注明部分结果在某学术会议上交流。

利用 CT 图像脂肪自动识别程序进行 内脏脂肪测量和肥胖分型

邹诚实

【摘要】 目的 探讨利用 CT 图像脂肪自动识别程序进行内脏脂肪测量和肥胖分型的可行性。**方法** 对 85 名志愿者的肚脐、L₄ 和 L₅ 椎体平面进行常规条件 CT 扫描,所得图像应用 AVS/Express 高级可视化系统开发的 CT 图像脂肪自动识别程序按 -190~-30 Hu 的脂肪值范围对腹壁皮下脂肪面积(SA)、腹腔内脏器脂肪面积(VA)、腹围(WC)进行自动识别计算,根据上述计算值和 BMI 实现肥胖分型。使用 SPSS 19.0 统计学软件分析 VA 和 SA 与年龄、WC、BMI 的相关性。**结果** 85 名志愿者的腹部 CT 图像导入脂肪识别程序进行脂肪自动识别,有 75 名自动画出的感兴趣区域(ROI)框体符合要求无需调整,10 名需经再次手动细调后进行计算。84 名能在 1 s 内成功计算出 WC 和 VA、SA,成功率为 98.8%。85 名志愿者中,共 22 名(25.9%)VA≥100 cm²,VA≥100 cm² 者的 BMI、WC、VA、SA 均显著高于 VA<100 cm² 者(P 值均<0.001)。Pearson 相关分析表明,男性 VA 与 BMI、WC、SA 均呈正相关($r=0.729, 0.861, 0.783, P$ 值均<0.000 1),与年龄不相关($P>0.05$);女性 VA 与年龄、BMI、WC、SA 均呈正相关($r=0.469, 0.506, 0.752, 0.513, P=0.010, 0.005, 0.000 1, 0.004$)。VA 与 WC 的相关性最好,男性所得直线方程为 $y=4.460x-274.116$ ($r=0.861$),女性为 $y=2.754x-151.091$ ($r=0.752$)。男性和女性 SA 与 BMI、WC、VA 均呈正相关(男性, $r=0.832, 0.891, 0.783, P$ 值均<0.000 1;女性, $r=0.773, 0.490, 0.513, P=0.000 1, 0.007, 0.004$),与年龄均不相关(P 值均>0.05)。**结论** 利用 CT 图像脂肪自动识别程序进行内脏脂肪测量和肥胖分型切实可行。

【关键词】 腹部脂肪; 断层摄影术; X 线计算机; 测量; 计算机辅助

Visceral adipose measurement and obesity classification by CT image automatic identification technique of abdominal adipose ZOU Chengshi. Department of Radiology, Cixi Traditional Chinese Medicine Hospital, Cixi 315300, Zhejiang, China

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of visceral adipose measurement and obese classification by CT image automatic identification technique of the abdominal adipose. **Methods** The navel and the 4—5 lumbar vertebrae of 85 volunteers were scanned by CT under general condition. The abdominal subcutaneous adipose area (SA) and visceral adipose area (VA) and waist circumference (WC) were calculated by automatic identification program for adipose (ranged from -190 Hu to -30 Hu). Software environment used in development was AVS/Express. Then obesity was classified according to SA, VA, WC and body mass index (BMI). The correlation between VA, SA and age, WC, BMI were analyzed by using SPSS 19.0. **Results** After CT scanning, regions of interest (ROI) were automatically drawn without adjustment in 75 cases, while ROI had to be adjusted manually in 10 cases. Anthropometric variables (WC, VA, SA) were successfully calculated within one second in 84 cases and the success rate was 98.8%. There were 22 cases (25.9%) with VA≥100 cm², and their anthropometric variables (BMI, WC, VA, SA) were significantly higher than those with VA<100 cm² (all $P<0.001$). Pearson correlation analysis showed that, in males, VA was positively correlated with BMI, WC and SA ($r=0.729, 0.861$ and 0.783 , all $P<0.000 1$), while it was not associated with age ($P>0.05$); in females, VA was positively correlated with age, BMI, WC and SA ($r=0.469, 0.506, 0.752$ and $0.513, P=0.010, 0.005, 0.000 1, 0.004$). The best correlation was found between VA and WC. The linear equations were as follows: $y=4.460x-274.116$ ($r=0.861$ in males), $y=2.754x-151.091$ ($r=0.752$ in females). The human SA was positively correlated with anthropometric variables (BMI, WC, VA; male: $r=0.832, 0.891, 0.783$, all $P<$

0.000 1; female: $r=0.773, 0.490, 0.513, P=0.000\ 1, 0.007, 0.004$). However, SA was not related to age (both $P>0.05$). **Conclusion** It is feasible to carry out visceral adipose measurement and obesity classification by the CT image automatic identification technique. (Shanghai Med J, 2015, 38: 32-35)

【Key words】 Abdominal adipose; Tomography; X-ray computed, measurement; Computer assisted

研究^[1-5]表明,高血压、糖尿病、高脂血症、高尿酸血症和胰岛素抵抗等心血管危险因素不但与人体总体脂增加有关,还与腹部脂肪特别是腹腔内脂肪增加有关。在长期的临床实践中逐渐发现,人体脂肪组织(AT)向心性分布的肥胖比周围性分布的肥胖与糖尿病、痛风、动脉粥样硬化等有更密切的联系,提出肥胖并发症的发生与人体 AT 的分布有关^[6]。近年来,对肥胖的研究重点已从单纯的脂肪量和肥胖程度转移到 AT 分布上,从而需要一种既能有效地评价人体总的脂肪水平,又能对区域性分布的 AT 进行定量的测量技术^[7]。本研究采用 AVS/Express 高级可视化系统开发的 CT 图像脂肪自动识别程序(以下简称脂肪识别程序)进行内脏脂肪测量和肥胖分型,并进行腹壁皮下脂肪面积(SA)和腹腔内脏器脂肪面积(VA)与年龄、腹围(WC)、BMI 的相关性分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象 健康志愿者 85 名,男 53 名,女 32 名;年龄 11~94 岁,平均年龄为(47.4±17.1)岁。纳入标准:发育正常,无特殊器质性病变。排除标准:消耗性疾病或严重肥胖患者。研究对象按性别分组,研究前向受试者说明本次研究的意义、方法和有关注意事项。

1.2 总体脂和局部体脂的测量^[8-9] 总体脂以 BMI(实测体重/身高²)表示。身高和体重的测量要求赤脚,男女均只穿内裤。测量身高时应双脚

跟后部、臀部和头枕部 3 点在一垂直线上,数据以 m 计算,精确到±0.01 m;测量体重时要求空腹且排空大、小便,数据以 kg 计算,精确到±0.5 kg。局部体脂以 SA 和 VA 表示。采用西门子 PLUS4 单层螺旋 CT 对志愿者的肚脐、L₄ 和 L₅ 椎体平面进行常规条件 CT 扫描,扫描参数为层厚 10 mm、层间距 10 mm、螺距 1、管电压 120 kV、管电流 170~200 mA,扫描时间为 1 s,扫描完成后,将图像传到医学图像传输与存储(PACS)系统。脂肪识别程序读取来自 PACS 系统的腹部 CT 图像 DICOM 文件,将腹部 CT 图像阈值化与快速区域填充方法结合起来,通过合理地选取脂肪阈值(−190~−30 Hu)和提取关系,如≥阈值、≤阈值等,可从图像中提取研究需要的目标图像及其边界,测量所提取的目标图像的面积和周长,并根据腹壁肌肉 CT 值高于腹壁内、外脂肪 CT 值所产生的分水岭效应自动画出感兴趣区域(ROI)框,ROI 框可以再次手动细调来精确符合腹壁形态,框内计算 VA,框外计算 SA 和 WC。见图 1(见封三)。

1.3 肥胖分型标准 国际上将成人 BMI≥25 kg/m²、VA≥100 cm² 诊断为内脏脂肪型肥胖;成人 BMI<25 kg/m²、VA≥100 cm² 诊断为内脏脂肪蓄积。BMI 切点 24 kg/m² 为中国成人超重的界限,BMI<18.5 kg/m² 为体重过低,18.5~<24.0 kg/m² 为体重正常,24.0~<28.0 kg/m² 为超重,≥28.0 kg/m² 为肥胖,见表 1^[10]。以此作为判断条件输入脂肪识别程序。

表 1 中国成人超重和肥胖分型

VA (cm ²)	BMI (kg/m ²)	WC (cm)	分型	描述
<100	18.5~<24.0	男性<85、女性<80	正常	未见明显异常
<100	18.5~<24.0	男性≥85、女性≥80	正常	未见明显异常,但有内脏脂肪型肥胖趋势
<100	≥24.0	男性<85、女性<80	皮下脂肪型肥胖	皮下脂肪肥胖趋势
<100	≥24.0	男性≥85、女性≥80	皮下脂肪型肥胖	皮下脂肪型肥胖
≥100	18.5~<24.0	男性<85、女性<80	内脏脂肪蓄积	内脏脂肪蓄积
≥100	18.5~<24.0	男性≥85、女性≥80	内脏脂肪蓄积	内脏脂肪型肥胖综合征前期
≥100	≥24.0	男性<85、女性<80	内脏脂肪型肥胖	内脏脂肪型肥胖
≥100	≥24.0	男性≥85、女性≥80	内脏脂肪型肥胖	内脏脂肪型肥胖综合征

W:程度加重或情况变差

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。相

关分析采用 Pearson 法相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脂肪自动识别成功率 85 名志愿者的腹部 CT 图像导入软件进行脂肪自动识别,有 75 名自动画出的 ROI 框体符合要求无需调整,10 名需经再次手动细调后进行计算。84 名能在 1 s 内成功计算出 WC 和 VA、SA,1 名男性志愿者因 VA 几乎为 0 而无法计算数据,成功率为 98.8%。并且程序能根据受检者的性别、BMI 和上述 WC、VA、SA 计算值自动分析出个体的肥胖类型。

2.2 肥胖类型的体脂参数特征 85 名志愿者中,

共 22 名(25.9%) $VA \geq 100\text{ cm}^2$,男 14 名(占男性的 26.4%),女 8 名(占女性的 25.0%)。BMI $< 24\text{ kg/m}^2$ 的 62 名志愿者中,有 6 名(9.7%) $VA \geq 100\text{ cm}^2$,男 3 名(占男性的 7.9%),女 3 名(占女性的 12.5%);而 BMI $\geq 24\text{ kg/m}^2$ 的 23 名志愿者中,有 16 名(69.6%) $VA \geq 100\text{ cm}^2$,男 11 名(占男性的 73.3%),女 5 名(占女性的 62.5%)。85 名志愿者中因偏倚因素(WC $> 150\text{ cm}$ 、 $VA \geq 150\text{ cm}^2$ 的严重失常样本)去除男 2 名、女 3 名, $VA \geq 100\text{ cm}^2$ 者的 BMI、WC、VA、SA 均显著高于 $VA < 100\text{ cm}^2$ 者(P 值均 < 0.001),见表 2。

表 2 $VA < 100\text{ cm}^2$ 与 $\geq 100\text{ cm}^2$ 志愿者的一般特征比较

($\bar{x} \pm s$)						
VA	<i>n</i>	年龄 (岁)	BMI (kg/m^2)	WC (cm)	VA (cm^2)	SA (cm^2)
$< 100\text{ cm}^2$	62	44.7 $\pm$ 18.3	22.0 $\pm$ 1.7	73.3 $\pm$ 6.7	46.2 $\pm$ 24.0	79.1 $\pm$ 50.1
$\geq 100\text{ cm}^2$	18	54.4 $\pm$ 14.3	24.9 $\pm$ 2.4 ^①	87.8 $\pm$ 6.9 ^①	128.8 $\pm$ 32.2 ^①	162.9 $\pm$ 61.0 ^①

与 $VA < 100\text{ cm}^2$ 比较:① $P < 0.001$

2.3 VA 和 SA 与年龄、BMI、WC 的相关性 85 名志愿者中同样去除严重失常样本(男 2 名、女 3 名)。Pearson 相关分析表明,男性 VA 与 BMI、WC、SA 均呈正相关($r=0.729, 0.861, 0.783, P$ 值均 $< 0.000\ 1$),与年龄不相关($P > 0.05$);女性 VA 与年龄、BMI、WC、SA 均呈正相关($r=0.469, 0.506, 0.752, 0.513, P=0.010, 0.005, 0.000\ 1, 0.004$)。VA 与 WC 的相关性最好,男性所得直线方程为 $y=4.460x-274.116$ ($r=0.861$),女性为 $y=2.754x-151.091$ ($r=0.752$),见图 2、3。男性 SA 与 BMI、WC、VA 均呈正相关($r=0.832, 0.891, 0.783, P$ 值均 $< 0.000\ 1$),女性 SA 与 BMI、WC、VA 均呈正相关($r=0.773, 0.490, 0.513, P=0.000\ 1, 0.007, 0.004$),男性和女性的 SA 均与年龄不相关(P 值均 > 0.05)。

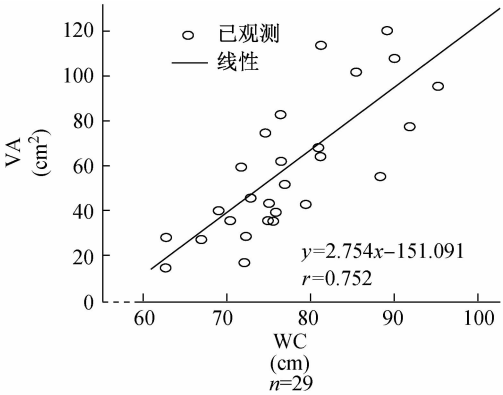


图 3 女性 VA 与 WC 的线性方程

3 讨 论

20 世纪七八十年代国内外学者已注意到上半身肥胖(中心性肥胖)与成人常见病之间的联系,并应用 WC、腰臀比(WHR)作为估测局部体脂和体脂分布异常的简易方法,但这些方法仅能间接地对 AT 分布进行粗略估计^[11],而 CT 技术提供了一种更直接的测量手段,能对人体全身 AT 体积,尤其是区域 AT 如 SA 或 VA 等进行准确定量。目前,CT 测量 AT 技术的应用范围已涉及临床营养学、老年医学、流行病学、遗传学,特别是内分泌代谢和心血管系统等多个领域。但在 CT 测量 AT 的过程中牵涉到在测量 SA 和 VA 时需要画出 ROI 的问题,以往研究多是手工画出,自动化

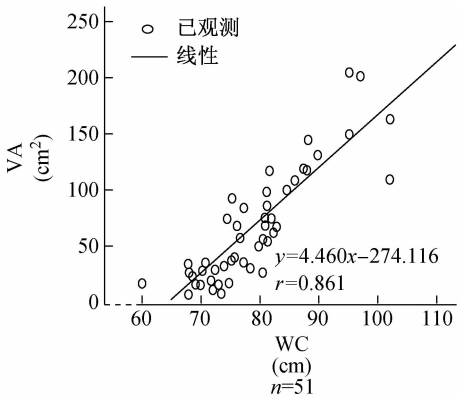


图 2 男性 VA 与 WC 的线性方程

程度不够,导致效率较低,不适宜用来开展普查。本组研究采用脂肪自动识别技术,可自动画出 ROI,即使 ROI 不太符合要求也只需少量的手动细调,能在 1 s 内计算出 WC 和 VA、SA,并根据身高、体重数据分析出肥胖类型。

自动画出的 ROI 偶有误差,有 10 名志愿者的 ROI 框需经再次手动细调后进行计算,具体表现在部分 ROI 分段位置内移,本组研究中出现概率为 11.8%,多发生于内脏脂肪较少的研究对象,估计为在腹壁内侧脂肪较少的情况下腹壁肌肉 CT 值的分水岭效应不明显所致,在该部分 ROI 分段位置手动调整后均可满足要求。

关于脂肪衰减范围,目前尚无统一的标准,鉴于骨骼所致的线束硬化影响,以及体内肌肉组织、肠壁组织和少量肠道气体造成部分容积效应的影响,不同研究者将衰减范围定为 $-250 \sim -50$ Hu、 $-200 \sim -50$ Hu、 $-190 \sim -30$ Hu、 $-150 \sim -50$ Hu 等^[11]。本研究采用的衰减范围为 $-190 \sim -30$ Hu。

根据直线方程中 VA 与 WC 的相互关系,男性 WC 为 85 cm 和女性 WC 为 90 cm 大致相当于 VA 为 100 cm^2 ,这与 20 世纪 90 年代中期以来日本研究的 600 例 VA 与 WC 的相互关系^[12]的结果相仿,而与中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组建议的中国成人超重和肥胖界限中 WC 男性 85 cm 和女性 80 cm^[10]有出入。WHO 的标准是,因肥胖而伴有危险因子增加者,男性 WC 为 94 cm 和女性 WC 为 80 cm 以上。与 WHO 的标准相比,本研究中男、女性的 WC 数值正好相反,考虑为欧美与中国女性的体型不同所致。

本研究结果表明,VA 大致可以用 WC 来预测,从而可以在不使用 CT 等大型医疗设备的情况下,简便有效地评估受试者相应的代谢性疾病的危险性,进而采取相应的干预措施。当然,对该方程的准确性和是否加入其他因素,如年龄、BMI 等尚需进一步验证。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Obesity: Preventing and

Managing the Global Epidemic (WHO Technical Report Series)[R]. Geneva: WHO, 2009.

- [2] SMITH S R, LOVEJOY J C, GREENWAY F, et al. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity[J]. *Metabolism*, 2001, 50(4): 425-435.
- [3] MATSUURA F, YAMASHITA S, NAKAMURA T, et al. Effect of visceral fat accumulation on uric acid metabolism in male obese subjects; visceral fat obesity is linked more closely to overproduction of uric acid than subcutaneous fat obesity[J]. *Metabolism*, 1998, 47(8): 929-933.
- [4] NAKAMURA T, TOKUNAGA K, SHIMOMURA I, et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men[J]. *Atherosclerosis*, 1994, 107(2): 239-246.
- [5] NGUYEN-DUY T B, NICHAMAN M Z, CHURCH T S, et al. Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(6): E1065-E1071.
- [6] TIRKES A T, GOTTLIEB R H, VOI S L, et al. Risk of significant coronary artery disease as determined by CT measurement of the distribution of abdominal adipose tissue[J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2002, 26(2): 210-215.
- [7] PRICE G M, UAUY R, BREEZE E, et al. Weight, shape, and mortality risk in older persons: elevated waist-hip ratio, not high body mass index, is associated with a greater risk of death[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84(2): 449-460.
- [8] 冉兴无, 李晓松, 童南伟, 等. 应用简易体脂参数估测中国肥胖人群腹腔内及腹壁皮下脂肪面积[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2003, 34(3): 519-522, 526.
- [9] 贾伟平, 陆俊茜, 项坤三, 等. 简易体脂参数估测腹内型肥胖的可靠性评价[J]. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(1): 20-23.
- [10] 中国肥胖问题工作组数据汇总分析协作组. 我国成人体重指数和腰围对相关疾病危险因素异常的预测价值: 适宜体重指数和腰围切点的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(1): 5-10.
- [11] 于铁链. 人体脂肪组织(AT)的 CT 测量[J]. *国外医学临床放射学分册*, 1991, 14(5): 257-260.
- [12] 西田诚, 松泽佑次. 新しい肥満の診断基準[J]. *内科(日本)*, 2001, 87(5): 928-930.

(收稿日期:2013-08-05)

(本文编辑:唐清蓉)

• 论 著 •

焦磷酸定量化检测配对盒家族基因 1 甲基化 在宫颈癌诊断中的应用

徐 灵 杨宝华 王立峰 屠 红 徐 军 朱昊平

【摘要】 目的 检测配对盒家族基因 1(PAX1 基因)在不同程度宫颈病变组织中的甲基化表达水平,评估其作为宫颈上皮细胞癌变的分子标志物的诊断价值。**方法** 2011 年 1 月—2013 年 4 月在上海市闵行区中心医院妇科宫颈专科门诊就诊的 121 例患者的宫颈组织,以组织病理学诊断作为金标准,分为正常宫颈组(28 例)、低级别病变组[病理诊断为宫颈上皮内瘤变(CIN)Ⅰ级,32 例]、高级别病变组(病理诊断为 CIN Ⅱ或Ⅲ级,34 例)和宫颈鳞癌组(27 例)。采用焦磷酸测序法检测抑癌基因不同位置的甲基化情况。采用受试者 ROC 曲线确定宫颈组织 PAX1 基因甲基化表达水平对宫颈病变的诊断阈值。**结果** 正常宫颈组、低级别病变组、高级别病变组和宫颈鳞癌组间年龄($F=4.31, P<0.01$)和高危人乳头瘤病毒阳性构成比($\chi^2=79.43, P<0.01$)的差异有统计学意义。正常宫颈组宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量水平为 $(4.92\pm 4.45)\%$,低级别病变组为 $(5.55\pm 5.05)\%$,高级别病变组为 $(10.21\pm 14.39)\%$,宫颈鳞癌组为 $(41.97\pm 23.02)\%$,差异有统计学意义($F=46.43, P<0.001$);两两比较发现,除正常宫颈组与低级别病变组之间差异无统计学意义外($P>0.05$),其他各组之间差异均有统计学意义(P 值均 <0.01)。宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测诊断宫颈鳞癌的 ROC 曲线 AUC 为 0.883,敏感度为 81%,特异度为 93%,最佳界值为 20.55%。宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测诊断宫颈鳞癌和高级别病变的 AUC 为 0.680,敏感度为 57%,特异度为 90%,最佳界值为 8.97%。**结论** 焦磷酸测序法 PAX1 基因甲基化水平定量检测较以往的定性分析有较大优势,对于宫颈癌临床诊断具有潜在应用价值。

【关键词】 配对盒家族基因 1; DNA 甲基化; 宫颈癌; 焦磷酸测序法

Quantitative measurement of paired-boxed gene 1 methylation in cervical cancer tissues by pyrosequencing and its diagnostic value * XU Ling, YANG Baohua, WANG Lifeng, TU Hong, XU Jun, ZHU Haoping. * Department of Obstetrics & Gynecology, Shanghai Minhang Central Hospital, Shanghai 201199, China

Corresponding author: XU Jun. E-mail: xujun1958@hotmail.com

【Abstract】 Objective To quantitatively measure the paired-boxed gene 1 (PAX1) methylation in cervical cancer tissues and to estimate the role of PAX1 in diagnosis of epithelial cell carcinoma. **Methods** Cervical tissues were collected from 121 patients visiting Shanghai Minhang Central Hospital between January 2011 and April 2013. According to histopathologic diagnosis results, there were 28 cases with normal tissue, 32 cases with low-grade lesions (CIN I), 34 cases with high-grade lesions (CIN II or III) and 27 cases with cervical squamous cell carcinoma. The percentage of PAX1 methylation was tested by pyrosequencing in different lesions. The efficacy of PAX1 in diagnosis of cervical cancer was estimated by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** There were significant differences in age ($F=4.31, P<0.001$) and high-risk human papilloma virus (HPV) infection percentages ($\chi^2=79.43, P<0.01$) between groups. The percentages of PAX1 methylation were $(4.92\pm 4.45)\%$, $(5.55\pm 5.05)\%$, $(10.21\pm 14.39)\%$ and $(41.97\pm 23.02)\%$ in the normal tissue, low-grade lesion, high-grade lesion and squamous carcinoma groups, respectively, with significant difference found between groups (all $P<0.01$) except for the difference between normal tissue group and low-grade lesion group

基金项目:上海市卫生局科研课题资助项目(20114152)

作者单位:201199 上海,上海市闵行区中心医院妇产科(徐灵、杨宝华、王立峰、徐军);上海交通大学医学院附属仁济医院,上海市肿瘤研究所(屠红);上海市计划生育科学研究所临床研究培训中心(朱昊平)

通信作者:徐军,电子邮箱为 xujun1958@hotmail.com

($P>0.05$). The area under the ROC curve in squamous carcinoma of the cervix was 0.883 and cut-point value was 20.55% (sensitivity was 81% and specificity was 93%). The area under the ROC curve in squamous carcinoma of the cervix and high-grade lesions was 0.680 and cut-point value was 8.97% (sensitivity was 57% and specificity was 90%). **Conclusion** Quantitative measurement of PAX1 methylation by pyrosequencing in cervical cancer scraping is highly sensitive and it may have a potential value for diagnosis of cervical cancer. (Shanghai Med J. 2015, 38: 36-39)

【Key words】 Paired-boxed gene 1; DNA methylation; Cervical cancer; Pyrosequencing

宫颈癌的病死率居女性恶性肿瘤之首,发病年龄呈现出年轻化的趋势^[1]。如何在现有手段的基础上提高筛查检出率,把防治关口前移,是宫颈癌临床和公共卫生领域亟需解决的问题。抑癌基因的失活是导致宫颈癌发生的重要原因,而 DNA 甲基化如果出现在抑癌基因的位点,可引起抑癌基因表达受阻,使 DNA 丧失某些维持特定遗传功能的结构位点^[2]。配对盒家族基因(PAX 基因)是一类与哺乳动物发育基因编码蛋白调控有关的核转录因子。PAX 基因家族成员与多种器官的发生、组织分化和多种细胞功能的正常活动有关,其高甲基化被报道与宫颈癌的发生相关。本研究采用焦磷酸测序技术,定量检测 PAX1 基因在不同程度宫颈病变组织中的甲基化表达水平,探讨抑癌基因甲基化定量检测在宫颈癌及其癌前病变筛查中的临床应用价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象和标本组织来源 选取 2011 年 1 月—2013 年 4 月在上海市闵行区中心医院妇科宫颈专科门诊就诊的 121 例患者的宫颈组织,经液氮保存后进行抑癌基因甲基化定量检测,以组织病理学诊断作为金标准,分为正常宫颈组(28 例)、低级别病变组[病理学诊断为宫颈上皮内瘤变(CIN) I 级,32 例]、高级别病变组(病理诊断为 CIN II 或 III 级,34 例)和宫颈鳞癌组(27 例)。所有宫颈组织均进行人乳头瘤病毒(HPV)定量检测。除外妊娠和有其他部位恶性肿瘤史或免疫系统疾病史的患者。本研究获医院伦理委员会通过,所有研究对象在招募前均签署了知情同意书。

1.2 宫颈组织 DNA 提取、修饰和扩增 获取的宫颈组织参照 Omniscript RT 试剂盒(德国 Qiagen 公司)的说明书进行 DNA 提取。将抽提的 DNA 经亚硫酸氢盐处理,所有步骤参照 Omniscript RT 试剂盒说明书进行。采用 PCR 对目标片段进行扩增并对产物进行电泳。PCR 所需

引物快速模式 1(F1)为 5'-TAT TTT GGG TTT GGG GTC GC-3',PCR 引物中速模式 1(R1)为 5'-CCC GAA AAC CGA AAA CCG-3',测序引物慢速模式 1(S1)为 5'-TTT TTG TTT TAG AGA GGT TAG TAA T-3'。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,64 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。完成后反应产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳。涉及引物均由上海生工生物工程公司合成。多重实时荧光 PCR (QMSP) 扩增仪为 Mx PCR 系统。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 50 个循环。

1.3 宫颈组织抑癌基因甲基化定量检测 甲基化定量检测采用焦磷酸测序法。按照 Bio-Rad 公司测序仪中甲基化分析要求,配置所需混合液:0.1 mol/L 氨丁三醇(Tris Ac)缓冲液(pH 值为 7.7),2 mmol/L EDTA,10 mmol/L MgAc₂,0.1% 牛血清蛋白(BSA),1 mmol/L DTT,3 μmol/L 5'磷酸化硫酸腺苷(APS),0.4 μg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),0.4 mmol/L D-虫荧光素,2×10⁻⁴ U/L 三磷酸腺苷硫酸化酶,2×10⁻³ U/L 三磷酸腺苷双磷酸酶,18×10⁻³ U/L 无外切酶活性的 Klenow DNA 聚合酶,14.6 mg/L 荧光素酶,然后测量样本基因的甲基化程度^[3]。以 9 个基因位点的甲基化程度(%)的平均值代表每份标本的甲基化程度,甲基化程度在 0~20% 的标本为无甲基化组,>20%~50% 为低甲基化组,>50% 为高甲基化组。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 20.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析 F 检验。计数资料以频数(n)表示,组间比较采用 χ^2 检验。由于国内研究和绝大部分国外类似研究增多为甲基化定性分析,本研究在通过 ROC 曲线计算出不同病变级别下 PAX1 基因甲基化表达率阈值后,还将对定量研究结果判断阈值转化为定性结果,进行 χ^2 检验,以使本研究结果具有横向间的可比性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测方法的建立 PAX1 基因长度为 632 bp,设计焦磷酸测序检测,电泳显示扩增产物与预期片段大小一致。使用 SssI 甲基转移酶处理并经亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 作为模板,同样扩增获得扩增子。而使用未经亚硫酸氢盐处理的基因组 DNA 作为模板,无扩增产物。表明扩增条件特异。通过焦磷酸测序能够定量检测 9 个 CpG 位点的甲基化水平。单一标本各位点甲基化定量检测的焦磷酸测序结果示例见图 1(见插页),灰色区域为 CpG 位点。根据焦磷酸测序中胞嘧啶的数目与胞嘧啶和胸腺嘧啶之和的数目相比即可获得该位点甲基化百分比。每个 CpG 位点的甲基化百分比由仪器自动计算并显示于 CpG 位点顶部的蓝色区域。使用焦磷酸测序法对不同脑区的甲基化水平进行检测。取 9 个位点甲基化定量值的均值作为单一标本的甲基化定量值。

2.2 各组临床指标比较 正常宫颈组、低级别病变组、高级别病变组和宫颈鳞癌组间年龄($F=4.31$, $P<0.01$)和高危 HPV 阳性构成比($\chi^2=79.43$, $P<0.01$)的差异均有统计学意义。见表 1。

表 1 各组间年龄均值和高危 HPV 阳性构成比的比较			
组别	N	年龄 ($\bar{x}\pm s$, 岁)	高危 HPV 阳性 (n)
正常宫颈	28	36.2 $\pm$ 7.7	10
低级别病变	32	38.3 $\pm$ 7.6	26
高级别病变	34	39.7 $\pm$ 10.5	31
宫颈鳞癌	27	44.4 $\pm$ 8.8	25

2.3 宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量水平比较 正常宫颈组宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量水平为(4.92 $\pm$ 4.45)%,低级别病变组为(5.55 $\pm$ 5.05)%,高级别病变组为(10.21 $\pm$ 14.39)%,宫颈鳞癌组为(41.97 $\pm$ 23.02)%,差异有统计学意义($F=46.43$, $P<0.001$)。两两比较发现,除正常宫颈组与低级别病变组之间差异无统计学意义外($P>0.05$),其他各组之间差异均有统计学意义(P 值均 <0.01)。

2.4 宫颈组织 PAX1 基因甲基化表达水平的诊断阈值分析 宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测诊断宫颈鳞癌的 ROC 曲线 AUC 为 0.883,敏感度为 81%,特异度为 93%,最佳界值为 20.55%,见图 2。宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测诊

断宫颈鳞癌和高级别病变的 AUC 为 0.680,敏感度为 57%,特异度为 90%,最佳界值为 8.97%,见图 3。

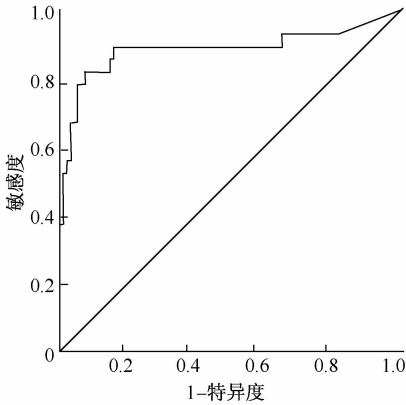


图 2 宫颈组织 PAX1 基因定量水平诊断宫颈鳞癌的 ROC 曲线

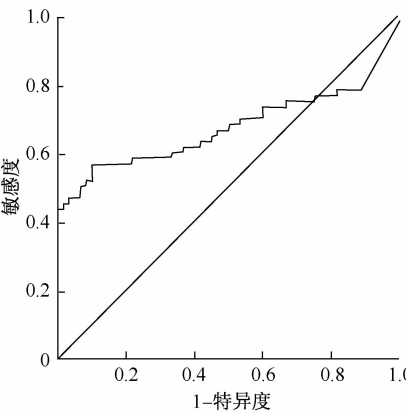


图 3 宫颈组织 PAX1 基因定量水平诊断宫颈鳞癌和高级别病变的 ROC 曲线

3 讨 论

关于 PAX1 基因与宫颈癌之间关系的研究,国际上目前尚属起步阶段,对某些特定基因甲基化的研究和关于某种疾病特别是基因表达调控为病因的表观遗传学研究,可能发现与疾病早期诊断、治疗和疗效评测相关的生物标志物,以及检验技术和方法^[3]。现有研究^[3-5]结果发现,宫颈癌组织中存在 PAX1 基因甲基化异常高表达。本课题组在前期研究^[6]中发现 PAX1 基因在宫颈癌组织中的甲基化率高达 87.5%,并且在正常宫颈、宫颈鳞状上皮低级别病变、宫颈鳞状上皮高级别病变和宫颈癌的不同病程级别之间差异有统计学意义。但这些现有报道中所使用的抑癌基因甲基化检测手段都是定性检测,样本数量很少,临床应用价值不高。本研究采用焦磷酸测序技术定量检测 PAX1 基因在不同程度宫颈病变组织中的甲基化

表达水平,样本总量达到了 121 例。结果表明抑癌基因甲基化定量检测在宫颈癌组织中有较强表达,具有敏感度和特异度均较高的优点,而在高级别病变的诊断中,这一技术则在特异性方面更为突出。

焦磷酸测序技术是新一代 DNA 序列分析技术,无需进行电泳,DNA 片段无需荧光标记,因此相应的仪器系统无需荧光分子的激发和检测装置。利用焦磷酸测序技术可以同时检测多个甲基化位点,并获得甲基化程度的精确定量值^[7]。焦磷酸测序技术是基于 4 种酶催化的酶联化学发光反应,焦磷酸基团(PPi)在反应中最终转化为可见光的信号的峰值。检测甲基化位点的峰高比,即可反映 DNA 的甲基化水平。焦磷酸测序法很好地解决了基因甲基化程度定量问题,既可以对甲基化程度进行定量测量,又具有很高的可重复性和极高的准确性,在成本上也低于其他高通量测序技术^[7]。本研究利用焦磷酸测序技术对 PAX1 基因的 9 个 CPG 位点的甲基化程度进行定量检测,并取均值,力求结果的稳定可靠,经单因素方差分析证实宫颈鳞癌组织中 PAX1 基因甲基化定量值显著升高,但正常宫颈组与低级别病变组间差异并无统计学意义。表明这一检测技术在鉴别高级别病变和早期宫颈鳞癌方面具有较强的应用优势。

由于国际上关于 PAX1 抑癌基因甲基化的研究绝大多为定性检测,因此目前缺乏定量检测的诊断阈值。本研究根据获得的甲基化定量检测值数据,应用 ROC 曲线对诊断阈值进行了分析,结果发现,宫颈组织 PAX1 基因甲基化定量检测,诊断宫颈鳞癌曲线拟合度较好,且拥有比较满意的敏感度和特异度;若要进一步鉴别出高级别及其以上程度的病变,虽然定量数据比较存在统计学意义且具有较强的特异度(90%),但曲线的拟合度欠佳,敏感度较低(57%)。因此,在宫颈组织中进行抑癌基因 PAX1 甲基化定量检测更适合鉴别高级别病变与宫颈鳞癌,对于鉴别宫颈低级别与高级别病变,则可作为排除性诊断措施。

目前,临床上用于筛检宫颈癌的方法,主要是通过获取宫颈脱落细胞进行细胞学检测或 HPV 检测。单纯的细胞学检测灵敏度和特异度均欠佳,而 HPV 检测虽然具有较高的灵敏度,容易检测出患有宫颈癌的个体,但其特异度欠佳而假阳

性率偏高,单独使用 HPV 检测作为筛检工具的筛检效能目前并不推荐。本研究采用焦磷酸测序法定量检测宫颈组织 PAX1 基因的甲基化,能够较好地地区分癌变与非癌变,具有很大的临床应用价值,对于高级别病变也有一定的区分能力,具有很好的发展空间。过去以宫颈组织为样本的定性研究,在灵敏度和阳性预测值方面存在欠缺,以本课题组的前期研究^[6]为例,虽然 PAX1 基因在宫颈癌组织中甲基化率高达 87.5%,但在正常宫颈、低级别和高级别病变组织中也存在甲基化阳性表达,因而定性检测并不能作为一种有效的诊断方法。相比之下,本研究采用的焦磷酸测序法定量检测很好地弥补了上述不足,不仅同样得出既往定性检测中癌变组织中的 PAX1 基因甲基化水平远高于其他组织的结论,还提示定量检测技术在诊断宫颈鳞癌方面兼顾了敏感度和特异度,具有应用于临床的潜力。

综上所述,利用焦磷酸测序法定量检测宫颈组织中 PAX1 基因的甲基化具有较高的灵敏度和特异度,尤其适用于宫颈高级别病变与鳞癌的筛查,是在高危人群中筛选出早期宫颈癌的有效方法。

参 考 文 献

- [1] BEREK J S, HACKER N F. Practical Gynecologic Oncology[M]. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 215-224.
- [2] KAN Y Y, LIU Y L, WANG H J, et al. PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening[J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, 24(5): 928-934.
- [3] HUANG T H, LAI H C, LIU H W, et al. Quantitative analysis of methylation status of the PAX1 gene for detection of cervical cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(4): 513-519.
- [4] LIM E H, NG S L, LI J L, et al. Cervical dysplasia: assessing methylation status (Methylight) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFPI2 to improve diagnostic accuracy[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(2): 225-231.
- [5] LAI H C, LIN Y W, HUANG R L, et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse[J]. Cancer, 2010, 116(18): 4266-4274.
- [6] 徐 军,王红琳,陆杲川,等. 人宫颈癌组织 CDH1 和 PAX1 基因甲基化研究 [J]. 肿瘤, 2009, 29(5): 483-485.

(收稿日期:2014-08-09)

(本文编辑:唐清蓉)

• 论 著 •

川芎嗪预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用

汤永强 赵 姣 李 立

【摘要】 目的 探讨川芎嗪预处理与缺血预适应对大鼠视网膜缺血再灌注损伤是否具有相似的保护作用,以及联合应用川芎嗪预处理和缺血预适应能否进一步加强视网膜对缺血的耐受性。**方法** 选取健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 70 只,采用前房灌注法建立大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型,随机分入假手术组、缺血再灌注组、川芎嗪预处理组、5 min 缺血预适应组(缺血预适应组)和川芎嗪预处理+缺血预适应组(联合组),每组 14 只。川芎嗪预处理组大鼠在视网膜缺血再灌注损伤前 24 h 给予川芎嗪 80 mg/kg 腹腔内注射,每 8 h 1 次,共 3 次;缺血预适应组大鼠在视网膜缺血前 24 h 给予 5 min 缺血预适应(行前房穿刺,抬高 0.9%氯化钠注射液瓶,只维持 5 min);联合组大鼠在视网膜缺血前 24 h 给予 5 min 缺血预适应,其余操作同川芎嗪预处理组;假手术组大鼠右眼行前房穿刺,不做缺血再灌注;缺血再灌注组大鼠仅做缺血再灌注处理,不予其他处理。分别于光学显微镜和透射电子显微镜下观察大鼠视网膜组织结构,检测视网膜超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量和热休克蛋白(HSP)70 表达水平。**结果** 再灌注 24 h 时,光学显微镜和透射电子显微镜下可见川芎嗪预处理组、缺血预适应组和联合组大鼠的视网膜损伤程度较缺血再灌注组轻,其中联合组大鼠视网膜损伤程度最轻。缺血再灌注组的 SOD 活性显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),假手术组的 SOD 活性显著高于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血预适应组和川芎嗪预处理组均显著低于联合组(P 值均 <0.05)。缺血再灌注组的 MDA 含量显著高于其他 4 组(P 值均 <0.05),假手术组的 MDA 含量显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血预适应组和川芎嗪预处理组均显著高于联合组(P 值均 <0.05)。再灌注 24 h 时,假手术组 HSP70 的光密度(D)值显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血再灌注组显著低于缺血预适应组、川芎嗪预处理组和联合组(P 值均 <0.05),缺血预适应组和川芎嗪预处理组均显著低于联合组(P 值均 <0.05)。缺血预适应组与川芎嗪预处理组间 SOD 活性、MDA 含量和 HSP70 的 D 值的差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。**结论** 川芎嗪预处理与缺血预适应一样,对视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用,缺血预适应与川芎嗪预处理联合应用可进一步加强视网膜对缺血损伤的耐受性。

【关键词】 视网膜;缺血再灌注损伤;川芎嗪;缺血预适应;热休克蛋白 70;保护作用

Protective effect of Ligustrazine pretreatment on retinal ischemic-reperfusion injury in rats * TANG Yongqiang, ZHAO Jiao, LI Li. * Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing 400010, China
Corresponding author: LI Li

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of Ligustrazine pretreatment on retinal ischemic-reperfusion injury in rats and to investigate whether combined application of Ligustrazine pretreatment and ischemic preconditioning can strengthen this effect. **Methods** Seventy healthy male Sprague Dawley rats were enrolled in the present study. Experimental retinal ischemic-reperfusion injury was induced by increasing the intraocular pressure through perfusion into the anterior chamber. Rats were randomly divided into 5 groups ($n=14$): sham operated group, ischemic reperfusion group, Ligustrazine pretreatment group, ischemic preconditioning group, and Ligustrazine combined ischemic preconditioning group (combined group). Ligustrazine 80 mg/kg (3 times at every

基金项目:重庆市卫生局中医药项目课题资助(2009-2-109)
作者单位:400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆市眼科学重点实验室(汤永强、李立);四川大学华西医院眼科(赵姣)
通信作者:李立

8 hours) was intraperitoneally injected 24 h before retinal ischemic-reperfusion injury in the Ligustrazine pretreatment group. Puncture of anterior chamber was performed and maintained for 5 min in the ischemic preconditioning group 24 h before retinal ischemic-reperfusion injury in the ischemic preconditioning group. Ligustrazine pretreatment and ischemic preconditioning were done in the combined group. The retinal tissue was observed under light microscope and transmission electron microscope, respectively. Activity of retinal superoxide dismutase (SOD), contents of malondialdehyde (MDA) and expression of heat shock protein 70 (HSP70) were detected. Retinal ultrastructure was observed under electron microscopy. **Results** After reperfusion for 24 h, retinal injury of ischemic preconditioning group, Ligustrazine pretreatment group and combined group was slighter than that of ischemic-reperfusion group, and the slightest injury presented in the combined group. SOD activity in the ischemic-reperfusion group was lower than that in the other 4 groups (all $P < 0.05$). SOD activity in the sham operated group was significantly higher than that in the ischemic preconditioning group, Ligustrazine pretreatment group and combined group (all $P < 0.05$). SOD activity in the ischemic preconditioning group and Ligustrazine pretreatment group was significantly lower than that in the combined group (both $P < 0.05$). MDA level in the ischemic-reperfusion group was significantly higher than that in the other 4 groups (all $P < 0.05$). MDA level in the sham operated group was significantly lower than that in the ischemic preconditioning group, Ligustrazine pretreatment group and combined group (all $P < 0.05$). MDA levels in the ischemic preconditioning group and Ligustrazine pretreatment group was significantly higher than that in the combined group (both $P < 0.05$). Expression of HSP70 in the sham operated group were significantly lower than that in the other 4 groups (all $P < 0.05$). Expression of HSP70 in the ischemic-reperfusion group was significantly lower than that in the ischemic preconditioning group, Ligustrazine pretreatment group and combined group (all $P < 0.05$). Expression of HSP70 in the ischemic preconditioning group and Ligustrazine pretreatment group was significantly lower than that in the combined group (both $P < 0.05$). But there were no significant differences in the SOD activity, MDA level or HSP70 expression between ischemic preconditioning group and Ligustrazine pretreatment group (all $P > 0.05$). **Conclusion** Similar to 5 min ischemic preconditioning, Ligustrazine pretreatment can protect retina from ischemic reperfusion injury by upregulation of HSP70 expression. This effect can be strengthened by combined application of Ligustrazine pretreatment and ischemic preconditioning. (Shanghai Med J, 2015, 38: 40-44)

【Key words】 Retina; Ischemia-reperfusion injury; Ligustrazine; Ischemic preconditioning; Hot shock protein 70; Protection

已有研究^[1]结果表明,兴奋性氨基酸、氧自由基、一氧化氮等内源性物质参与缺血损伤形成的病理生理过程,但目前治疗缺血损伤药物的疗效不佳。1986 年 Murry 等^[2]的研究发现,短暂结扎实验犬的冠状动脉可显著缩小较长时间缺血所致心肌梗死的面积,首次提出缺血预处理的概念;在随后的研究^[3-8]中相继发现,脑、视网膜、肝脏等组织中也存在缺血预适应现象。缺血预适应为有创处理,在临床应用中受到一定的限制,故临床医师考虑能否以药物代替缺血^[9],采用更为合理的方式调动这种内源性的保护作用。以中医理论为指导的中药预适应在临床预防治疗疾病方面具有更广阔的前景。本研究以川芎嗪预处理大鼠,建立视网膜缺血再灌注损伤模型,检测大鼠视网膜超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量和热休克蛋白 70(HSP70)表达水平,观察视网膜组织超微结构,旨在探讨川芎嗪预处理与缺血预适

应对大鼠视网膜缺血再灌注损伤是否具有相似的保护作用,以及将两者联合应用能否进一步加强视网膜对缺血的耐受性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 70 只,体重 220~250 g,均由重庆医科大学实验动物中心提供。检查大鼠双侧眼球等大,角膜透明,瞳孔等大、等圆,虹膜血管清晰,均未发现器质性眼病。所有大鼠均予适应性喂养 2 周,室温保持于 22℃,鼠舍每天清晨 6 时开灯,下午 6 时关灯,使大鼠保持自然生物节律,饮水和饲料充足。将大鼠随机均分入假手术组、缺血再灌注组、川芎嗪预处理组、5 min 缺血预适应组(缺血预适应组)和川芎嗪预处理+缺血预适应组(联合组),每组 14 只。川芎嗪预处理组大鼠在视网膜缺血再灌注损伤前 24 h 给予 80 mg/kg 川芎嗪

注射液[规格为 2 mL/40 mg, 苏卫药准字(83)7107-1 号]腹腔内注射, 每 8 h 1 次, 共 3 次。缺血预适应组大鼠在视网膜缺血前 24 h 给予右眼 5 min 缺血预适应(行前房穿刺, 抬高 0.9% 氯化钠溶液瓶, 只维持 5 min)。联合组大鼠在视网膜缺血前 24 h 给予 5 min 缺血预适应, 再给予 80 mg/kg 川芎嗪注射液腹腔内注射, 每 8 h 1 次, 共 3 次。假手术组大鼠仅对右眼行前房穿刺, 不做缺血再灌注处理。缺血再灌注组大鼠仅做缺血再灌注处理, 不予其他处理。所有大鼠左眼均不做任何处理。

1.2 试剂 SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒购于南京建成生物研究所。HSP70 一抗为美国 SantaCruz 公司的小鼠抗大鼠多克隆抗体 HSP70, 二抗为北京中杉金桥公司羊抗兔 IgG。

1.3 方法

1.3.1 视网膜缺血再灌注损伤模型制备 30 g/L 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉大鼠, 复方托吡卡胺眼液滴眼充分扩瞳(瞳孔直径 ≥ 4 mm), 0.4% 盐酸奥布卡因眼液滴眼行表面麻醉。将大鼠固定于实验台上, 以电热板维持其体温为 36~38 °C, 取右眼为手术眼, 采用前房灌注法^[10], 在手术显微镜下将连接输液器的 4.5 号输液针头自大鼠颞侧角膜缘穿刺入前房(注意勿损伤虹膜和晶状体)后固定, 升高眼压至 17.29 kPa(130 mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa, 0.9% 氯化钠溶液瓶内的液面高度与动物眼的垂直距离为 176 cm), 输液瓶内的液体未向眼内滴注。肉眼见大鼠眼结膜和虹膜迅速变苍白, 于直接眼底镜下可见视网膜苍白水肿。向前房内灌注 0.9% 氯化钠溶液维持 60 min 后缓慢放低输液瓶高度至动物眼球水平, 拔出前房穿刺针头, 此时见球结膜和虹膜颜色迅速恢复正常, 开始再灌注计时, 以氧氟沙星眼膏涂眼预防感染。左眼不做任何处理。

1.3.2 标本制作 于再灌注 24 h 后每组取 3 只大鼠, 麻醉后将其四肢和头部固定, 开胸暴露心脏, 将注射器针头插入左心室, 灌注 0.9% 氯化钠溶液, 同时剪破右心房放血, 待流出液为淡红色血水, 换 4% 戊二醛灌流固定。20 min 后迅速摘除大鼠右眼眼球, 于光学显微镜下沿赤道部将视网膜分为赤道部前、后两部分。将赤道部前部分置于 Verhoeff 液中, 按步骤制作 H-E 染色标本, 于

光学显微镜下观察; 赤道部后部分以利刀切取大小为 1 mm×3 mm 条状, 制成透射电子显微镜标本后观察视网膜超微结构。

1.3.3 SOD 和 MDA 检测 再灌注 24 h 后断头处死每组剩余时 11 只大鼠, 迅速摘除其右眼眼球, 置于冰环境中, 环形切开角巩缘, 弃眼前节和玻璃体, 外翻眼球壁, 在解剖显微镜下剥离出视网膜, 将其置入离心管(EP 管)中, 以滤纸条吸干, 电子天平称湿重后将其剪碎, 按说明书加入一定量的双蒸水, 在冰浴条件下行超声波破碎匀浆, 离心 $1\,511 \times g$ 6 min 后取匀浆上清液, 采用比色法测定 SOD 活性和 MDA 含量, 操作步骤按试剂盒说明书。采用免疫组织化学 SP 法检测视网膜组织 HSP70 含量, 细胞质或细胞核内出现棕黄色染色为阳性, 应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件检测 HSP70 的平均光密度(D)值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对大鼠视网膜组织 SOD 活性、MDA 含量和 HSP70 的平均 D 值进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光学显微镜下各组大鼠的视网膜结构 假手术组大鼠视网膜可见 3 层细胞核, 由玻璃体腔向巩膜依次为神经节细胞层、双极细胞层(内核层)和感光细胞层(外核层)。神经节细胞层细胞为单层排列, 内、外核层细胞呈多层排列, 视网膜神经节细胞的大小不一, 轮廓不规则, 细胞核大且深染。再灌注 24 h 后, 缺血再灌注组大鼠全层视网膜高度水肿, 大部分神经节细胞纤维层发生空泡样改变, 感光细胞结构紊乱, 排列不清, 核溶解、坏死, 神经纤维层、内丛状层和外丛状层水肿亦明显。川芎嗪预处理组、缺血预适应组和联合组大鼠视网膜损伤程度较缺血再灌注组轻, 视网膜神经节细胞排列规整, 细胞核大部分存在, 个别呈空泡样改变, 其中联合组大鼠视网膜损伤程度最轻。见图 1(见插页)。

2.2 透射电子显微镜下各组大鼠的视网膜超微结构 假手术组大鼠视网膜视锥、视杆细胞内线粒体正常, 外节膜盘完整, 排列整齐, 内、外核层和神经节细胞的细胞核大而圆, 核仁清晰, 核膜光滑, 核质均匀散在。缺血再灌注组大鼠视网膜各

层结构紊乱,再灌注 24 h 时损伤最为严重,神经节细胞核膜凹陷,细胞染色质边集,线粒体肿胀、嵴消失,滑面内质网扩张,粗面内质网部分扩张脱颗粒,内核层细胞数目减少,细胞核浓缩。缺血预适应组、川芎嗪预处理组和联合组大鼠视网膜各层结构水肿减轻,神经节细胞数目较缺血再灌注组多,细胞和细胞器形态保持良好,细胞质和线粒体水肿明显减轻,少数内、外核层细胞核质肿胀,外节膜盘多完整,其中联合组大鼠视网膜损伤程度最轻。见图 2(见插页)。

2.3 各组大鼠视网膜组织 SOD 活性和 MDA 含量 缺血再灌注组的 SOD 活性显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),假手术组显著高于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血预适应组和川芎嗪预处理组均显著低于联合组(P 值均 <0.05)。缺血再灌注组的 MDA 含量显著高于其他 4 组(P 值均 <0.05),假手术组显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血预适应组和川芎嗪预处理组均显著高于联合组(P 值均 <0.05)。缺血预适应组与川芎嗪预处理组间 SOD 活性和 MDA 含量的差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。见表 1。

表 1 再灌注 24 h 后各组大鼠视网膜组织 SOD 活性和 MDA 含量比较

组别	SOD	MDA
	(U/mg 蛋白)	(nmol/mg 蛋白)
假手术	60.50±1.27 ^①	4.66±0.48 ^①
缺血再灌注	28.28±1.34	8.72±0.37
缺血预适应	43.05±1.36 ^{①②③}	6.76±0.41 ^{①②③}
川芎嗪预处理	44.07±1.84 ^{①②③}	6.84±0.45 ^{①②③}
联合	53.24±0.98 ^{①②}	5.86±0.18 ^{①②}

与缺血再灌注组比较:^① $P<0.05$;与假手术组比较:^② $P<0.05$;与联合组比较:^③ $P<0.05$

2.4 各组大鼠视网膜组织 HSP70 表达 再灌注 24 h 时,假手术组大鼠视网膜未见 HSP70 表达,缺血再灌注组大鼠视网膜组织有少量 HSP70 表达,缺血预适应组和川芎嗪预处理组大鼠视网膜组织有较多 HSP70 表达,联合组大鼠视网膜组织 HSP70 染色最深,阳性表达主要见于视网膜神经节细胞层和内核层细胞,见图 3(见插页)。假手术组、缺血再灌注组、缺血预适应组、川芎嗪预处理组和联合组大鼠视网膜 HSP70 的 D 值分别为 0.17 ± 0.08 、 0.23 ± 0.11 、 0.39 ± 0.13 、 0.39 ± 0.01 和 0.41 ± 0.15 ,假手术组显著低于其他 4 组(P 值均 <0.05),缺血再灌注组显著低于缺血预适应组、川芎嗪预处理组和联合组(P 值均 <0.05),缺

血预适应组和川芎嗪预处理组均显著低于联合组(P 值均 <0.05),缺血预适应组与川芎嗪预处理组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

视网膜缺血再灌注损伤见于高眼压性青光眼,早产儿视网膜病变,视网膜血管阻断性过程如视网膜静脉阻塞、视网膜动脉阻塞等,视网膜的缺血状态是上述疾病发生和发展的原因,缺血后再灌注将造成疾病进一步恶化,最终导致患者视功能减退,严重影响患者的生活质量。外源性物质如自由基清除剂、钙通道阻滞剂等对于视网膜缺血再灌注损伤并不完全有效,视网膜内源性保护系统在阻止视网膜缺血再灌注损伤方面较外源性拮抗物质更加有效。

大量研究^[2-8]证实,在心肌、脑、肝脏、视网膜等组织中存在缺血耐受现象,即通过预先给予非损伤性的缺血刺激,使机体产生对随后较长时间损伤性缺血刺激的耐受性或适应性,即缺血预适应。缺血预适应是机体对较轻的损伤刺激产生的一种内源性保护反应,其通过产生一些内源性保护物质起作用,目前对 HSP70 的研究最多。HSP70 是 HSP 家族中最重要的一种,在正常生理条件下其表达水平很低,多种应激原(如高热、运动、缺血、缺氧等)均能刺激其表达明显升高,从而保护细胞和组织免受应激损伤^[11-12]。Caprioli 等^[13]的体外细胞培养实验结果表明,HSP70 作为内源性保护物质能帮助视网膜神经节细胞和 Muller 细胞对抗缺血和兴奋性毒素损伤。研究^[14]结果表明,视网膜缺血再灌注可诱导大鼠视网膜组织中 HSP70 表达升高。本研究中,缺血再灌注组视网膜神经节细胞层和内核层均可见 HSP70 表达,然而 60 min 持续缺血可对视网膜造成不可逆性损伤,视网膜细胞来不及合成足够的 HSP70 以抵抗 60 min 缺血造成的损伤。5 min 缺血预适应作为一非损伤性刺激,可使视网膜组织合成较多的 HSP70,以减轻再灌注 24 h 后发生的视网膜长时间缺血再灌注损伤。透射电子显微镜是观察视网膜组织学损伤的金标准,本研究结果显示缺血预适应组和川芎嗪预处理组大鼠视网膜缺血损伤的程度较缺血再灌注组大鼠明显减轻。

健康是机体对生命过程中统一性的维持,疾病是对这种统一性的破坏,这一点正与中医的阴

阳学说(阴平阳秘,精神乃治,阴阳离决,精气乃绝)和防治原则(阴阳之合,病必自愈;正气存内,邪不可干)不谋而合,中医正是通过各种方法维持机体内稳态的平衡来达到防病、治病的目的,以中医理论为指导的中药在临床预防和治疗疾病方面具有广阔的前景。川芎嗪是中药川芎的生物碱成分,其化学结构为四甲基吡嗪。有研究^[15-16]结果表明,川芎嗪具有减轻缺血损伤、扩张毛细血管、调节凋亡相关蛋白表达、减少凋亡等作用,其通过增强视网膜组织 SOD 活性、减少 MDA 含量来减轻氧化应激损伤,从而对视网膜缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。此外,在心脏缺血再灌注研究^[17]中发现,川芎嗪预处理可通过上调 HSP70 表达对心肌起到保护作用。本研究中,川芎嗪预处理组大鼠视网膜组织 HSP70 表达较缺血再灌注组显著上调,且视网膜损伤程度显著减轻,与之前的研究^[13-14]结果相符合。

本研究结果表明,缺血再灌注损伤可引起视网膜组织 SOD 活性下降,MDA 含量升高,最终导致视网膜组织发生不可逆性损伤,再灌注 24 h 时视网膜组织损伤最为严重。川芎嗪预处理组和缺血预适应组大鼠视网膜组织超微结构的损伤较轻,SOD 活性较缺血再灌注组升高,MDA 含量较缺血再灌注组降低,HSP70 表达水平升高;缺血预适应组和川芎嗪预处理组的 SOD 活性和 HSP70 的 D 值均显著低于联合组,MDA 含量均显著高于联合组,表明联合组大鼠视网膜组织缺血再灌注损伤程度进一步减轻。由此推论,川芎嗪预处理与缺血预适应一样,对视网膜缺血再灌注损伤具有保护作用,川芎嗪预处理与缺血预适应联合应用可进一步加强视网膜的缺血耐受性;HSP70 作为一种应激蛋白,可能参与对抗视网膜缺血再灌注损伤的发生和发展。中药预适应具有安全、无创、易操作等优点,使其在治疗缺血性疾病领域具有潜在的临床应用价值,其具体作用靶点尚待进一步研究明确。

参 考 文 献

- [1] 周跃华,李志辉,孙葆忱. 缺血性视网膜损伤机制的研究[下]: 损伤的机制和治疗[J]. 国外医学眼科学分册, 1999, 23(2): 105-109.
- [2] MURRY C E, JENNINGS R B, REIMER K A. Preconditioning

- with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [3] KATO H, LIU Y, ARAKI T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects[J]. Brain Res, 1991, 553(2): 238-242.
- [4] ROTH S, LI B, ROSENBAUM P S, et al. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(5): 777-785.
- [5] LLORIS-CARSÍ J M, CEJALVO D, TOLEDO-PEREYRA L H, et al. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia[J]. Transplant Proc, 1993, 25(6): 3303-3304.
- [6] 马建荣, 张卫华. 脑缺血预处理对缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华神经外科杂志, 1999, 15(3): 160-162.
- [7] 陈长征, 易明望, 管志华, 等. 缺血预处理对大鼠视网膜缺血再灌注损伤保护作用[J]. 眼科新进展, 2001, 21(3): 157-160.
- [8] 王保强, 杨全会, 董淑云, 等. 缺血预适应减少大鼠肢体缺血再灌注后的肝细胞凋亡[J]. 基础医学与临床, 2005, 25(8): 757-761.
- [9] 马 力, 张常喜, 谢春毅. 中医药预适应研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(7): 818-820.
- [10] 周 历, 张康兰, 方以群, 等. 缺血再灌注损伤对鼠视网膜细胞膜结构和功能的影响[J]. 中华眼科杂志, 1998, 34(2): 134-136.
- [11] YAMAGUCHI K, GAUR V P, TYTELL M, et al. Ocular distribution of 70-kDa heat-shock protein in rats with normal and dystrophic retinas[J]. Cell Tissue Res, 1991, 264(3): 497-506.
- [12] DAUGAARD M, ROHDE M, JÄÄTTELÄM. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions[J]. FEBS Lett, 2007, 581(19): 3702-3710.
- [13] CAPRIOLI J, KITANO S, MORGAN J E. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(12): 2376-2381.
- [14] LEWDEN O, GARCHER C, ASSEM M, et al. Changes of the inducible heat shock protein 70 mRNA level in rat retina after ischemia and reperfusion[J]. Ophthalmic Res, 1998, 30(5): 291-294.
- [15] 靳 隽, 卢 娜. 川芎嗪对幼鼠缺血-再灌注视网膜超氧化物歧化酶、丙二醛水平的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16): 1265-1266.
- [16] 邓翠娥. 川芎嗪的药理作用及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(7): 656-657.
- [17] 陈 东, 刘 丹, 曾国华, 等. HSP70 介导的川芎嗪预处理对大鼠离体心脏的延迟保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 80-83.

(收稿日期: 2011-10-31)

(本文编辑: 陈蔚)

• 论 著 •

Conkai 记忆合金胸部护板在心脏微创术后的应用价值

赵 东 朱仕杰 张致琦 王春生

【摘要】 目的 探讨 Conkai 记忆合金胸部护板在心脏微创手术患者术后的应用价值。**方法** 选取行心脏微创手术后应用 Conkai 记忆合金胸部护板固定胸廓的患者 23 例(试验组),男 14 例,女 9 例,平均年龄为 (55.8 ± 5.5) 岁;术前心功能分级Ⅱ级 4 例,Ⅲ级 18 例,Ⅳ级 1 例。另选取同期行心脏微创手术后应用普通胸带固定胸廓的患者 23 例(对照组),男 13 例,女 10 例,平均年龄为 (52.6 ± 4.7) 岁;术前心功能分级Ⅱ级 4 例,Ⅲ级 19 例。记录并比较两组患者的术后疼痛指数,并进行满意度评分。比较两组患者术后切口感染和肺部感染的发生率。**结果** 试验组术后疼痛指数为 (2.9 ± 0.7) 分,显著低于对照组的 (4.7 ± 1.1) 分 ($P < 0.05$);试验组术后患者满意度评分为 (9.1 ± 1.2) 分,显著高于对照组的 (7.6 ± 0.9) 分 ($P < 0.05$)。试验组术后切口感染和肺部感染的发生率分别为 4.3%(1/23)和 17.4%(4/23),对照组分别为 8.7%(2/23)和 26.1%(6/23),两组间差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。术后 3 个月,试验组患者心功能分级为Ⅱ级 17 例,Ⅲ级 6 例;对照组患者心功能分级为Ⅱ级 16 例,Ⅲ级 7 例。**结论** 心脏手术患者术后使用 Conkai 记忆合金胸部护板具有减轻疼痛且术后并发症较少的优势。

【关键词】 Conkai 记忆合金胸部护板; 心脏微创手术; 疼痛指数

Value of alloying protective plank after minimally invasive cardiovascular operation ZHAO Dong, ZHU Shijie, ZHANG Zhiqi, WANG Chunsheng. Department of Cardiac Surgery, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To evaluate the application of Conkai alloying protective plank after minimally invasive cardiovascular operation. **Methods** Conkai alloying protective plank was used in 23 patients undergoing minimally invasive cardiovascular operation (experimental group). There were 14 males and 9 females, with an average age of (55.8 ± 5.5) years old. Their preoperative cardiac functional grading: grade Ⅱ in 4 cases, grade Ⅲ in 18 cases and grade Ⅳ in one case. Another 23 patients who used common chest bandage after invasive cardiovascular operation were enrolled in the control group. There were 13 males and 10 females, with an average age of (52.6 ± 4.7) years. Their preoperative cardiac functional grading: grade Ⅱ in 4 cases and grade Ⅲ in 19 cases. Postoperative pain index and patients' satisfaction were assessed. The incidence of infection of incisional wound and lung were recorded. **Results** The pain index in the experimental group was significantly lower than that in the control group [2.9 ± 0.7 vs. 4.7 ± 1.1], $P < 0.05$. The patients' satisfaction index in the experimental group was significantly higher than that in the control group [9.1 ± 1.2 vs. 7.6 ± 0.9], $P < 0.05$. The incidences of infection of incisional wound and lung were 4.3% (1/23) and 17.4% (4/23) in the experimental group, and the two parameters in the control group were 8.7% (2/23) and 26.1% (6/23). No significant difference was found in the two parameters between groups (both $P > 0.05$). Cardiac functional grading 3 months after surgery: grade Ⅱ in 17 cases and grade Ⅲ in 6 cases in the experiment group; grade Ⅱ in 16 cases and grade Ⅲ in 7 cases in the control group. **Conclusion** Alloying protective plank is beneficial to patients undergoing cardiovascular operation. It can alleviate postoperative pain and complications. (Shanghai Med J, 2015, 38: 45-47)

【Key words】 Alloying protective plank; Minimally invasive cardiovascular operation; Pain index

随着外科技术的日趋成熟,心脏外科手术的治疗周期正逐渐缩短,且患者对于自身恢复的要求明显提高。因此,心脏手术后减轻患者的术后疼痛和减少术后并发症发生尤为重要。2013年6月—2014年2月,复旦大学附属中山医院对23例行心脏微创手术的患者术应用 Conkai 记忆合金胸部护板固定其胸廓,取得较满意的疗效。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取行心脏微创手术后应用 Conkai 记忆合金胸部护板固定胸廓的患者 23 例(试验组),男 14 例,女 9 例,年龄 18~77 岁,平均年龄为(55.8±5.5)岁;术前纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级Ⅱ级 4 例,Ⅲ级 18 例,Ⅳ级 1 例。其中行微创房间隔缺损修补术 3 例,微创二尖瓣置换术 8 例,微创二尖瓣成形术 5 例,微创主动脉瓣置换术 7 例。另选取同期行心脏微创手术后应用普通胸带固定胸廓的患者 23 例(对照组),男 13 例,女 10 例,年龄 17~78 岁,平均年龄为(52.6±4.7)岁;术前 NYHA 心功能分级Ⅱ级 4 例,Ⅲ级 19 例。其中行微创二尖瓣手术(二尖瓣置换术或二尖瓣成形术)15 例,微创主动脉瓣手术(包括主动脉瓣置换术或主动脉瓣成形术)8 例。两组间年龄、性别构成和心功能分级构成的差异均无统计学意义(P 值均>0.05)。

1.2 方法 行微创房间隔缺损修补术的患者均取右侧第 4 肋间腋中线切口,行二尖瓣置换术和二尖瓣成形术的患者均取右侧第 4 肋间腋后线切口,行主动脉瓣置换术或主动脉瓣成形术的患者均取右侧第 3 肋间腋前线切口。切口长度均为 5 cm。试验组患者于术后当天应用 Conkai 记忆合金胸部护板固定胸廓,将其放置于伤口敷料的外面,塑形后贴合于损伤的肋骨,以达到保护胸廓、固定肋骨的目的。

1.3 观察指标 术后 1 个月,记录并比较两组患者的术后疼痛指数,并进行满意度评分。术后疼痛指数 1~10 分,1 分为无疼痛,10 分为最剧烈的疼痛;患者满意度评分 1~10 分,1 分为最不满意,10 分为最满意。比较两组患者术后切口感染和肺部感染的发生率。

1.4 统计学处理 应用 Stata 7.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对资料 t 检验。计数资料以百分率(%)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 术后疼痛指数和患者满意度评分比较 试验组术后疼痛指数为(2.9±0.7)分,显著低于对照组的(4.7±1.1)分($P<0.05$)。试验组术后患者满意度评分为(9.1±1.2)分,显著高于对照组的(7.6±0.9)分($P<0.05$)。

2.2 术后切口感染和肺部感染发生率比较 试验组术后切口感染和肺部感染的发生率分别为 4.3%(1/23)和 17.4%(4/23),对照组分别为 8.7%(2/23)和 26.1%(6/23),两组间差异均无统计学意义(P 值均>0.05)。试验组 1 例术后发生切口感染的患者予抗感染治疗和更换敷料后感染控制;对照组 1 例患者予抗感染治疗和更换敷料后切口感染控制,1 例行清创术。两组肺部感染患者均给予抗感染治疗,感染严重者予气管插管呼吸机辅助通气,待情况稳定后拔除气管导管。

2.3 术后其他情况 两组均无围术期死亡病例。试验组有 1 例患者术后出血,沿原微创切口止血成功;对照组有 1 例患者术后并发肾衰竭,予血液透析后好转。术后 3 个月,试验组患者心功能分级为Ⅱ级 17 例,Ⅲ级 6 例;对照组患者心功能分级为Ⅱ级 16 例,Ⅲ级 7 例。

3 讨 论

长期以来,常规的心脏外科手术通常取胸骨正中切口,术中需正中劈开胸骨并将其撑开后才能充分暴露手术视野。术后虽以钢丝固定胸骨,但由于胸骨张力较大,加上患者活动或咳嗽引起的震动,均有可能导致患者术后疼痛加剧、胸骨移位,甚至胸骨被钢丝切割。剧烈的疼痛可能使患者恐惧咳嗽,造成术后排痰不畅,继而引起肺部感染和切口感染等并发症发生,同时疼痛也可影响患者的进食和睡眠,不利于患者的顺利康复。目前医学专家普遍认为,减轻患者术后疼痛已成为心脏手术后十分重要的治疗措施之一^[1-3]。

心脏微创手术多采用右侧第 3 或第 4 肋间切口,可保持胸骨的完整性,在减轻术后疼痛方面具有明显的优势。由于微创手术均采用肋间入径,术中撑开可能造成肋骨损伤,严重者可发生骨折;微创主动脉瓣手术则需要切断第 3 肋骨,因此术后仍有可能引起切口局部疼痛,从而影响患者的

术后恢复。

对于术后疼痛,目前主要采用静脉止痛泵、切口局部持续镇痛装置、肌内注射或口服止痛药物,以及胸部护板保护伤口和胸廓等措施止痛。其中固定胸廓减轻疼痛的方法因历史悠久,具有操作简便且无创伤的实用价值,一直深受医师和患者的喜爱。

1851 年 Malgaigne 首先应用条状绷带固定胸廓治疗肋骨骨折,目前固定胸廓的方法和材料已有多种。Conkai 记忆合金胸部护板是一种新型的胸廓固定材料,其利用记忆合金的特性,经过轻松地塑形后即可紧密地贴合于手术创面,再利用其随附供应的固定带将护板和整个胸廓缠绕好,使两者成为一个整体,以此来固定受损的胸廓和肋骨,可明显地对心脏微创手术切口起到较好的止痛效果。此外,其具有操作简便和透气、防水的功效,完全适合心脏外科微创手术后止痛的需要^[2,4]。

本研究中,试验组患者术后应用 Conkai 记忆合金胸部护板固定胸廓,术后切口感染和肺部感染的发生率均显著低于对照组,术后疼痛指数显著低于对照组,术后患者满意度评分显著高于对照组。

综上所述,行心脏微创手术后将患者整个胸廓固定好,可使其术后胸部活动减少、震动程度降低,从而避免疼痛加剧、胸骨位移和胸骨被切割等并发症的发生,有效缓解术后疼痛,有利于咳嗽、排痰,预防肺部感染的发生,促进伤口愈合等。行心脏微创手术后应用 Conkai 记忆合金胸部护板,并结合其他止痛措施,可有效缓解患者的术后疼痛,且术后并发症较少,已越来越被医患双方所接受。

参 考 文 献

[1] DAVIS I C, DAVIS J W, GROOM T. Thoracic plank impalement: an engineering perspective[J]. J Trauma, 2003, 54(5): 1036.

[2] BANSAL V, CONROY C, CHANG D, et al. Rib and sternum fractures in the elderly and extreme elderly following motor vehicle crashes[J]. Accid Anal Prev, 2011, 43(3): 661-665.

[3] 石应康. 胸部创伤的临床研究进展[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2000, 7(1): 44-46.

[4] CAVA J R, SAYGER P L. Chest pain in children and adolescents[J]. Pediatr Clin North Am, 2004, 51(6): 1553-1568.

(收稿日期:2014-04-24)
(本文编辑:陈蔚)

• 书 讯 •

《内科理论与实践》出版

本书由 70 多所医学院校和医疗机构的近 400 位名医通力合作而成,编写秉着理论与实际紧密结合这一原则。初始几篇概要性地介绍与内科相关的医学基础知识和基本概念,如循证医学、预防医学、遗传学、分子生物学、免疫学基础、营养、临床药理学、肿瘤学基础、诊断技术等,以充实读者的基础理论与知识,指导临床实践。而后以内科各个学科、专业的疾病为纲目,在广、深、新三个方面详述其重要内容与最新理论和技术,并结合作者自身的经验体会,详细阐述了各种疾病的病因、病理、发病机制、防治原理,及其与形态、生理、生化、病原学等各学科有关的重要环节,以期帮助读者提高临床诊治水平,树立整体观念,优化处理方法。为使读者的临床思维与时俱进,在大多数篇章中增加“讨论和近瞻”,帮助读者看到学术发展的前景,对教学和科研工作均有所启迪。对于内科与其他临床学科或内科范围各分支专业间的相互关系,本书专辟篇章论述,汇集各科专家经验,使读者在诊治患者时思路开阔,对疾病作出全方位的考虑。全书包含 500 多项基本概念、1 800 多种内科及其相关疾病,内容完整充实、繁简适宜、条分缕析,俾读者对常见病得窥全豹,罕见病亦略知梗概。书后列 5 000 余索引词条,极大方便读者查阅。本书定价为 298 元。

全国各大新华书店、医药书店、当当网(www. dangdang. com. cn)、卓越亚马逊网(www. amazon. cn)、易文网(www. ewen. cc)均有销售,购买有好礼。如需邮购,请联系上海科学技术出版社邮购组(上海钦州南路 71 号);邮政编码为 200235;电话为 64089888-80102。买本书将获赠价值 100 元的《内科疾病影像诊断图谱》一本(仅 3 500 册)。

后路减压椎间融合术治疗腰椎间盘突出症 术后复发的临床疗效

沈 俊 孔维清 徐建广 柴益民 张长青

【摘要】 目的 评价后路减压椎间融合术(PLIF手术)治疗腰椎间盘突出症(LDH)髓核摘除或微创手术术后复发的临床疗效。**方法** 2007年1月—2012年6月上海交通大学附属第六人民医院共收治LDH行髓核摘除或微创手术术后复发的患者56例,根据临床症状分为腰腿痛型(9例)、下肢麻木伴放射感型(18例)和腰腿痛伴下肢麻木型(29例),所有患者均采用PLIF手术治疗。分别于术前和术后3、6、12、24个月采用日本整形外科学会(JOA)评分法和Oswestry功能障碍指数(ODI指数)评估患者术后的腰椎功能改善情况,采用疼痛视觉模拟评分(VAS评分)评估腰痛和腿痛的程度。术后24个月随访时,患者根据自身情况,采用改良的MacNab疗效评定标准对手术疗效进行评价。**结果** 3种临床分型患者术后3、6、12、24个月的JOA评分均显著高于同种临床分型术前(P 值均 <0.05)。术后24个月时,腰腿痛型患者的JOA评分改善率显著高于下肢麻木伴放射感型和腰腿痛伴下肢麻木型(P 值均 <0.05),腰腿痛伴下肢麻木型患者的JOA评分改善率显著高于下肢麻木伴放射感型($P<0.05$)。3种临床分型患者术后3、6、12和24个月的腿痛VAS评分均显著低于同种临床分型术前(P 值均 <0.05),腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型患者术后3、6、12、24个月的腰痛VAS评分均显著低于同种临床分型术前(P 值均 <0.05);下肢麻木伴放射感型患者术后3个月的腰痛VAS评分显著高于同种临床分型术前($P<0.05$),术后12和24个月的腰痛VAS评分均显著低于同种临床分型术前(P 值均 <0.05)。3种临床分型患者术后3、6、12和24个月的腰椎ODI指数均显著低于同种临床分型术前(P 值均 <0.05)。术后24个月时,根据改良的MacNab疗效评定标准,腰腿痛型患者的治疗满意率显著高于下肢麻木伴放射感型和腰腿痛伴下肢麻木型(P 值均 <0.05),腰腿痛伴下肢麻木型患者显著高于下肢麻木伴放射感型($P<0.05$)。**结论** PLIF手术治疗腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型LDH术后复发患者疗效较佳,治疗下肢麻木伴放射感型患者疗效较差。

【关键词】 腰椎间盘突出症复发; 临床疗效; 后路椎间融合

Clinical outcomes of posterior lumbar interbody fusion for recurrent lumbar disc herniation after discectomy SHEN Jun, KONG Weiqing, XU Jianguang, CHAI Yimin, ZHANG Changqing. Department of Orthopedics, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Corresponding author: KONG Weiqing. E-mail: wqkong100@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical outcome of posterior lumbar interbody fusion (PLIF) for recurrent lumbar disc herniation after discectomy or minimally invasive lumbar operation. **Methods** A total of 56 patients with recurrent lumbar disc herniation received PLIF between January 2007 and June 2012 in our hospital. They were divided into three groups according to symptoms: lumbocrural pain type (LPT group, 9 cases), lower extremity numbness accompanied by sciatica type (LENST group, 18 cases), and lumbocrural pain accompanied by lower extremity numbness type (LPLEN group, 29 cases). Japanese Orthopedic Association (JOA) scores, Oswestry disability index (ODI), visual analogue scale (VAS), and MacNab scores were recorded before PLIF and during follow-up period (3 month, 6 month, 12 month, 24 month after PLIF). **Results** Postoperative JOA scores were significantly higher at each time point of follow-up in the three groups than those before PLIF (all $P<0.05$). JOA scores in LPT group were significantly higher than those in LENST and LPLEN groups at 24 months after PLIF (both $P<0.05$), and JOA score in LPLEN group was higher than that in LENST group ($P<0.05$).

Postoperative VAS scores of crural pain at each time point of follow-up in the three groups were significantly lower than those before surgery (all $P < 0.05$). Postoperative VAS scores of back pain at each time point of follow-up in LPT group and LPLEN group were significantly lower than those before surgery (all $P < 0.05$). In the LENST group, VAS score for back pain at the 3 month follow-up was significantly higher than those before PLIF ($P < 0.05$), while VAS scores for back pain at the 12 and 24 month follow-up were significantly lower than those before PLIF (both $P < 0.05$). Postoperative ODI scores at each time point of follow-up in the three groups were significantly lower than those before PLIF (all $P < 0.05$). According to MacNab scores, the clinical outcome in LPL group was superior to LPLEN and LENST groups at the 24 month after PLIF (both $P < 0.05$) and clinical outcome in LPLEN group was superior to that in LENST group ($P < 0.05$). **Conclusion** PLIF is effective in recurrent lumbar disc herniation patients with lumbocrural pain or lumbocrural pain accompanied by lower extremity numbness. But it is not so good for the patients with lower extremity numbness accompanied by sciatica. (Shanghai Med J, 2015, 38: 48-52)

【Key words】 Recurrent lumbar disc herniation; Clinical outcomes; Posterior lumbar interbody fusion

腰椎间盘突出症(LDH)是引起下腰痛的常见疾病,根据腰椎间盘后方突出的部位可分为极外侧型、外侧型、旁中央型和中央型 4 种类型^[1]。极外侧型、外侧型和旁中央型 LDH 可通过髓核摘除或微创手术达到满意的疗效,但术后常有复发^[2-6]。术后复发的危险因素包括因术中显露的需要而破坏部分脊柱的结构导致术后脊柱潜在性的不稳定、椎间盘摘除不彻底、术后早期起床活动、术后重体力劳动和腰部反复扭伤、术后体重增加、吸烟和患者的年龄等^[7-9]。本研究通过分析因 LDH 行髓核摘除或微创手术治疗术后复发而行后路减压椎间融合术(PLIF 手术)患者的临床资料,评价 PLIF 手术治疗 LDH 髓核摘除或微创手术术后复发患者的临床疗效。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2007 年 1 月—2012 年 6 月上海交通大学附属第六人民医院共收治 LDH 行髓核摘除或微创手术术后复发的患者 56 例,男 32 例,女 24 例;年龄 31~67 岁,平均年龄为 (42.3 ± 10.3) 岁。8 例患者的初次手术在上海交通大学附属第六人民医院骨科进行,48 例在外院进行。初次手术行小开窗或半椎板单纯髓核摘除术 47 例,行经皮穿刺胶原酶溶核术、切吸术或激光气化学 6 例,行椎间盘镜、椎间孔镜髓核摘除术 3 例。初次手术节段为 L₄ 至 L₅ 椎间盘 36 例, L₅ 至 S₁ 椎间盘 20 例。LDH 术后好转时间(术后无症状期) 0.5~15 年,平均好转时间为 (6.2 ± 4.6) 年。所有患者复发时均有腰痛和放射痛,入院后行 MRI、CT 检查后明确诊断。两次手术间隔时间 1~

16 年,平均间隔时间为 (7.9 ± 4.6) 年。行 PLIF 手术翻修的节段为 L₄ 至 L₅ 椎间盘 32 例, L₅ 至 S₁ 椎间盘 18 例, L₃ 至 L₅ 椎间盘 2 例, L₄ 至 S₁ 椎间盘 4 例。纳入标准:① LDH 行髓核摘除或微创手术,术后影像学检查显示同一节段(包括同一节段和相邻节段均有椎间盘突出)再次出现椎间盘突出压迫神经,位于前次椎间盘髓核摘除节段的同侧或对侧,可以解释患者腰腿痛或下肢麻木、酸胀的症状;② 患者既往因 LDH 行髓核摘除或微创手术,术后症状明显缓解半年以上。排除标准:① 术后瘢痕粘连,影像学检查无明显椎间盘突出压迫神经表现;② 合并引起腰腿痛的其他疾病;③ 仅有相邻节段椎间盘突出。

1.2 临床分型 根据临床症状分型。腰腿痛型:9 例,腰痛伴下肢放射痛,无明显麻木酸胀不适或轻微麻木。下肢麻木伴放射感型:18 例,以下肢麻木酸胀不适为主,伴下肢神经放射感,腰腿痛视觉模拟评分(VAS 评分) < 3 分。腰腿痛伴下肢麻木型:29 例,腰痛伴下肢放射痛,同时伴下肢麻木酸胀不适。除上述症状外,所有患者体格检查均有不同程度的感觉障碍、肌力下降、肌肉萎缩,直腿抬高试验阳性。

1.3 方法 所有患者均行 PLIF 手术。患者均于全身麻醉后取俯卧位,于 X 线透视下定位手术节段。以病变节段为中心取正中切口,长 8~12 cm,显露相应节段的椎板和小关节。于双侧椎弓根各植入椎弓根螺钉,于 X 线透视下确定其位置准确。行椎板切除术,仔细分离粘连部分,扩大狭窄的侧隐窝和神经根管,予彻底减压。推开马尾和相应神经根,显露前方突出的椎间盘组织,彻底清除变

性的椎间盘组织,并处理上下椎体的软骨板和部分终板。撑开椎间隙,置入 1 枚融合器。术中应尽可能恢复椎间隙高度,操作仔细以避免损伤神经根和撕裂硬脊膜。术后 2 d 拔除负压引流管,常规给予抗生素(头孢唑林钠 1 g 静脉注射,每日 2 次,共 2 d)抗感染,给予地塞米松(5 mg 静脉注射,每日 2 次,共 2 d)减轻神经创伤性水肿。术后 3 周开始进行腰背肌功能训练,卧床休息 1 个月后可下床活动。术后 6 个月内避免剧烈活动。

1.4 评价指标 分别于术前和术后 3、6、12、24 个月采用日本整形外科学会(JOA)评分法^[10]和 Oswestry 功能障碍指数(ODI 指数)^[10]评价患者术后的腰椎功能改善情况,采用疼痛 VAS 评分^[11]评估腰痛和腿痛的程度。JOA 评分改善率=(术后 JOA 评分-术前 JOA 评分)/(29-术前 JOA 评分)×100%。ODI 指数=(得分分数/5×回答的问题数)×100%。疼痛 VAS 评分为 0~10 分,0 分为无痛;<3 分为轻微疼痛,能忍受;4~6 分为疼痛影响睡眠,但能忍受;7~10 分为疼痛难忍,影响食欲和睡眠。术后 24 个月随访时,患者根据自身情况,采用改良的腰椎 MacNab 疗效评定标准评价手术疗效:症状完全消失,恢复原来的工作和生活为优;有轻微腰腿部不适,活动轻度

受限,对工作和生活无影响为良;症状减轻,活动受限,影响正常工作和生活为可;治疗前后症状无差别,甚至加重为差。疗效为优、良、可的患者计为治疗满意。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验。计数资料以频数(*n*)或构成比(*n*/*N*)表示,采用 Kruskal-Wallis 检验和 Wilcoxon 秩和检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各种临床分型患者手术前后的 JOA 评分及其改善率 3 种临床分型患者术后 3、6、12、24 个月的 JOA 评分均显著高于同种类型术前(*P* 值均<0.05)。术后 24 个月,腰腿痛型患者 JOA 评分显著高于下肢麻木伴放射感型和腰腿痛伴下肢麻木型(*P* 值均<0.05),腰腿痛伴下肢麻木型患者 JOA 评分显著高于下肢麻木伴放射感型(*P*<0.05)。术后 24 个月时,腰腿痛型患者的 JOA 评分改善率显著高于下肢麻木伴放射感型和腰腿痛伴下肢麻木型(*P* 值均<0.05),腰腿痛伴下肢麻木型患者的 JOA 评分改善率显著高于下肢麻木伴放射感型(*P*<0.05),见表 1、2。

表 1 3 种临床分型患者手术前后的 JOA 评分比较

($\bar{x}\pm s$,分)						
临床分型	<i>n</i>	术前	术后 3 个月	术后 6 个月	术后 12 个月	术后 24 个月
腰腿痛型	9	7.44±0.88	24.22±0.97 ^①	25.22±1.09 ^①	25.89±0.92 ^①	26.22±1.09 ^①
下肢麻木伴放射感型	18	15.39±0.91	19.00±0.68 ^①	19.89±0.47 ^①	19.67±0.68 ^①	19.50±0.99 ^{①②}
腰腿痛伴下肢麻木型	29	7.34±0.97	23.72±0.65 ^①	24.24±1.24 ^①	22.34±1.24 ^①	22.21±1.63 ^{①②③}

与同种临床分型术前比较:①*P*<0.05;与腰腿痛型同时间比较:②*P*<0.05;与下肢麻木伴放射感型同时间比较:③*P*<0.05

表 2 3 种临床分型患者术后 JOA 评分改善率比较

($\bar{x}\pm s$,%)					
临床分型	<i>n</i>	3 个月	6 个月	12 个月	24 个月
腰腿痛型	9	77.80±4.53	82.47±5.10	85.60±4.11	87.21±4.66
下肢麻木伴放射感型	18	26.39±4.69	32.86±4.37	31.32±4.23	30.12±6.66 ^①
腰腿痛伴下肢麻木型	29	75.52±3.79	77.90±6.22	69.19±7.43	68.54±7.76 ^{①②}

与腰腿痛型同时间比较:①*P*<0.05;与下肢麻木伴放射感型同时间比较:②*P*<0.05

2.2 各种临床分型患者的疼痛 VAS 评分和腰椎 ODI 指数 3 种临床分型患者术后 3、6、12 和 24 个月的腿痛 VAS 评分均显著低于同种临床分型术前(*P* 值均<0.05),腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型患者术后 3、6、12、24 个月的腰痛 VAS 评分均显著低于同种临床分型术前(*P* 值均<0.05);下肢麻木伴放射感型患者术后 3 个月的腰

痛 VAS 评分显著高于同种临床分型术前(*P*<0.05),术后 12 和 24 个月的腰痛 VAS 评分均显著低于同种临床分型术前(*P* 值均<0.05)。3 种临床分型患者术后 3、6、12 和 24 个月的腰椎 ODI 指数均显著低于同种临床分型术前(*P* 值均<0.05)。见表 3。

表 3 各种临床分型患者手术前后的腰腿痛 VAS 评分和腰椎 ODI 指数比较

(x̄±s)					
临床分型	n	时间点	腿痛 VAS 评分 (分)	腰痛 VAS 评分 (分)	腰椎 ODI 指数 (%)
腰腿痛型	9	术前	6.78±0.83	6.44±0.88	58.00±2.00
		术后 3 个月	0.44±0.53 ^①	2.00±0.50 ^①	5.56±0.88 ^①
		术后 6 个月	0.22±0.44 ^①	1.44±0.88 ^①	4.89±1.05 ^①
		术后 12 个月	0.22±0.44 ^①	0.33±0.50 ^①	2.89±1.45 ^①
		术后 24 个月	0.11±0.33 ^①	0.22±0.44 ^①	2.44±1.67 ^①
下肢麻木伴放射型	18	术前	1.83±0.51	0.89±0.47	18.89±1.02
		术后 3 个月	0.56±0.71 ^①	1.83±0.71 ^①	6.78±1.40 ^①
		术后 6 个月	0.44±0.51 ^①	1.22±0.43	5.11±1.57 ^①
		术后 12 个月	0.56±0.51 ^①	0.50±0.51 ^①	4.11±0.83 ^①
		术后 24 个月	0.39±0.50 ^①	0.44±0.51 ^①	3.33±0.97 ^①
腰腿痛伴下肢麻木型	29	术前	5.79±0.73	2.45±0.74	42.48±3.53
		术后 3 个月	0.41±0.50 ^①	2.03±0.63 ^①	7.72±1.75 ^①
		术后 6 个月	0.31±0.47 ^①	1.69±0.60 ^①	5.45±1.50 ^①
		术后 12 个月	0.41±0.50 ^①	0.48±0.57 ^①	3.86±1.19 ^①
		术后 24 个月	0.34±0.48 ^①	0.38±0.49 ^①	3.10±1.01 ^①

与同种临床分型术前比较:①P<0.05

2.3 各种临床分型患者的术后治疗满意率 术后 24 个月时,患者的治疗满意率依次为腰腿痛型 9/9,腰腿痛伴下肢麻木型 27/29,下肢麻木伴放射感型 16/18。腰腿痛型患者的治疗满意率显著高于下肢麻木伴放射感型和腰腿痛伴下肢麻木型(P 值均<0.05),腰腿痛伴下肢麻木型患者显著高于下肢麻木伴放射感型(P<0.05)。见表 4。

表 4 各种临床分型患者术后 24 个月时的疗效比较

(n)					
临床分型	N	优	良	可	差
腰腿痛型	9	6	3	0	0
下肢麻木伴放射感型	18	0	14	2	2
腰腿痛伴下肢麻木型	29	11	13	3	2

3 讨 论

对于 LDH 髓核摘除或微创手术术后复发的患者是否需要手术治疗,以及 PLIF 手术、经椎间孔腰椎后路减压椎间融合术(TLIF 手术)和内镜下翻修等不同翻修方式的临床疗效是目前的研究重点^[12-15]。PLIF 治疗 LDH 术后复发的临床疗效较好,但仍有部分翻修手术患者术后疗效不满意,包括各种不适主诉,如久坐、久站后腰部酸痛,持续下肢麻木,长距离行走后诱发下肢神经牵拉感。本研究随访不同临床分型患者术后恢复情况,以评价 PLIF 翻修手术的疗效。

腰腿痛型患者的临床表现与初次 LDH 急性期相似,主要表现为剧烈的腰腿痛,无明显的主观麻木或仅有轻微麻木。术中可见,既往手术中未处理椎间孔,术中神经根管走行无明显瘢痕增生粘连。本研究结果显示,腰腿痛型患者术后 3 个

月,腰腿痛 VAS 评分和腰椎 ODI 指数均显著低于术前,随着术后不断的康复锻炼,JOA 评分逐渐升高,术后 24 个月时的 JOA 评分改善率为(87.21±4.66)%,高于其他两种临床分型。腰腿痛型患者的治疗满意率达 9/9,手术效果较好。

下肢麻木伴放射感型患者术后复发早期有明显腰腿痛,经保守治疗可明显缓解,就诊时的主要临床症状是下肢坐骨神经牵拉放射感伴麻木、肌肉萎缩、肌力差、行走不利和直腿抬高试验阳性,腰腿痛较轻微(腰腿痛 VAS 评分均<3 分)。该类型患者保守治疗的时间较长,主观症状最轻,客观症状以肌力下降和肌肉萎缩最为普遍;术中可见椎管内和神经根管有明显手术瘢痕增生,椎间盘突出不如腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型患者明显。本研究结果显示,下肢麻木伴放射感型患者术后 12 个月时的 JOA 评分为(19.67±0.68)分,JOA 评分改善率为(31.32±4.23)%;术后 24 个月时的 JOA 评分为(19.50±0.99)分,JOA 评分改善率为(30.12±6.66)%。该临床分型患者术后 24 个月时的治疗满意率为 16/18,无 1 例患者的疗效为优。提示,下肢麻木伴放射感型患者 PLIF 术后症状改善较差。

腰腿痛伴下肢麻木型患者的主要临床症状为腰痛伴下肢放射痛,同时伴下肢麻木酸胀不适,保守治疗的时间短;术中可见增生瘢痕,椎间盘突出明显。本研究结果显示,术后 12 个月时的 JOA 评分为(22.34±1.24)分,JOA 评分改善率为(69.19±7.43)%;术后 24 个月时的 JOA 评分为(22.21±1.63)分,JOA 评分改善率为(68.54±7.76)%。该临床分型患者术后 24 个月时的治疗满意率为

27/29, 11 例患者的疗效为优。提示,腰腿痛伴下肢麻木型患者 PLIF 手术后症状改善情况介于腰腿痛型与下肢麻木伴放射感型患者之间。

下肢麻木伴放射感型患者术后 24 个月时的 JOA 评分较低的原因有以下几点。① 腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型患者疼痛明显,早期进行手术治疗的愿望强烈,下肢麻木伴放射感型患者的主要症状是下肢麻木酸胀,疼痛程度轻,保守治疗时间长。因此,下肢麻木伴放射感型患者神经根慢性损伤发生率高,正常行走时必定牵拉神经根,引起神经根高敏感性,下肢症状改善相对较差。② 下肢麻木伴放射感型患者神经受压时间长,麻木、肌力下降的时间越长,肌肉萎缩越严重,术后肌肉运动恢复的可能性越小^[16]。③ 下肢麻木伴放射感型患者经反复保守治疗,脊柱长期不稳定,瘢痕粘连重,结构增生,解剖难以辨认,术中发生神经损伤较腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型患者多,如误将神经根当作瘢痕切除。因瘢痕粘连重,分离瘢痕时过分的剥离牵拉可能损伤神经根。

综上所述,PLIF 手术治疗腰腿痛型和腰腿痛伴下肢麻木型 LDH 患者术后复发的疗效确切,治疗下肢麻木伴放射感型患者的疗效较差。目前临床中对于下肢麻木伴放射感型患者的手术方式选择再次单纯髓核摘除术,以减少不必要的医疗纠纷。

参 考 文 献

[1] LEE J K, AMOROSA L, CHO S K, et al. Recurrent lumbar disk herniation[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2010, 18(6): 327-337.

[2] 沈海敏, 梁承伟, 范永前, 等. 腰椎间盘突出症单纯开窗髓核摘除术远期疗效及相关因素分析[J]. 上海医学, 2007, 30(5): 336-339.

[3] 郑拥军, 叶 乐, 王祥瑞. 经皮椎间孔镜技术治疗腰椎间盘突出症 30 例的近期疗效[J]. 上海医学, 2012, 35(6): 473-475.

[4] TRUUMEE S E. A History of lumbar disc herniation from hippocrates to the 1990s[J]. Clin Orthop Relat Res. 2014 Apr 22. [Epub ahead of print]

[5] 郭继东, 侯树勋, 李 利, 等. 椎板开窗髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症 10 年以上随访的疗效评价[J]. 中国骨伤,

2013, 26(1): 24-28.

[6] MENCHETTI P P, CANERO G, BINI W. Percutaneous laser discectomy: experience and long term follow-up[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 108: 117-121.

[7] SHIN B J. Risk factors for recurrent lumbar disc herniations [J]. Asian Spine J, 2014, 8(2): 211-215.

[8] MIWA S, YOKOGAWA A, KOBAYASHI T, et al. Risk factors of recurrent lumbar disc herniation: a single center study and review of the literature[J]. J Spinal Disord Tech, 2013 Nov 8. [Epub ahead of print]

[9] MEREDITH D S, HUANG R C, NGUYEN J, et al. Obesity increases the risk of recurrent herniated nucleus pulposus after lumbar microdiscectomy[J]. Spine J, 2010, 10(7): 575-580.

[10] AZIMI P, MOHAMMADI H R, MONTAZERI A. An outcome measure of functionality and pain in patients with lumbar disc herniation: a validation study of the Japanese orthopedic association (JOA) score[J]. J Orthop Sci, 2012, 17(4): 341-345.

[11] KNOP C, OESER M, BASTIAN L, et al. Development and validation of the visual analogue scale (VAS) spine score [J]. Unfallchirurg, 2001, 104(6): 488-497.

[12] NOMURA K, YOSHIDA M, KAWAI M, et al. A novel microendoscopically assisted approach for the treatment of recurrent lumbar disc herniation: transosseous discectomy surgery[J]. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2014, 75 (3): 183-188.

[13] NIESCHE M, JURATLI TA, SITOCI K H, et al. Percutaneous pedicle screw and rod fixation with TLIF in a series of 14 patients with recurrent lumbar disc herniation [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2014, 124: 25-31.

[14] LURIE J D, TOSTESON T D, TOSTESON A N, et al. Surgical versus nonoperative treatment for lumbar disc herniation: eight-year results for the spine patient outcomes research trial[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(1): 3-16.

[15] SONMEZ E, COVEN I, SAHINTURK F, et al. Unilateral percutaneous pedicle screw instrumentation with minimally invasive TLIF for the treatment of recurrent lumbar disk disease: 2 years follow-up[J]. Turk Neurosurg, 2013, 23 (3): 372-378.

[16] BALAJI V R, CHIN K F, TUCKER S, et al. Recovery of severe motor deficit secondary to herniated lumbar disc prolapse: is surgical intervention important? A systematic review[J]. Eur Spine J, 2014, 23(9): 1968-1977.

(收稿日期:2014-07-17)
(本文编辑:陈蔚)

• 论 著 •

颈髓损伤后低钠血症的临床分析

李 诚 陈 晓 乔苏迟 刘 畅 朱德刚 吾不力·阿扎提 苏佳灿 王志伟

【摘要】 目的 探讨急性颈髓损伤后低钠血症的临床特点和治疗方法。**方法** 2008 年 5 月—2013 年 12 月上海长海医院收治外伤性颈髓损伤患者 251 例,对其中诊断为低钠血症的 149 例患者的临床特点、治疗方法和结果进行回顾性分析。**结果** 低钠血症组与血钠正常组间年龄、损伤平面、颅脑损伤和感染的构成比的差异均有统计学意义(P 值均 <0.05),两组间 Frankel A 级、Frankel B 级和 Frankel C 级构成比的差异有统计学意义(P 值均 <0.05)。多因素分析结果显示,低钠血症的发生与损伤平面($OR=0.204$)、颅脑损伤($OR=0.172$)、感染($OR=0.351$)、Frankel 分级($OR=2.466$)相关(P 值均 <0.05),而与年龄($OR=0.589$)、性别($OR=1.225$)无关(P 值均 >0.05)。149 例患者低钠血症原因分析,肾外钠丢失 12 例,脑性盐耗综合征 91 例、抗利尿激素分泌异常综合征 40 例,6 例患者因中心静脉压 <12 cmH₂O(1 cmH₂O $=0.098$ kPa)而误诊为脑性盐耗综合征。**结论** 颈髓损伤后低钠血症发病的相关因素较多,其主要发病机制易混淆,治疗时应密切观察患者的血钠水平、尿量、中心静脉压,以及血、尿渗透压,进行综合判断,以决定治疗方案。

【关键词】 颈髓损伤; 低钠血症; 脑性盐耗综合征; 抗利尿激素分泌异常综合征

Clinical analysis of hyponatremia after cervical cord injury LI Cheng, CHEN Xiao, QIAO Suchi, LIU Chang, ZHU Degang, Wubuli AZHATI, SU Jiaca, WANG Zhiwei. Department of Orthopedics, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Corresponding author: WANG Zhiwei. E-mail: shwangzhiwei@vip.sina.com

LI Cheng and CHEN Xiao contributed equally to the work

【Abstract】 Objective To investigate the clinical manifestation and treatment of hyponatremia after acute cervical cord injury. **Methods** A total of 251 patients with traumatic cervical cord injury were admitted to our hospital from May 2008 to December 2013 and 149 patients among them were diagnosed as hyponatremia. Clinical manifestation, treatment and outcome of the 149 patients were analyzed retrospectively. **Results** There were significant differences in age, injured cervical plane, related brain trauma, infection and nerve injury (Frankel A, B and C) between hyponatremia patients and normal serum sodium patients (all $P<0.05$). Multivariate analysis showed that the incidence of hyponatremia was closely related to injured cervical plane ($OR=0.204$), brain trauma ($OR=0.172$), infection ($OR=0.351$) and Frankel classification ($OR=2.466$, all $P<0.05$), but not related to age ($OR=0.589$) or gender ($OR=1.225$, both $P>0.05$). Among the 149 hyponatremia patients, 12 were diagnosed as renal sodium loss, 91 were cerebral salt wasting syndrome and 40 were syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion, while 6 patients were misdiagnosed as cerebral salt wasting syndrome due to low central venous pressure (<12 cmH₂O, 1 cmH₂O $=0.098$ kPa). **Conclusion** There are many factors related to the incidence of hyponatremia after acute cervical cord injury and the main pathogenesis are easily confused. So serum sodium, urine output, central venous pressure and urine osmolality should be carefully observed during treatment. The choice of treatment should be based on a comprehensive judgment. (Shanghai Med J, 2015, 38: 53-56)

【Key words】 Cervical cord injury; Hyponatremia; Cerebral salt wasting syndrome; Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion

作者单位:200433 上海,上海长海医院骨科

通信作者:王志伟,电子邮箱为 shwangzhiwei@vip.sina.com

李诚与陈晓为并列第一作者

普通住院患者中,低钠血症的发生率为 1%~2%,而颈髓损伤患者的低钠血症发生率高达 40%~80%^[1]。低钠血症的起病比较隐匿,往

往被颈髓损伤导致的运动感觉障碍、意识障碍、呼吸和心跳异常等症状掩盖;一旦发生低钠血症,严重的神经系统症状将使已经逐渐恢复的神经功能发生恶化,给治疗带来巨大的困难^[2-3]。目前,关于颈髓损伤后低钠血症的发病机制主要有脑性盐耗综合征(CSWS)和抗利尿激素分泌异常综合征(SIADH)两种^[3-6]。两种机制导致的低钠血症具有相似的临床表现和实验室检查结果,但两者的治疗方法截然相反。盲目地补钠或限水往往会使病情恶化,甚至导致不可挽回的后果。本研究回顾性分析颈髓损伤患者的临床表现和治疗经验,探讨颈髓损伤后低钠血症的临床特点、发病机制和治疗策略。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2008年5月—2013年12月上海长海医院共收治外伤性颈髓损伤患者251例,男150例,女101例;年龄18~79岁,平均年龄为(41.2±6.3)岁。入院时间为受伤后3h~12d,平均入院时间为受伤后(46.2±11.6)h。高位颈髓损伤(C₄以上水平)140例,低位颈髓损伤(C₄和C₄以下水平)111例。根据Frankel标准进行脊髓损伤分级:A级为损伤平面以下深浅感觉完全消失;B级为损伤平面以下深浅感觉完全消失,仅存某些骶区感觉;C级为损伤平面以下仅有某些肌肉运动功能,无有用功能存在;D级为损伤平面以下肌肉功能不完全,可扶拐行走;E级为深浅感觉、肌肉功能和大小便功能良好,可有病理反射。完全性脊髓损伤(Frankel A级)92例,不完全性脊髓损伤(Frankel B至E级)159例。合并颅脑损伤35例,合并感染83例。149例患者连续两次检测血钠水平<135 mmol/L,诊断为低钠血症(低钠

血症组,低钠血症发生时间为受伤后4~12 d),男89例,女60例,平均年龄为(45.2±5.9)岁;另102例患者的血钠水平正常(血钠正常组),男61例,女41例,平均年龄为(37.3±4.3)岁。两组间年龄和性别构成的差异均无统计学意义(*P*值均>0.05)。

1.2 方法 对于血钠水平≥135 mmol/L患者未予特殊治疗。根据血浆渗透压、尿渗透压、尿钠、尿量和中心静脉压(CVP)综合判断低钠血症的发病机制。对于考虑为CSWS的患者根据其血钠水平计算每日补钠量给予补液、补钠治疗;对于考虑为SIADH的患者则限制每日液体量<1 000 mL,并通过微泵补充高渗氯化钠溶液(10%氯化钠溶液60 mL加入0.9%氯化钠溶液500 mL中),直至血钠水平≥135 mmol/L后逐步增加补液量。对于难以明确诊断的患者可进行补液试验或限制液体试验以指导下一步治疗。

1.3 统计学处理 应用SPSS 17.0统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对*t*检验。计数资料以频数(*n*)表示,组间比较采用 χ^2 检验。多因素分析采用Logistic回归分析法。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料 低钠血症组与血钠正常组间年龄、损伤平面、颅脑损伤和感染的构成比的差异均有统计学意义(*P*值均<0.05)。两组间Frankel A级、Frankel B级和Frankel C级构成比的差异有统计学意义(*P*值均<0.05),Frankel D级和Frankel E级构成比的差异无统计学意义(*P*值均>0.05)。见表1。

表 1 两组患者的一般资料比较

组别	N	年龄		损伤平面		颅脑损伤		感染		Frankel 分级				
		<60 岁	≥60 岁	C ₄ 以上	C ₄ 和 C ₄ 以下	有	无	有	无	A	B	C	D	E
低钠血症	149	98	51	109	40	31	118	62	87	76	39	28	4	2
血钠正常	102	81	21	31	71	4	98	21	81	16	12	29	25	20

≥60岁患者的低钠血症发生率显著高于<60岁的患者(*P*<0.05),损伤平面为C₄以上患者的低钠血症发生率显著高于损伤平面为C₄和C₄以下患者(*P*<0.05),颅脑损伤患者的低钠血症发生率显著高于无颅脑损伤患者(*P*<0.05),感染患

者的低钠血症发生率显著高于无感染患者(*P*<0.05),Frankel A级患者的低钠血症发生率显著高于Frankel B级、C级、D级和E级患者(*P*值均<0.05),Frankel B级患者的低钠血症发生率显著高于Frankel C级、D级和E级患者(*P*值均<

0.05),Frankel C 级的患者低钠血症发生率显著高于 Franked D 级和 E 级患者(P 值均 <0.05)。见表 2。

表 2 低钠血症的相关因素分析

因素	N	低钠血症发生率 $n(\%)$
年龄		
<60 岁	179	98(54.7)
≥60 岁	72	51(70.8) ^①
性别		
男	150	89(59.3)
女	101	60(59.4)
损伤平面		
C ₄ 以上	140	109(77.9)
C ₄ 和 C ₄ 以下	111	40(36.0) ^②
颅脑损伤		
有	35	31(88.6)
无	216	118(54.6) ^③
感染		
有	83	62(74.7)
无	168	87(51.8) ^④
Frankel 分级		
A 级	92	76(82.6)
B 级	51	39(76.5) ^⑤
C 级	57	28(49.1) ^{⑤⑥}
D 级	29	4(13.8) ^{⑤⑥⑦}
E 级	22	2(9.1) ^{⑤⑥⑦}

与年龄 <60 岁患者比较:^① $P<0.05$;与损伤平面为 C₄ 以上患者比较:^② $P<0.05$;与颅脑损伤患者比较:^③ $P<0.05$;与感染患者比较:^④ $P<0.05$;与 Frankel 分级 A 级患者比较:^⑤ $P<0.05$;与 Frankel 分级 B 级患者比较:^⑥ $P<0.05$;与 Frankel 分级 C 级患者比较:^⑦ $P<0.05$

2.2 多因素分析 低钠血症的发生与损伤平面($OR=0.204$)、颅脑损伤($OR=0.172$)、感染($OR=0.351$)、Frankel 分级($OR=2.466$)相关(P 值均 <0.05),而与年龄($OR=0.589$)、性别($OR=1.225$)不相关(P 值均 >0.05)。

2.3 低钠血症的原因分析、治疗和转归 149 例低钠血症患者中,12 例患者因高热、大汗、呕吐等原因诊断为肾外钠丢失,予常规补钠、补液后血钠水平逐渐恢复正常,其中 5 例因颅内损伤、肺部感染等自动出院或死亡。102 例患者分别诊断为 CSWS(72 例)和 SIADH(30 例),给予相应治疗后 92 例逐渐好转出院,7 例因颅脑损伤、肺部感染等原因自动出院或死亡,3 例因血钠水平持续进行性降低导致循环衰竭、脑水肿等而放弃治疗。29 例患者因诊断困难进行补液试验或限制液体试验后,19 例诊断为 CSWS,10 例诊断为 SIADH,给予相应治疗后 24 例好转出院,5 例自动出院或死亡。6 例患者因 $CVP<12\text{ cmH}_2\text{O}$ ($1\text{ cmH}_2\text{O}=$

0.098 kPa)而误诊为 CSWS,给予补液、补钠后因症状逐渐加重而停止大量补液,限制每日液体量,给予适当补钠后,4 例逐渐好转,2 例因血钠水平进行性降低而死亡。

3 讨 论

本研究结果显示, ≥ 60 岁的患者低钠血症发生率显著高于 <60 岁患者,但多因素分析结果并未发现年龄与低钠血症的发生有关。提示,年龄可能只是低钠血症发生的混杂因素。男性与女性患者间低钠血症发生率的差异无统计学意义,表明低钠血症的发生与性别无关。损伤平面为 C₄ 以上的患者低钠血症发生率显著高于损伤平面为 C₄ 和 C₄ 以下的患者,表明低钠血症的发生与损伤平面有关,损伤平面越高低钠血症的发生率越高。Frankel A 级的患者低钠血症发生率为 82.6%,Frankel B 级为 76.5%,分别显著高于其他分级,表明低钠血症的发生与脊髓损伤程度有关,脊髓损伤程度越高,低钠血症的发生率越高。颅脑损伤患者的低钠血症发生率显著高于无颅脑损伤患者,表明低钠血症的发生与是否合并颅脑损伤有关,与颅脑损伤患者易发生 CSWS 或 SIADH 有关;感染患者的低钠血症发生率显著高于无感染患者,表明低钠血症的发生与感染有关,可能与感染患者常合并高热、多汗或需呼吸机支持等原因导致肾外钠丢失有关。

急性颈髓损伤后并发低钠血症受多种因素影响,目前认为,导致低钠血症的原因主要分为非中枢性低钠血症和中枢性低钠血症两大类^[2-3,7]。非中枢性低钠血症包括肾外钠丢失(高热多汗、呕吐、腹泻和大量失血等)、大量使用脱水剂(如甘露醇、呋塞米等利尿剂)、合并其他基础疾病如糖和(或)盐皮质激素不足、甲状腺功能低下、水肿等。中枢性低钠血症包括 SIADH 和 CSWS^[2-4,6-10]。SIADH 是指主要由下丘脑损伤导致抗利尿激素(ADH)的分泌阈值降低,ADH 的分泌与血浆渗透压不平衡,ADH 分泌增多,水潴留,尿钠排出增多,导致稀释性低钠血症发生。单纯脊髓损伤一般不影响下丘脑,其可能的机制为脊髓损伤后平面以下血管失去交感神经支配,血管张力降低,有效循环血量减少,从而刺激压力感受器使 ADH 分泌过多,导致稀释性低钠血症发生^[11-12]。CSWS 是指中枢神经系统损伤导致肾脏丢失大量水和

钠,出现低血钠、高尿钠,从而导致低血容量型低钠血症发生^[6]。SIADH 和 CSWS 是导致颈髓损伤后低钠血症最主要的原因,两者的临床表现和实验室检查结果比较接近,鉴别困难。然而,由于两种疾病的致病机制不同,治疗方法截然不同,故治疗前进行鉴别诊断尤为重要。

对于血浆渗透压降低的患者应评估其尿液渗透压,<20 mmol/L 可判断为肾外钠丢失,>20 mmol/L 则为中枢性钠丢失^[7]。针对 SAIDH 和 CSWS 机制的研究发现,其诊断要点为血容量,通过监测 CVP 能较好地对两者进行鉴别。对于少数鉴别诊断困难的患者,不能盲目进行治疗,否则会加重病情,必要时可进行如下鉴别试验。① 补液试验:对条件允许的患者可予0.9%氯化钠溶液静脉注射,如患者症状改善为 CSWS,无改善则考虑为 SIADH。② 限制液体试验:在患者条件允许的情况下限制液体进入,如血浆渗透压逐渐升高、尿钠排出减少则考虑为 SIADH。

临床医师在救治颈髓损伤患者时往往更多地关注患者有无运动感觉异常、呼吸困难,以及生命体征和颅脑损伤等严重的临床症状,易忽视电解质紊乱给整个救治过程带来的影响。低钠血症是颈髓损伤后可能发生的严重并发症,可加重脊髓损伤,甚至导致患者死亡。对低钠血症进行早期诊断、早期干预有助于改善颈髓损伤患者的预后。

参 考 文 献

[1] OWEN J A, CAMPBELL D G. A comparison of plasma electrolyte and urea values in healthy persons and in hospital patients[J]. Clin Chim Acta, 1968, 22(4): 611-618.

[2] 康 健,王新伟,袁 文. 急性颈髓损伤后的低钠血症的研

究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2009, 7(1): 55-57.

[3] FREY F J. Hyponatraemia in patients with neurosurgical disorders: SIADH or cerebral salt wasting syndrome? [J]. Ther Umsch, 2009, 66(11): 769-772.

[4] 杨茂伟,吕 刚,范广宇. 急性颈椎脊髓损伤后低钠血症的临床特点及治疗[J]. 中华外科杂志, 2003, 41(8): 639-640.

[5] FURLAN J C, FEHLINGS M G. Hyponatremia in the acute stage after traumatic cervical spinal cord injury: clinical and neuroanatomic evidence for autonomic dysfunction[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(5): 501-511.

[6] 孙 杰,窦京涛,吕朝晖,等. 抗利尿激素分泌不适当综合征的不同诊断标准的比较研究[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(9): 703-706.

[7] PALMER B F. Hyponatremia in patients with central nervous system disease: SIADH versus CSW[J]. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(4): 182-187.

[8] 朱志刚,金大地,陈建庭,等. 急性脊髓损伤后并发重度低钠血症的临床分析[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(22): 3481-3482.

[9] KARLSSON A K, KRASSIOUKOV A V. Hyponatremia-induced transient visual disturbances in acute spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2004, 42(3): 204-207.

[10] 王 鹤,胡 勇. 急性颈脊髓损伤并发低钠血症的机制及治疗分析[J]. 中国骨伤, 2012, 25(4): 306-309.

[11] 杨叶虹,孙 皎,叶红英. 选择性血管加压素 V2 受体拮抗剂治疗抗利尿激素分泌异常综合征的疗效和安全性[J]. 上海医学, 2014, 37(1): 57-59.

[12] NAKAO Y, SUDA K, SHIMOKAWA N, et al. Risk factor analysis for low blood pressure and hyponatremia in acutely and subacutely spinal cord injured patients[J]. Spinal Cord, 2012, 50(4): 285-288.

(收稿日期 2014-10-24)

(本文编辑:陈蔚)

2015 年《上海医学》杂志征订启事

《上海医学》创刊于 1978 年,是由上海市医学会主办、国内外公开发行的综合性学术刊物,被确定为国家级自然科学核心期刊及综合性医药卫生类核心期刊。

随着对临床疾病复杂性认识的提高和诊疗技术与策略的增多,专业学科进一步从基础和临床上分科细化已不可避免。但许多疾病很少仅局限于单一器官,且其病理生理有明显的重叠,因此需综合考虑和积极采取防治对策。自 2009 年起,本刊联合多个学科对临床热点、难点问题报道,为各科医务人员构建一个多学科交流的平台。本刊设有述评、专论、论著、综述、讲座、临床经验交流、会议纪要、学术动态、疑难病例讨论等栏目。

本刊为月刊,2015 年每期定价为人民币 15.00 元,全年 180.00 元。

欢迎临床、科研和教学人员来稿及订阅。

全国各地邮局均可订阅。邮发代号:4-191。

• 论 著 •

贻贝多糖 MP-I 的抗肿瘤活性及其机制

张建鹏 卢小铃 刘小宇 焦炳华

【摘要】 目的 利用制备的贻贝多糖 *Mytilus polysaccharide-I*(MP-I)进行体外抗肿瘤活性验证,并探讨其机制。**方法** 水提醇沉法获得贻贝多糖纯品 MP-I。培养多种肿瘤细胞,分别以 2×10^5 /mL 细胞数接种于 96 孔板,加入终浓度为 20、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MP-I 多糖溶液(分别为 MP-I 低、中、高剂量组),以及 0.9%氯化钠溶液(对照组)、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5-氟尿嘧啶溶液(5-Fu 组),采用 MTT 比色法检测 MP-I 的体外抗肿瘤活性。对数生长期的 MKN-45 肿瘤细胞,以 5×10^5 /mL 细胞数接种于 6 孔板,Western 印迹法检测不同剂量 MP-I 处理后 MKN-45 肿瘤细胞 P65 蛋白表达水平。MKN-45 肿瘤细胞接种 BALB/c 裸鼠,分别腹腔注射 0.9%氯化钠溶液(对照组)、5-Fu 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (5-Fu 组)、MP-I 20 和 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (MP-I 低、高剂量组),观察 MP-I 体内抑瘤作用。**结果** MP-I 中、高剂量组对 MKN-45、MCF-7、HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞的抑制率均显著高于 MP-I 低剂量组(P 值分别 <0.01 、 0.05),MP-I 高剂量组对 MCF-7、HO-8910、K562 肿瘤细胞的抑制率均显著高于 MP-I 中剂量组(P 值分别 <0.01 、 0.05)。5-Fu 组和 MP-I 低、高剂量组的裸鼠体重均显著低于对照组(P 值分别 <0.01 、 0.05),MP-I 低、高剂量组又显著高于 5-Fu 组(P 值分别 <0.01 、 0.05)。5-Fu 组、MP-I 低剂量组的瘤重均显著低于对照组(P 值均 <0.01),MP-I 低、高剂量组又显著高于 5-Fu 组(P 值均 <0.01)。5-Fu 组和 MP-I 低、高剂量组间抑瘤率的差异均无统计学意义(P 值均 >0.05)。对照组在培养 24 和 48 h 的 MKN-45 肿瘤细胞 P65 蛋白相对表达量显著高于 MP-I 低、中、高剂量组(P 值均 <0.01),后 3 组间的差异也有统计学意义(P 值均 <0.01)。对照组脾淋巴细胞活力的光密度值为 0.42 ± 0.03 ,显著低于 MP-I 低剂量组的 0.48 ± 0.04 ($P < 0.05$)和 MP-I 高剂量组的 0.59 ± 0.04 ($P < 0.01$),MP-I 高剂量组与 MP-I 低剂量组间的差异也有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 贻贝多糖 MP-I 对 MKN-45、MCF-7、HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞有体外抑制作用,并且在体内能够抑制 MKN-45 细胞生长,其抑制肿瘤细胞生长的作用可能是通过调控 NF- κ B 信号通路来实现的。

【关键词】 贻贝; 多糖; 抗肿瘤作用

Anti-tumor activity and mechanism of polysaccharide isolated from *Mytilus coruscus* * ZHANG

Jianpeng, LU Xiaoling, LIU Xiaoyu, JIAO Binghua. * Department of Biochemistry and Molecular Biology,

College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: JIAO Binghua. E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate anti-tumor activity and mechanism of polysaccharide isolated from *Mytilus coruscus*. **Methods** The *Mytilus polysaccharide-I* (MP-I) was extracted from *Mytilus coruscus*. Tumor cells were cultured at 2×10^5 per milliliter in 96 well plates and treated with 500, 100 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP-I (high-dose group, middle-dose group and low-dose group), 0.9% sodium chloride solution (control group) and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-fluorouracil (5-Fu group), respectively. The *in vitro* anti-tumor activity of MP-I was assessed by using methylthiazolyldiphenyl- tetrazolium bromide (MTT) method. Haman gastric cell line (MKN)-45 cells were cultured at 5×10^5 per milliliter in 6 well plates and treated with different concentrations of MP-I. The P65 protein level in MKN-45 cells was detected by western blotting. MKN-45 cells were xenografted in Balb /c nude mice. The tumor-bearing mice were divided into control group (0.9% sodium chloride solution), 5-Fu group (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and two drug test groups (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ MP-I group and 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ MP-I group). Body mass and tumor

基金项目:上海市科学技术委员会长三角联合攻关项目资助(10495810300)

作者单位:200433 上海,第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室

通信作者:焦炳华,电子邮箱为 jiaobh@uninet.com.cn

mass were measured to assess *in vivo* anti-tumor activity of MP-I. **Results** The results of MTT showed that the inhibition rates of MKN-45, MCF-7, HO-8910, K562 and SMMC-7721 tumor cells *in vitro* were significantly higher in MP-I middle and high dose groups than those in MP-I low dose group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The inhibition rates of MCF-7, HO-8910 and K562 cells in MP-I high dose group were significantly higher than that of MP-I middle dose group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The body mass of BALB/c nude mice in 5-Fu group, MP-I high and low dose groups were significantly lower than that in control group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The body mass of BALB/c nude mice in MP-I low and high dose groups were significantly higher than that in 5-Fu group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The tumor mass of 5-Fu group and MP-I low dose group were significantly lower than that of control group (all $P<0.01$). The tumor mass of MP-I low and high dose groups were significantly higher than that of 5-Fu group (both $P<0.01$). There was no significant difference in tumor inhibition ratio between the three test groups (all $P>0.05$). The expression level of nuclear factor (NF)- κ B p65 in MKN-45 cell in different dose MP-I groups after 24 h and 48 h treatment were significantly lower than that in control group (all $P<0.01$). There were significant differences in NF- κ B P65 levels between three MP-I groups (all $P<0.01$). The *D* value of the splenic lymphocyte activity in control group was 0.42 ± 0.03 , which was significantly lower than that in MP-I low dose group (0.48 ± 0.04 , $P<0.05$) and high dose group (0.59 ± 0.04 , $P<0.01$). A statistical difference in the splenic lymphocyte activity was found between MP-I high and low dose group ($P<0.05$). **Conclusion** Polysaccharide MP-I has inhibitory effect on tumor cell lines MKN-45, MCF-7, HO-8910, K562 and SMMC-7721 *in vitro* and MKN-45 cells *in vivo*. Down-regulation of NF- κ B signal pathway may play an important role in its anti-tumor activity. (Shanghai Med J, 2015, 38: 57-61)

【Key words】 Mussels; Polysaccharides; Antitumor action

厚壳贻贝属于海洋软体动物门双壳纲贻贝目贻贝科,盛产于中国渤海、黄海等海域。有研究^[1]证实,贻贝提取物具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、抗菌,以及增强机体免疫能力、降低血脂含量的功效。多糖作为贻贝中重要的有效活性成分,同样具有增强机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗放射性、抗衰老等多种活性。本研究测定厚壳贻贝多糖 Mytilus polysaccharide-I (MP-I) 的体内、外抗肿瘤活性,探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 厚壳贻贝由浙江省嵊山县翔远水产有限公司提供,并经浙江海洋学院赵盛龙教授证实。氯仿、正丁醇为国药集团化学试剂有限公司产品,5-氟尿嘧啶(5-Fu)为上海制药十二厂产品,RPMI 1640 培养基、Gibco 产品、MTT、Sigma 产品、FCS 为杭州四季青产品。96 孔细胞培养板为美国 Corning 公司产品,Model 550 酶联反应仪为美国 Bio-Rad 公司产品,二氧化碳(CO₂)恒温培养箱为日本三洋公司,P65 抗体为碧云天生物有限公司产品。实验动物由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 肿瘤细胞系 人卵巢癌细胞系(HO-8910)、人乳腺癌细胞系(MCF-7)、人红白血病细胞系

(K562)、人白血病细胞系(HL-60)、人肝癌细胞系(SMMC-7721、HepG-2)、人子宫颈癌 Hela 细胞系、人胰腺癌细胞系(SW-1990)和人胃癌细胞系(AGS、MKN-28、MKN-45)均由本实验室保存。

1.3 多糖 MP-I 的分离纯化 MP-I 的分离纯化参考徐红丽等^[2]的方法并加以改良。新鲜贻贝软体组织匀浆后,加入 1% 甲醇溶液浸泡 24 h 去脂,2 500×g 离心 10 min,取沉淀。热水抽提,醇沉过夜。6 500×g,离心 10 min,收集沉淀,分别用无水乙醇和丙酮洗涤 2 次,干燥得多糖水提物。Sevage 法除蛋白(样品:氯仿:正丁醇为 20:4:1),反复 4 次。旋转蒸发 50 ℃减压浓缩上层水相,加 3 倍体积无水乙醇沉淀过夜,弃上清液,冷冻干燥得粗多糖。

将粗多糖溶于蒸馏水,6 500×g 离心 10 min,收集上清液,不溶物再次在热水浴中溶于蒸馏水,离心弃沉淀,合并上清液,终浓度为 0.2 g/mL。上二乙胺基乙基琼脂糖(DEAE-Sepharose F. F XK-50)离子交换制备柱,蒸馏水洗脱。苯酚-硫酸法(1:5)跟踪检测收集多糖组分,至无糖洗出为止。真空冷冻干燥浓缩多糖洗脱液,得到多糖提取物半纯品。半纯品复溶于蒸馏水,7 000×g 离心 10 min,弃沉淀,浓度为 0.2 g/mL,上 Sepharose CL-6B 凝胶制备柱,蒸馏水洗脱,苯酚-硫酸法跟踪检测收集多糖组

分,至无糖洗出为止。重复上 Sepharose CL-6B 凝胶制备柱,至高效液相层析(HPLC)检测呈单一对称峰。真空冷冻干燥得到多糖精制品。多糖精制品配制成 5 mg/mL 母液备用。

1.4 多糖的体外抗肿瘤活性测定(MTT 比色法)^[3] 0.25%胰酶消化处于对数生长期的上述肿瘤细胞,分别调整细胞数为 2×10^5 /mL,接种于 96 孔板,每组 6 个重复孔,每孔 90 μ L,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 0.05 的 CO₂ 条件下贴壁 24 h,加入不同浓度的 MP-I 多糖溶液 10 μ L,使终浓度分别为 500、100、20 μ g /mL(分别为 MP-I 低、中、高剂量组),同时设对照组(0.9%氯化钠溶液)、5-Fu 组(5 μ g/mL)。加样后培养 72 h,每孔加入 10 μ L MTT (5 mg/mL),继续培养 4 h。小心吸弃上清液(悬浮细胞离心后弃上清液),每孔加入 DMSO 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 放置过夜,待结晶完全溶解后,用酶标免疫测定仪在 590 nm 处测定各孔光密度值(*D* 值)。抑制率=(对照组 *D* 值-各药物处理组 *D* 值)/对照组 *D* 值 $\times 100\%$ 。

1.5 MP-I 体内抑瘤实验^[4] 0.25%胰酶消化 MKN-45 培养细胞,含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养液终止消化,150 $\times g$ 离心 5 min,弃上清液,0.9%氯化钠溶液洗涤 2 次,调整细胞数至 5×10^6 /mL。抽取 0.2 mL 细胞悬液,接种于 BALB/c 裸鼠右下腹股沟皮下。接种 1 周后,荷瘤鼠随机分为 0.9%氯化钠溶液组(对照组)、5-Fu 组(50 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)。MP-I 低和高剂量组(20、100 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹),隔天腹腔注射,连续给药 4 周。颈椎脱臼处死裸鼠,称重后解剖完整取出移植瘤组织,称重。抑瘤率(%)=(对照组瘤重-各药物处理组瘤重)/对照组瘤重 $\times 100\%$ 。

1.6 MP-I 对 MKN-45 细胞 NF- κ Bp65 基因表达的影响 0.25%胰酶消化处于对数生长期的 MKN-45 肿瘤细胞,调整细胞数为 5×10^5 /mL,接种于 6 孔板,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 0.05 的 CO₂ 条件下贴壁生长 24 h,加入不同质量浓度的 MP-I 多糖溶液 50 μ L,使终浓度分别为 20、100、500 μ g/mL(分别为 MP-I 低、中、高剂量组),同时设对照组(0.9%氯化钠溶液 50 μ L),分别继续培养 24、48 h。收集细胞,采用 Western 印迹法检测 P65 蛋白表达水平。

1.7 MP-I 对荷瘤小鼠免疫功能的影响 昆明种小鼠 18 只,体重为(18 $\pm$ 2) g,雄性,随机分入对照

组和 MP-I 低、高剂量组。接种 MKN-45 肿瘤细胞株后,MP-I 低剂量组和高剂量组小鼠分别腹腔注射质量浓度为 0.1、0.5 mg/mL 的 MP-I 溶液 0.2 mL,对照组小鼠注射等量 0.9%氯化钠溶液。接种肿瘤细胞株后连续注射 24 d,引颈法处死小鼠,取脾脏,通过 200 目钢丝网,150 $\times g$ 离心 5 min 弃上清液,10%FBS-RPMI-1640 培养液洗 2 次,加少量细胞培养液培养 2~4 h 后,种入 96 孔板(2×10^3 /孔),继续培养 24 h 后采用 MTT 比色法检测脾脏淋巴细胞增殖能力。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MP-I 体外抗肿瘤实验结果 5-Fu 组和 MP-I 低、中、高剂量组 MKN-45、MCF-7、HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞的 *D* 值均显著低于对照组(P 值均 < 0.01),MP-I 中、高剂量组均显著低于 MP-I 低剂量组(P 值分别 < 0.01 、0.05)。MP-I 中、高剂量组对 MKN-45、MCF-7、HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞的抑制率均显著高于 MP-I 低剂量组(P 值分别 < 0.01 、0.05),MP-I 高剂量组对 MCF-7、HO-8910、K562 肿瘤细胞的抑制率显著高于 MP-I 中剂量组(P 值分别 < 0.01 、0.05)。见表 1。

2.2 MP-I 体内抑瘤实验结果 5-Fu 组和 MP-I 低、高剂量组的裸鼠体重均显著低于对照组(P 值分别 < 0.01 、0.05),MP-I 低、高剂量组又显著高于 5-Fu 组(P 值分别 < 0.01 、0.05)。5-Fu 组、MP-I 低剂量组的瘤重均显著低于对照组(P 值均 < 0.01),MP-I 低、高剂量组又显著高于 5-Fu 组(P 值均 < 0.01)。5-Fu 组和 MP-I 低、高剂量组间抑瘤率的差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。见表 2。

2.3 P65 蛋白表达水平 对照组在培养 24 h 时的 MKN-45 肿瘤细胞 P65 蛋白相对表达量为 0.984 ± 0.014 ,显著高于 MP-I 低剂量组的 0.922 ± 0.006 、MP-I 中剂量组的 0.776 ± 0.011 、MP-I 高剂量组的 0.674 ± 0.008 (P 值均 < 0.01),后 3 组间的差异也有统计学意义(P 值均 < 0.01)。对照组培养在 48 h 时的 MKN-45 肿瘤细胞 P65 蛋白相对表达量为 0.984 ± 0.012 ,显著高于 MP-I 低剂量组的 0.611 ± 0.008 、MP-I 中剂量组的

0.724±0.016、MP-I 高剂量组的 0.653±0.014,后 3 组间的差异也有统计学意义(P 值均<0.01)。

表 1 MP-I 对体外培养 MKN-45、MCF-7、HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞的抑制作用

组别	MKN-45		MCF-7		HO-8910	
	D 值	抑制率 (%)	D 值	抑制率 (%)	D 值	抑制率 (%)
对照	0.812±0.038	—	0.888±0.069	—	0.634±0.048	—
5-Fu	0.389±0.046 ^①	52.12±5.67	0.448±0.012 ^①	49.56±1.35	0.406±0.054 ^①	35.96±8.52
MP-I 低剂量	0.544±0.016 ^①	32.96±1.97	0.798±0.004 ^①	10.17±0.45	0.558±0.016 ^①	11.99±2.52
MP-I 中剂量	0.436±0.032 ^{①③}	46.33±3.94 ^③	0.713±0.038 ^{①③}	19.77±4.28 ^③	0.527±0.027 ^{①③}	16.88±4.26 ^③
MP-I 高剂量	0.341±0.058 ^{①③}	56.06±7.14 ^③	0.565±0.066 ^{①③⑤}	36.38±7.43 ^{③⑤}	0.507±0.011 ^{①③⑤}	20.03±1.74 ^{③⑤}

组别	K562		SMMC-7721	
	D 值	抑制率 (%)	D 值	抑制率 (%)
对照	0.537±0.021	—	0.679±0.058	—
5-Fu	0.388±0.018 ^①	27.75±3.35	0.433±0.015 ^①	36.23±2.21
MP-I 低剂量	0.502±0.012 ^①	6.52±2.24	0.574±0.022 ^①	15.46±3.24
MP-I 中剂量	0.464±0.010 ^{①③}	13.60±1.86 ^③	0.551±0.008 ^{①②}	18.85±1.18 ^②
MP-I 高剂量	0.447±0.014 ^{①③④}	16.76±2.61 ^{③④}	0.547±0.012 ^{①②}	19.44±1.77 ^②

与对照组比较:① $P<0.01$;与 MP-I 低剂量组比较:② $P<0.05$,③ $P<0.01$;与 MP-I 中剂量组比较:④ $P<0.05$,⑤ $P<0.01$

表 2 MP-I 对裸鼠移植瘤的抑制作用

组别	(n=5, $\bar{x} \pm s$)		
	体重 (g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
对照	25.88±2.36	0.64±0.11	—
5-Fu	20.72±1.22 ^②	0.38±0.24 ^②	44.12±20.31
MP-I 低剂量	24.30±0.98 ^{①④}	0.47±0.18 ^{②④}	30.88±10.94
MP-I 高剂量	22.58±1.61 ^{②③}	0.41±0.21 ^④	39.71±15.63

与对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与 5-Fu 组比较:③ $P<$

0.05,④ $P<0.01$

2.4 MP-I 对荷瘤小鼠免疫功能的影响 对照组脾淋巴细胞活力的 D 值为 0.42 ± 0.03 ,显著低于 MP-I 低剂量组的 0.48 ± 0.04 ($P<0.05$)和 MP-I 高剂量组的 0.59 ± 0.04 ($P<0.01$),MP-I 高剂量组与 MP-I 低剂量组间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

本研究的体外抗肿瘤活性结果显示,MP-I 对所选用的不同肿瘤细胞都有一定的抑制作用。相对于 HO-8910、K562、SMMC-7721 肿瘤细胞,MP-I 对 MKN-45、MCF-7 的生长抑制作用更为明显。其中,MP-I 高剂量组对 MKN-45、MCF-7 肿瘤细胞的抑制率分别达到 $(56.06 \pm 7.14)\%$ 、 $(36.38 \pm 7.43)\%$ 。MP-I 对体内生长的肿瘤细胞也有显著的抑制作用。多糖抗肿瘤作用机制是多方位、多环节的。生物多糖一方面可以作为免疫增强剂,提高机体免疫器官功能,激活体液免疫和细胞免疫活性,以及增强机体抗氧化、抗自由基作用而发挥其抗肿瘤活性;同时多糖对肿瘤细胞有直接的细胞毒性作用,可以通过改变细胞膜及其

超微结构,抑制肿瘤细胞周期,诱导癌细胞凋亡,以及影响肿瘤细胞核酸和蛋白质的合成等途径发挥抗肿瘤活性^[5-9]。而对不同肿瘤细胞的抑制差异可能是由于不同的肿瘤细胞有不同的凋亡阈,即对药物浓度和(或)药物类型的敏感性不同所致。

P65 是一种重要转录因子,其可通过调控一系列基因的表达参与细胞增殖、凋亡和肿瘤转化,其过度表达推进细胞周期演进并抑制凋亡,在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用。本实验结果显示经不同浓度 MP-I 处理后,MKN-45 细胞的 P65 蛋白表达水平均下调,表明 MP-I 对肿瘤细胞 NF- κ B 信号通路的调控可能是其发挥抗肿瘤活性的重要机制之一。

多糖的抗肿瘤活性还能够通过提高机体免疫能力来实现^[9]。本研究发现,MP-I 能够显著提高荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖活力,提示贻贝多糖在体内可以通过提高体液和细胞免疫水平的途径发挥其抗肿瘤活性。

参 考 文 献

[1] 段伟文, 罗伟, 段振华, 等. 贻贝的加工利用研究进展. 渔业现代化[J]. 2013, 40(3): 51-55.

[2] 徐红丽, 郭婷婷, 郭一峰, 等. 贻贝水溶性多糖 MP-I 的分离纯化及体外抗肿瘤活性研究[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(9): 998-1001.

[3] MIAO S, MAO X, PEI R, et al. Antitumor activity of polysaccharides from *Lepista sordida* against laryngocarcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 60: 235-240.

[4] CHONG P K, LEE H, ZHOU J, et al. Reduced plasma

APOA1 level is associated with gastric tumor growth in MKN45 mouse xenograft model[J]. J Proteomics, 2010, 73 (8): 1632-1640.

[5] 王 斌,袁 甜,张译文,等. 仿刺参肠多糖提取物对小鼠实体瘤的抑制作用[J]. 大连海洋大学学报[J]. 2012, 27 (3): 195-199.

[6] 周庆峰,李明月,那广水,等. 海洋生物多糖抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (8): 995-997.

[7] YANG B, XIAO B, SUN T. Antitumor and immunomodulatory activity of Astragalus membranaceus polysaccharides in H22 tumor-bearing mice[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 62: 287-290.

[8] 林 俊,李 萍,陈靠山. 近 5 年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1116-1125.

[9] FAN L, DING S, AI L, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from Inonotus obliquus[J]. Carbohydr Polym, 2012, 90 (2): 870-874.

(收稿日期:2013-12-04)

(本文编辑:王小燕)

• 病例报告 •

胃癌肝内多发转移伴严重低血糖一例

袁莎莎 范朝华 杨宏杰

1 临床资料 患者男,57 岁,因夜间反复盗汗 1 周,突发神志不清 0.5 h 入院,测定血糖为 1.9 mmol/L,予积极纠正低血糖治疗,同时行病因学检查。患者既往有高血压病史 6 年余,最高血压为 152/90 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),长期口服马来酸左旋氨氯地平片(商品名玄宁)2.5 mg/次,每日 1 次,血压基本控制在正常范围内。否认肝炎、消化系统疾病、糖尿病、冠状动脉性心脏病等。体格检查:腹部略膨隆,右肋下 2 cm 可触及肝脏,表面光滑,双下肢略浮肿。实验室检查:空腹血糖为 2.57 mmol/L;空腹胰岛素为 3.10 mU/L,餐后 2 h 胰岛素为 17.82 mU/L;AFP 为 666.2 ng/mL,CA125 16 U/mL,细胞角蛋白 19 片段(CA21-1)为 43.51 ng/mL。上腹部 CT 检查示,胃体部占位,首先考虑恶性肿瘤,伴肝脏多发转移,肝胃间隙、肠系膜根部和腹膜后淋巴结转移(图 1,见封三);慢性胆囊炎、胆囊结石。胃镜和活组织病理学检查示,(胃体)腺癌,浅表萎缩性胃炎(图 2,见插页)。Karnofsky(KPS)评分 <60 分,不宜行化学和介入治疗等,予口服中药、纠正低血糖等治疗,患者血糖一直处于较低水平,最低血糖值为 0.9 mmol/L;予 24 h 持续静脉输注葡萄糖溶液,患者仍间断发生低血糖。入院治疗 21 d,患者突发昏迷,随机测血糖为 10.2 mmol/L,心率逐渐降至 30 次/min,指末氧测不出,血压测不出,家属主动要求放弃一切抢救措施,遂未予抢救,患者死亡。

2 讨 论 低血糖为肿瘤伴癌综合征之一,总体发病率较低,除胰腺肿瘤引起胰岛素分泌异常导致低血糖外,肝脏肿瘤是引起低血糖的重要原因。胃肠道肿瘤在未发生肝脏转移前也可能产生低血糖,甚至是顽固性低血糖,

因发病率低易被忽视。有学者^[1]曾报道 1 例胃癌伴严重低血糖病例,其低血糖可能与肿瘤细胞产生胰岛素样生长因子(IGF)-Ⅱ有关,该患者的血胰岛素水平在正常范围内,与本例患者情况相似。本例患者出现低血糖的可能原因:原发灶的肿瘤细胞异位分泌胰岛素样活性物质;巨大肿瘤消耗大量葡萄糖;肿瘤细胞产生 IGF-Ⅱ抑制生长激素分泌,并抑制肝糖原的分解。当血糖<2.8 mmol/L,大脑皮质受损易导致意识不清、嗜睡、精神症状,甚至昏迷。昏迷时间>6 h 可能出现不可逆脑组织损害,严重者可导致死亡。故应关注低血糖对机体的损伤,尤其是对脑组织的伤害。动物实验发现,低血糖后血糖升高越快对脑细胞的损害越明显^[2-3]。于是有学者提出“葡萄糖再灌注脑损害”的概念。血糖升高速度越快,脑损害明显,提示可能存在“葡萄糖再灌注脑损害”^[3]。本例患者突发昏迷,血糖为 10.2 mmol/L,可能与低血糖后“葡萄糖再灌注脑损害”有关。

参 考 文 献

[1] KATO A, BANDO E, SHINOZAKI S, et al. Severe hypoglycemia and hypokalemia in association with liver metastases of gastric cancer[J]. Intern Med, 2004, 43(9): 824-828.

[2] SUHS W, GUME T, HAMBY A M, et al. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4): 910-918.

[3] 褚秀丽,赵玉武,米亚静,等. 血糖升高水平对大鼠低血糖性脑损伤的影响[J]. 中华糖尿病杂志, 2012, 4(3): 170-176.

(收稿日期:2014-06-23)

(本文编辑:王小燕)

• 短篇论著 •

口炎清颗粒治疗轻型复发性阿弗它溃疡的临床疗效

王雅敏 陶 岚

复发性阿弗它溃疡(RAU)是口腔黏膜病中的常见病和多发病,发病率高达 20%^[1]。由于 RAU 病程反复迁延,溃疡发作频繁且疼痛剧烈,从而影响患者正常的工作,降低其生活质量。因此寻找不良反应小且疗效好的药物是口腔科医师密切关注的问题。本研究应用口炎清颗粒治疗 90 例轻型 RAU 患者,并进行疗效观察。

1 对象与方法

1.1 研究对象和分组 轻型 RAU 患者 90 例。入选标准:病程≥1 年,RAU 发病史≥2 次,平均每月至少发作 1 次,溃疡发生时间<48 h。排除标准:重型 RAU,白塞综合征,口炎型 RAU;全身系统性疾病,如严重心、肝、肾、造血系统疾病;消化性溃疡,克罗恩病;急性感染性疾病;精神病;24 h 内使用镇静药物,1 个月内使用抗生素、消炎药,3 个月内使用全身皮质类固醇、免疫抑制剂;对本药物过敏;妊娠或哺乳期;不能随访或未按规定用药。根据 CASIO fx-3600(Scientific Calculator)产生的随机数字将患者分入治疗组和对照组,每组 45 例。

1.2 给药方法 治疗组患者口服口炎清颗粒(广州白云山和记黄埔中药有限公司生产),每日 2 次,每次 1 袋,每袋 10 g,温水冲服,连续服用 2 个月。对照组患者口服栀子金花丸,每日 2 次,每次半袋,每袋 9 g,连续服用 2 个月。在 6 个月的观察期内不使用其他任何药物,严格控制可变因素,以保证研究结果的可靠性。

1.3 疗效评定标准 采用 RAU 疗效评价试行标准 IN 分级法和 DP 分级法(中华口腔医学会口腔黏膜病专业委员会第一届第三次全体会议讨论通过)^[2]评价疗效。溃疡愈合后即可评价首次疗效,记录首次溃疡愈合时间和首次疼痛视觉模拟评分(VAS 评分)。VAS 评分应用长 10 cm 的直线,分为 5 等分,直线的 0 端表示“无痛”,2 cm 处表示用舌或筷子轻触溃疡可诱发疼痛,4 cm 处表示用干棉签轻触溃疡可诱发疼痛,6 cm 处表示用湿棉签轻触溃疡可诱发疼痛,8 cm 处表示经常痛但不影响工作,10 cm 处表示最剧烈的疼痛。患者根据疼痛的程度,在直线的相应尺度作记录,每天 1 次,记录溃疡期每天的疼痛 VAS 评分。随访 6 个月,记录溃疡复发次数、溃疡总数和溃疡平均愈合

天数。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料以频数(*n*)表示,组间比较采用 Fisher's 精确概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料 治疗组男 17 例,女 28 例,平均年龄为(35.5±11.2)岁。对照组男 18 例,女 27 例,平均年龄为(36.4±12.4)岁。两组间年龄和性别构成的差异均无统计学意义(*P* 值均>0.05)。

2.2 首次疗效评价 治疗组首次溃疡愈合时间为(4.1±1.2) d,显著短于对照组的(8.6±2.2) d($P < 0.01$)。治疗组的首次疼痛 VAS 评分为(2.7±1.5)分,显著低于对照组的(4.3±1.0)分($P < 0.01$)。

2.3 随访 6 个月疗效评价 随访 6 个月,治疗组的溃疡复发次数为(3.1±1.2)次,显著少于对照组的(6.2±2.3)次($P < 0.01$);治疗组的溃疡总数为(2.0±1.5)个,显著少于对照组的(5.0±1.6)个($P < 0.01$);治疗组溃疡平均愈合天数为(3.9±1.1) d,显著短于对照组的(7.9±2.1) d ($P < 0.01$)。

3 讨 论

祖国医学认为,舌为心之苗,脾开窍于口,脾经连舌本。邪毒内蕴心脾,或情志内郁,心火亢盛,循经上蒸于舌口,而发溃疡。在 RAU 的众多致病因素中,免疫因素与 RAU 的发生和发展密切相关^[3]。在 RAU 的发生过程中,津、阴、精的缺失贯穿于整个病机变化的始终。肝肾为阴精生代之源,津液为口腔外卫防护之屏障,并起温润之功,其运在气,其化在阴。因此,津、阴、精三者的生化平衡,共同维持着口腔内部正常生理功能的活动,倘若因肝肾不足,津、阴、精化生之源匮乏,则出现口腔失养,随之发生 RAU。

在口炎清颗粒的成分中,天冬甘苦性寒,归肾经,功能清肺降火,滋降润燥;麦冬甘微苦,性微寒,归心胃经,具润肺养阴,益胃生津、清心除烦,二冬相伍,共奏养阴生津之功;金银花味甘性寒,归肺胃经,功专清热解毒,并具散结消肿之功,可疗火毒引起的溃疡肿痛而效著;玄参味甘苦咸,性寒,归肺、胃、肾经,既能清热解毒,亦可清营养阴,与

基金项目: 2000125 上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学院浦东分院口腔科(王雅敏),口腔综合科(陶岚)
通信作者:陶岚,电子邮箱为 13917166195@139.com

二冬合用,增强养阴补肾、滋阴降火之力,增防热盛伤阴劫液之效;甘草既有补气而行津之功,又有缓诸药过寒伤阳之弊与缓解疼痛之效。诸药相配标本兼治。本研究结果显示,治疗组的首次溃疡愈合时间和随访 6 个月时的溃疡平均愈合天数均显著短于对照组,首次疼痛指数显著低于对照组,随访 6 个月时的溃疡复发次数显著少于对照组,表明口炎清颗粒能延长 RAU 发作的间歇期。此外,治疗组随访 6 个月时的溃疡总数显著少于对照组,表明口炎清颗粒具有减少口腔溃疡复发总数的功效。本药制剂颗粒晶莹,微苦而甜,适用于各年龄段的患者,其治疗 RAU 效果显著,具有临床推广价值。长期疗效尚有待作进一步的观察与研究。

参 考 文 献

[1] RHODUS N L, BEREUTER J. An evaluation of a chemical

cautery agent and an anti-inflammatory ointment for the treatment of recurrent aphthous stomatitis: a pilot study [J]. Quintessence Int, 1998, 29(12): 769-773.
[2] 中华口腔医学会口腔黏膜病专业委员会. 复发性阿弗它溃疡疗效评价试行标准[J]. 临床口腔医学杂志, 2001, 17 (3): 209-210.
[3] CHANDRASEKHAR J, LIEM A A, COX N H, et al. Oxypentifylline in the management of recurrent aphthous oral ulcers: an open clinical trial[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1999, 87(5): 564-567.

(收稿日期:2014-08-15)

(本文编辑:唐清蓉)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《上海医学》杂志可直接使用缩写的常用词汇

本刊对一些医师比较熟悉的常用词汇将允许直接使用缩写,即第 1 次出现时,可以不标注中文,如下所列(按英文缩写的首字母顺序排列):

ABC(亲合素-生物素-过氧化物酶复合物)	FDA(食品和药品管理局)	OR(比值比)
ADP(二磷酸腺苷)	FITC(异硫氰酸荧光素)	PBS(磷酸盐缓冲液)
ATP(三磷酸腺苷)	GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	PCR(聚合酶链反应)
AUC(曲线下面积)	H-E 染色(苏木精-伊红染色)	ROC 曲线(受试者工作特征曲线)
Bax(B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2 伴随 X 蛋白)	HEPES(羟乙基哌嗪乙磺酸)	RR(相对危险度)
bcl-2(B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2)	HRP(辣根过氧化物酶)	RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)
BMI(体质指数)	ICU(重症监护病房)	SABC 法(链霉亲合素-生物素-过氧化物酶复合物技术)
cAMP(环磷酸腺苷)	IFN(干扰素)	SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)
CRP(C 反应蛋白)	IL(白细胞介素)	SP 法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法)
CT(计算机断层扫描)	INR(国际标准化比值)	TGF(转化生长因子)
DAB(二氨基联苯胺)	MRI(磁共振成像)	TNF(肿瘤坏死因子)
DEPC(焦炭酸二乙酯)	MTT 法(四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法)	Tris-HCl(三羟甲基氨基甲烷/盐酸缓冲液)
DMEM 培养基 (Dulbecco 改良的 Eagle 培养基)	NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)	TUNEL 法(脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法)
DMSO(二甲基亚砷)	NADH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)	WHO(世界卫生组织)
DTT(二巯苏糖醇)	NADP(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)	95%CI(95%可信区间)
ECL(电化学发光)	NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)	β-actin(β-肌动蛋白)
EDTA(乙二胺四乙酸)	NASID(非甾体抗炎药)	
ELISA(酶联免疫吸附试验)	NF(核转录因子)	
FBS(胎牛血清)	OAA/S 评分(警觉与镇静评分)	
FCS(小牛血清)		

• 综述 •

血流储备分数在经皮冠状动脉介入治疗中的应用进展

陆 浩 葛 雷 葛均波

冠状动脉造影(CAG)是目前诊断冠状动脉性心脏病最常用和最重要的手段。随着对冠状动脉血流动力学和病理生理学的研究不断深入,单纯CAG提供的形态学信息已不能满足临床评价狭窄性病变生理功能评价的需要。尤其对于稳定性心绞痛患者,血运重建治疗策略能否带来临床获益尚存争论;对于已存在客观缺血证据的冠状动脉性心脏病患者,血运重建能够显著改善其预后^[1-2]。非侵入性检查手段评介冠状动脉狭窄性病变功能的敏感性和空间分辨率均较低,故在血运重建前很少应用^[3-4]。血流储备分数(FFR)反映了冠状动脉狭窄病变对心肌灌注的影响,目前认为其是侵入性检测方法中冠状动脉狭窄功能学评价的金标准^[5]。此外,既往研究^[6-9]结果显示,与CAG相比,FFR指导的经皮冠状动脉介入治疗(PCI)能够带来更大的临床获益。因此,最新指南推荐,对于那些可能引起缺血的狭窄病变,应用FFR评价血管狭窄程度被推荐为I类证据^[10-11]。但是在实际临床工作中,对于稳定性心绞痛,临床医师很少将FFR应用于指导血运重建策略。本综述对FFR在指导PCI,尤其是稳定性冠状动脉性心脏病患者血运重建治疗策略中的作用加以概述,以此推动FFR在此类患者治疗策略的制定中发挥更大的作用。

1 FFR 功能学评价的依据

FFR是指在存在狭窄病变的情况下,该冠状动脉所提供心肌区域能获得的最大血流量与同一区域在正常情况下所能获得的最大血流量之比。与传统的冠状动脉血流储备(CFR)、冠状动

脉血流速度储备相比,FFR能特异地反映心外膜冠状动脉狭窄的严重程度,且不受心率、血压、心肌收缩力等血流动力学因素变化和正常参照血管的影响,从而对开口病变、分支血管、多支病变和弥漫性病变均有一定的指导意义。

FFR在诞生早期主要针对临界病变、模糊病变是否进行血运重建而进行探讨,主要与传统的无创功能学检测方法和CAG指导下的血运重建预后进行对比,同时期的临床试验以1996年Pijls等^[5]发表的文献最为著名,该研究在45例冠状动脉中度狭窄患者中,将运动负荷实验、核素心肌灌注显像、超声心动图多巴酚丁胺试验、CAG与FFR进行对比。研究结果显示,FFR <0.75 的21例患者中均至少存在1个可诱导的心肌缺血指标,接受冠状动脉介入治疗或冠状动脉旁路移植术后,阳性指标转为阴性;而在FFR ≥ 0.75 的患者中,有87.5%(21/24)的患者无创检查心肌缺血指标为阴性,未进行血运重建,在14个月的随访期中无不良事件发生。因此认为,在冠状动脉临界病变患者中,FFR可用于评价病变的功能学意义,0.75作为FFR指导下血运重建的临界点被初步建立。

随后的多项研究结果表明,以FFR <0.75 作为诊断心肌缺血的标准,准确率高达95%,高于运动负荷试验、超声心动图多巴酚丁胺试验和核素心肌灌注显像,提示FFR <0.75 可作为冠状动脉狭窄病变引起心肌缺血的诊断标准,予PCI是合理的^[12];而FFR >0.80 时,药物治疗^[13-14]与延期PCI^[15-16]间心脏事件发生率和临床症状改善程度的差异均无统计学意义,故两种方法,均安全、可行。FFR为0.75~0.80是目前多项研究中无法统一定论的“灰区”,尚需进一步明确。

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院心内科,上海市心血管病研究所

通信作者:葛均波,电子邮箱为jbge@zs-hospital.sh.cn

2 冠状动脉狭窄病变功能学评价的重要意义

对于急性冠状动脉综合征(ACS)患者,血运重建被认为是一种最为有效的治疗措施,而其能否给稳定性冠状动脉性心脏病患者带来更大的临床获益目前尚不很明确。针对这类人群,大量的临床试验比较了血运重建治疗与最佳药物治疗的临床疗效,其中最著名的两项随机对照临床试验为 COURAGE (clinical outcomes utilizing revascularization and aggressive drug evaluation) 研究^[17] 和 BARI2D (bypass angioplasty revascularization investigation 2 diabetes) 研究^[18]。两项研究结果均表明,上述两种治疗策略在降低病死率、非致死性心肌梗死发生率方面无明显差异。一项应用单光子发射计算机断层扫描技术的回顾性研究^[19]结果表明,对于中、重度心肌缺血(缺血面积 $>10\%$)的稳定性心绞痛患者,PCI 治疗较单纯药物治疗能更显著降低心源性病死率;PCI 治疗缺血面积 $>20\%$ 的患者 1.9 年的病死率为 6.7% ,显著高于单纯药物治疗者的 2.0% ($P<0.05$)。COURAGE 研究放射性核素亚组分析结果也显示,对心肌缺血面积较大的稳定性心绞痛患者,PCI 治疗较单纯药物治疗更能减轻心肌缺血的程度,且显著降低患者死亡和非致死性心肌梗死的发生率。

缺血指导的 PCI 是指对心肌灌注异常区域相对应的病变血管进行血运重建治疗。与非缺血指导的 PCI 组相比,缺血指导的 PCI 组的主要心血管事件和脑血管事件的发生率,包括死亡、心肌梗死、脑卒中和再次血运重建的发生率显著降低(16.2% 比 20.7% , $P=0.001$),其中以再次血运重建的发生率降低最明显(9.9% 比 22.8% , $P=0.009$)^[20]。对于多支血管病变的患者,缺血指导的 PCI 可降低再次血运重建和主要心血管事件发生的风险。因此,对于存在中、重度缺血的稳定性冠状动脉性心脏病患者,针对改善心肌缺血的 PCI,其临床获益明显高于单纯药物治疗,然而,目前已有的无创性功能检查手段的敏感性较差,且不能明确区分特定的心肌缺血区域相对应的狭窄血管。

3 影像学检查预测血管功能性狭窄存在局限性

先前认为,CAG 显示的固定冠状动脉管腔狭

窄可客观地反映心肌缺血,对直径狭窄程度 $\geq 70\%$ 的狭窄病变应给予 PCI。然而,冠状动脉循环的自身调节功能十分强大,心肌能获得的最大血流量是静态的 4~6 倍。近年来的研究通过测定 FFR 发现,解剖狭窄并不表示心肌缺血,CAG 检查示存在明显狭窄的病变,FFR 测定后,未显示有明显的功能性狭窄;相反,一些 CAG 检查上看似无明显狭窄的病变,却明显影响冠状动脉血流。

FAME (FFR versus angiography for multivessel evaluation) 研究^[21]详细分析了 CAG 检查显示的结构性狭窄与 FFR 测定的功能性狭窄之间的误差。根据 CAG 检查结果判定为 3 支血管病变的患者,经 FFR 测定后仅 14% 为 3 支病变, 43% 为 2 支病变, 34% 为 1 支病变, 9% 为无功能性狭窄病变。CAG 诊断为冠状动脉狭窄程度 $>50\%$ 的 1 329 例患者中,只有 816 例(61%)患者的 FFR ≤ 0.8 。经 CAG 检查证实血管直径狭窄程度 $50\%\sim 70\%$ 的病变中, 35% 与心肌缺血有关;直径狭窄程度 $71\%\sim 90\%$ 的病变中, 20% 不诱发心肌缺血;直径狭窄程度 $91\%\sim 99\%$ 的病变中仍有 4% 并非功能性狭窄病变。由此可见,如果没有 FFR 的指导,仅以 CAG 结果为依据,相当一部分原本无心肌缺血的患者被过度治疗,另外约有 $1/3$ 的心肌缺血患者被忽略。

在过去的 10 余年里,心血管介入医师对于血管内超声(IVUS)测定出的最小管腔面积(MLA) $<4\text{ mm}^2$ 的病变部位即植入支架^[22]。最近一项研究纳入了 201 例冠状动脉性心脏病患者,在 PCI 术前行 IVUS 检查和 FFR 测定。研究发现,FFR <0.8 的病变,IVUS 测得 MLA $<2.4\text{ mm}^2$,因此认为 MLA $<2.4\text{ mm}^2$ 可很好地预测 FFR <0.8 。虽然这一标准比既往的研究标准更加严格,但实际上,在 MLA $<2.4\text{ mm}^2$ 的病变中,仅 37% 的病变处测得的 FFR <0.80 ^[23]。FIRST (fractional flow reserve and intravascular ultrasound relationship study) 研究^[24]探讨了 IVUS 测得 MLA 与 FFR <0.80 的相关性。350 例患者(367 处中度病变)接受 FFR、IVUS 和虚拟组织学 IVUS 检查。当采用参考血管直径(RVD)分析时,IVUS 测得的 MLA 预测 FFR <0.8 的准确率提高:当 RVD $<3.0\text{ mm}$ 时,MLA $<2.4\text{ mm}^2$ 最佳;当 RVD $3.0\sim 3.5\text{ mm}$ 时,MLA $<2.7\text{ mm}^2$ 最佳;当

RVD>3.5 mm 时, MLA<3.6 mm² 最佳。FFR 与斑块负荷相关, 与其他斑块形态无关, MLA 最佳切点值取决于 RVD。对于左主干病变, MLA<6.0 mm² 与 FFR<0.75 具有良好的相关性^[25]; 但对亚裔人群而言, 其正常冠状动脉直径相对较小, 研究发现 MLA<4.8 mm² 与 FFR<0.8, MLA<4.1 mm² 与 FFR<0.75 的相关性更好^[26]。

光学相干断层成像(OCT)是一种新的高分辨率断面成像模式。Shiono 等^[27]评估了 59 例患者中 62 处中等程度狭窄病变 OCT 与 FFR 的相关性, 结果显示, OCT 测定 MLA<1.91 mm², 最小管腔直径<1.35 mm, 管腔面积狭窄>70% 是 FFR<0.75 的良好切点。Gonzalo 等^[28]比较了 OCT、IVUS 与 FFR 在识别功能性狭窄病变中的准确性, 该研究入选了 56 例患者 62 处狭窄病变, 结果表明, OCT 与 IVUS 识别 FFR<0.8 的狭窄病变的准确性无差异, 但当血管直径<3 mm 时, OCT 的准确性高于 IVUS。

冠状动脉狭窄的功能学改变与多种临床和病变的特异性因素相关, 而这些因素在 CAG、IVUS 和 OCT 检查中并不能被识别, 单纯的结构性评价病变并不能准确地反映狭窄血管的功能学改变。因此, 心脏介入医师应常规行 FFR 测定, 尤其是对于稳定性冠状动脉性心脏病和多支血管病变患者, 从而更好地指导功能性血运重建治疗策略。

4 FFR 指导冠状动脉性心脏病介入治疗的研究进展

FFR 指导的 PCI 是指只有当冠状动脉病变存在功能性狭窄, 一般认为 FFR≤0.8 时, 才考虑行 PCI, 其临床可行性和获益在多支血管病变的患者得以体现。Wongpraparut 等^[7]在 137 例多支血管病变的患者中, 比较经 FFR 指导的 PCI 与传统 CAG 指导 PCI 的临床结局。FFR 指导的 PCI 组随访 30 个月的无心脏事件发生率为 89%, 显著高于传统 PCI 组的 59% ($P<0.01$)。

DEFER (FFR to determine the appropriateness of angioplasty in moderate coronary stenosis) 研究^[29]是第一项应用 FFR 评价血管狭窄的里程碑式的临床试验, 共纳入 325 例 CAG 检查示单支血管病变、中度血管狭窄的冠状动脉性心脏病患者, 对每一个病变都进行 FFR 测定, 如果 FFR≥0.75, 则随机分入药物治疗组

(91 例) 和 PCI 组 (90 例); 如果 FFR<0.75, 提示存在明显的心肌缺血证据, 即行 PCI, 为对照组 (144 例)。随访 5 年时, 药物治疗组和 PCI 组的复合终点包括病死率和心肌梗死发生率分别为 3.3% 和 7.9%, 两组间差异无统计学意义 ($P=0.21$)。对于 FFR≥0.75 的患者, 心源性死亡或急性心肌梗死的每年发生的风险低于 1%, 支架的植入并不能使其获益。FFR<0.75 是患者导致心源性死亡或者急性心肌梗死的重要危险指标, 即使对此类患者行 PCI, 5 年后的随访结果显示, 其病死率或者急性心肌梗死发生率仍比 FFR≥0.75 的患者高 5 倍。

FAME 研究^[30]目的是在多支血管病变的冠状动脉性心脏病患者中比较采用 FFR 指导药物洗脱支架 (DES) 植入术和采用 CAG 指导 DES 植入术的效果。入选人群包括 CAG 检查示存在多支血管病变 (3 支主要冠状动脉分支中至少有 2 支的直径狭窄程度≥50%), 并认为需行 PCI 的患者, ST 段抬高型心肌梗死患者如果梗死发生于 PCI 前 5 d 以上者也可入选。该研究共入选 1 005 例患者, 496 例随机接受 CAG 指导的 PCI, 509 例接受 FFR 指导的 PCI。经 FFR 指导的 PCI 组的支架植入数目和对比剂的使用剂量中位数分别为 (1.9±1.3) 个、272 mL, 显著低于 CAG 指导的 PCI 组的 (2.7±1.2) 个、302 mL (P 值均<0.001)。1 年随访结果显示, FFR 指导的 PCI 组主要心血管事件发生率、心肌梗死或死亡的复合终点发生率分别为 13.2%、7.3%, 分别显著低于传统 PCI 组的 18.4%、11% (P 值分别为 0.02、0.04); 随访 2 年, FFR 指导的 PCI 组在降低死亡或心肌梗死的发生率方面仍具有显著优势 (8.4% 比 12.9%, $P=0.02$)。FAME 研究结果具有重要的临床意义, 该研究结果表明, 在多支冠状动脉病变的患者中, PCI 中常规测定 FFR 与由造影指导的所谓标准 PCI 策略相比, 有益预后能维持到随访 2 年时; 此外, 根据 FFR>0.8 而推迟行 PCI 的患者的预后良好。因此, 常规测定 FFR 指导多支血管病变患者的 PCI 治疗, 可达到功能上的完全血运重建, 可能通过更慎重地使用支架并获得相同的心肌缺血的缓解而改善患者的预后, 不仅可降低医疗费用, 也可避免不必要的支架植入所带来的支架内血栓或再狭窄的风险, 从而最大程度

地发挥 PCI 的益处。

FAME II 研究是针对 FAME 研究的延续^[31],该研究将稳定性心绞痛患者随机分入经 FFR 指导的 PCI+最佳药物治疗组和单纯最佳药物治疗组,比较两组间临床结局、安全性和经济效益的差异。该研究在欧洲和北美的 28 个中心开展,由于独立数据和安全监测委员会发现两组间主要终点事件发生率的差异有统计学意义,因此该研究于 2012 年 1 月 15 日被提前停止。该研究纳入适合接受 PCI 的稳定型冠状动脉疾病患者和血管造影证实单支、双支或 3 支冠状动脉病变且适合接受 PCI 的患者,原计划纳入 1 832 例患者,实际共纳入 1 220 例,其中 888 例具有至少 1 处 $\text{FFR} \leq 0.80$ 的狭窄病变;447 例被随机分入 FFR 指导的 PCI+最佳药物治疗组,441 例被分入单纯最佳药物治疗组;332 例经血管造影证实具有明显狭窄病变但狭窄病变 $\text{FFR} > 0.80$ 的患者被纳入注册研究,接受单纯最佳药物治疗。平均随访时间为 212 d,PCI+最佳药物治疗组发生心肌梗死、死亡或进行紧急血运重建(复合主要终点)的患者比例为 4.3%,显著低于单纯最佳药物治疗组的 12.7%($P < 0.001$)。这一差异主要缘于单纯最佳药物治疗组进行紧急血运重建的患者比例为 PCI+最佳药物治疗组的 13 倍(1.6%比 11.1%, $P < 0.001$),而 PCI+最佳药物治疗组与药物治疗组间全因病死率和心肌梗死发生率的差异无统计学意义。因此,对于 $\text{FFR} \leq 0.8$ 的狭窄病变行 PCI,能够明显降低再次紧急住院和再次血运重建治疗的发生率。

Li 等^[32]进行了一项关于 FFR 指导 PCI 治疗的回顾性研究,共纳入了 Mayo Clinic 中心在 2002 年 10 月—2009 年 12 月期间所有行 PCI 术的 7 358 例患者,分入 FFR 指导组(在 FFR 指导下行 PCI,1 090 例)、无 FFR 指导组(未在 FFR 指导下行 PCI,6 268 例)。FFR 指导组的患者又分入 FFR 后即行 PCI 组(721 例)和延迟 PCI 组(FFR 评估后延期行 PCI 治疗,369 例)。中位随访期为 50.9 个月。无 FFR 指导组在随访 7 年时主要心血管事件的 Kaplan-Meier 分数为 57.0%,显著高于 FFR 指导组的 50.0%($P = 0.016$)。相较于血管造影指导下的 PCI 治疗,FFR 指导组患者死亡或心肌梗死的发生率有低于无 FFR 指导组的趋

势,但差异无统计学意义($HR = 0.85$,95%CI 为 0.71~1.01, $P = 0.06$);FFR 指导组的延迟 PCI 治疗策略与心肌梗死的发生率呈独立相关关系($HR = 0.46$,95%CI 为 0.26~0.82, $P = 0.008$)。0.75~0.80 间的 FFR 通常被认为是灰色地带,该研究还发现排除 FFR 为 0.75~0.80 而选择行延期 PCI 的患者后,FFR 的应用可显著降低死亡和心肌梗死的发生率($HR = 0.80$,95%CI 为 0.66~0.96, $P = 0.02$)。这一重要研究结果说明至少一处血流动力学显著狭窄而不进行处理时,患者结局不良,该研究也再次将 FFR 为 0.80 确定为临床阈值。新近的一项 Meta 分析^[33]入选了 3 097 例患者(3 796 处病变),分析并比较 FFR 指导下 PCI 治疗和延迟 PCI 治疗两组患者的预后,两组间死亡、急性心肌梗死发生率的差异均无统计学意义,表明 FFR 指导下的延迟 PCI 是安全的。因此,在目前的医疗实践中,FFR 指导的治疗策略的远期临床结局较优,应在导管治疗决策中采用 FFR 指导。

FFR 可以应用于冠状动脉连续狭窄病变中指导介入治疗策略的选择,根据 FFR 结果选择需要介入处理的病变,避免植入支架所带来的风险^[34]。此外,研究发现 FFR 在指导弥漫性病变、分支病变、支架覆盖的边支血管病变和 ACS 非靶血管病变等的介入治疗中具有重要指导作用^[35-36],但证据多来源于观察性研究,尚缺乏随机对照研究。在 ACS 患者中,尤其是 ST 段抬高型心肌梗死患者中,FFR 评估非罪犯血管病变程度存在局限性,因为 ACS 时患者的左心室舒张末压力升高并且存在微循环功能障碍,从而可能会高估 FFR 的结果,在这种情况下,如果 FFR 明显降低可以证明存在功能性狭窄,但正常 FFR 的结果往往不确定^[37]。因此,FFR 在 ACS 中的应用尚待进一步研究。

5 小 结

FFR 可以直接评价受病变影响的目标血管血流动力学和生理功能,提供病变部位特异的诊断,且与预后相关性较高。大量的临床试验结果表明,作为一项侵入性功能检查手段,FFR 在选择合适的 PCI 人群、合适病变、避免不必要的介入操作和改善患者的预后方面具有重要意义。对于稳定

性冠状动脉性心脏病和多支血管病变患者的血运重建治疗策略的制定,应充分发挥 FFR 的指导作用。FFR 亦存在一定的局限性,FFR 单纯提供狭窄病变的生理功能评价,但介入治疗需要整体的临床特点和狭窄病变的解剖信息,应考虑多方面因素。总之,FFR 可对传统的 CAG 提供相应的诊断和决策,在复杂病变的介入治疗中,FFR 联合 CAG 和 IVUS 具有更个体化的指导作用,发挥其无以伦比的优势。

参 考 文 献

- [1] SHAW L J, BERMAN D S, MARON D J, et al. Optimal medical therapy with or without percutaneous coronary intervention to reduce ischemic burden: results from the clinical outcomes utilizing revascularization and aggressive drug evaluation (COURAGE) trial nuclear substudy[J]. *Circulation*, 2008, 117(10): 1283-1291.
- [2] ERNE P, SCHOENENBERGER A W, BURCKHARDT D, et al. Effects of percutaneous coronary interventions in silent ischemia after myocardial infarction: the SWISSI II randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2007, 297(18): 1985-1991.
- [3] LIMA R S, WATSON D D, GOODE A R, et al. Incremental value of combined perfusion and function over perfusion alone by gated SPECT myocardial perfusion imaging for detection of severe three-vessel coronary artery disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(1): 64-70.
- [4] LIN G A, DUDLEY R A, LUCAS F L, et al. Frequency of stress testing to document ischemia prior to elective percutaneous coronary intervention[J]. *JAMA*, 2008, 300(15): 1765-1773.
- [5] PIJLS N H, DE BRUYNE B, PEELS K, et al. Measurement of fractional flow reserve to assess the functional severity of coronary-artery stenoses[J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(26): 1703-1708.
- [6] LEGALERY P, SCHIELE F, SERONDE M F, et al. One-year outcome of patients submitted to routine fractional flow reserve assessment to determine the need for angioplasty[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(24): 2623-2629.
- [7] WONGPRAPARUT N, YALAMANCHILI V, PASNOORI V, et al. Thirty-month outcome after fractional flow reserve-guided versus conventional multivessel percutaneous coronary intervention[J]. *Am J Cardiol*, 2005, 96(7): 877-884.
- [8] KOO B K, PARK K W, KANG H J, et al. Physiological evaluation of the provisional side-branch intervention strategy for bifurcation lesions using fractional flow reserve[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(6): 726-732.
- [9] TONINO P A, DE BRUYNE B, PIJLS N H, et al. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(3): 213-224.
- [10] KUSHNER F G, HAND M, SMITH S C Jr, et al. 2009 Focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused Update): a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines[J]. *Circulation*, 2009, 120(22): 2271-2306.
- [11] WIJNS W, KOLH P, DANCHIN N, et al. Guidelines on myocardial revascularization[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(20): 2501-2555.
- [12] RAGOSTA M, BISHOP A H, LIPSON L C, et al. Comparison between angiography and fractional flow reserve versus single-photon emission computed tomographic myocardial perfusion imaging for determining lesion significance in patients with multivessel coronary disease[J]. *Am J Cardiol*, 2007, 99(7): 896-902.
- [13] COURTIS J, RODÉSCABAU J, LAROSE E, et al. Comparison of medical treatment and coronary revascularization in patients with moderate coronary lesions and borderline fractional flow reserve measurements[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2008, 71(4): 541-548.
- [14] RIEBER J, SCHIELE T M, KOENIG A, et al. Long-term safety of therapy stratification in patients with intermediate coronary lesions based on intracoronary pressure measurements[J]. *Am J Cardiol*, 2002, 90(10): 1160-1164.
- [15] BECH G J, PIJLS N H, DE BRUYNE B, et al. Usefulness of fractional flow reserve to predict clinical outcome after balloon angioplasty[J]. *Circulation*, 1999, 99(7): 883-888.
- [16] BERGER A, BOTMAN K J, MACCARTHY P A, et al. Long-term clinical outcome after fractional flow reserve-guided percutaneous coronary intervention in patients with multivessel disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(3): 438-442.
- [17] BODEN W E, O'ROURKE R A, TEO K K, et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(15): 1503-1516.
- [18] FRYE R L, AUGUST P, BROOKS M M, et al. A randomized trial of therapies for type 2 diabetes and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(24): 2503-2515.
- [19] HACHAMOVITCH R, HAYES S W, FRIEDMAN J D, et al. Comparison of the short-term survival benefit associated with revascularization compared with medical therapy in

- patients with no prior coronary artery disease undergoing stress myocardial perfusion single photon emission computed tomography[J]. *Circulation*, 2003, 107(23): 2900-2907.
- [20] KIM Y H, AHN J M, PARK D W, et al. Impact of ischemia-guided revascularization with myocardial perfusion imaging for patients with multivessel coronary disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(3): 181-190.
- [21] TONINO P A, FEARON W F, DE BRUYNE B, et al. Angiographic versus functional severity of coronary artery stenoses in the FAME study fractional flow reserve versus angiography in multivessel evaluation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(25): 2816-2821.
- [22] ABIZAID A, MINTZ G S, PICHARD A D, et al. Clinical, intravascular ultrasound, and quantitative angiographic determinants of the coronary flow reserve before and after percutaneous transluminal coronary angioplasty[J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(4): 423-428.
- [23] KANG S J, LEE J Y, AHN J M, et al. Validation of intravascular ultrasound-derived parameters with fractional flow reserve for assessment of coronary stenosis severity[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(1): 65-71.
- [24] WAKSMAN R, LEGUTKO J, SINGH J, et al. FIRST: fractional flow reserve and intravascular ultrasound relationship study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(9): 917-923.
- [25] KANG S J, LEE J Y, AHN J M, et al. Intravascular ultrasound-derived predictors for fractional flow reserve in intermediate left main disease[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2011, 4(11): 1168-1174.
- [26] PARK S J, KIM Y H, PARK D W, et al. Impact of intravascular ultrasound guidance on long-term mortality in stenting for unprotected left main coronary artery stenosis [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2009, 2(3): 167-177.
- [27] SHIONO Y, KITABATA H, KUBO T, et al. Optical coherence tomography-derived anatomical criteria for functionally significant coronary stenosis assessed by fractional flow reserve[J]. *Circ J*, 2012, 76(9): 2218-2225.
- [28] GONZALO N, ESCANED J, ALFONSO F, et al. Morphometric assessment of coronary stenosis relevance with optical coherence tomography: a comparison with fractional flow reserve and intravascular ultrasound[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(12): 1080-1089.
- [29] PIJLS N H, VAN SCHAARDENBURGH P, MANOHARAN G, et al. Percutaneous coronary intervention of functionally nonsignificant stenosis: 5-year follow-up of the DEFER Study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(21): 2105-2111.
- [30] PIJLS N H, FEARON W F, TONINO P A, et al. Fractional flow reserve versus angiography for guiding percutaneous coronary intervention in patients with multivessel coronary artery disease: 2-year follow-up of the FAME (Fractional flow reserve versus angiography for multivessel evaluation) study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(3): 177-184.
- [31] DE BRUYNE B, PIJLS N H, KALESAN B, et al. Fractional flow reserve-guided PCI versus medical therapy in stable coronary disease[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(11): 991-1001.
- [32] LI J, ELRASHIDI M Y, FLAMMER A J, et al. Long-term outcomes of fractional flow reserve-guided *vs.* angiography-guided percutaneous coronary intervention in contemporary practice[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(18): 1375-1383.
- [33] NASCIMENTO B R, BELFORT A F, MACEDO F A, et al. Meta-analysis of deferral versus performance of coronary intervention based on coronary pressure-derived fractional flow reserve[J]. *Am J Cardiol*, 2014, Nov 13. [Epub ahead of print]
- [34] KIM H L, KOO B K, NAM C W, et al. Clinical and physiological outcomes of fractional flow reserve-guided percutaneous coronary intervention in patients with serial stenoses within one coronary artery[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2012, 5(10): 1013-1018.
- [35] PIJLS N H, SELS J W. Functional measurement of coronary stenosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(12): 1045-1057.
- [36] LOTFI A, JEREMIAS A, FEARON W F, et al. Expert consensus statement on the use of fractional flow reserve, intravascular ultrasound, and optical coherence tomography: a consensus statement of the society of cardiovascular angiography and interventions [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2014, 83(4): 509-518.
- [37] NTALIANIS A, SELS J W, DAVIDAVICIUS G, et al. Fractional flow reserve for the assessment of nonculprit coronary artery stenoses in patients with acute myocardial infarction[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2010, 3(12): 1274-1281.

(收稿日期:2013-12-11)

(本文编辑:王小燕)

• 综述 •

长链非编码 RNA 与心脏发育和心血管疾病

于 硕 马 宏 项美香

心脏是胚胎发育中第 1 个形成并发挥功能的器官,为血液循环持续提供动力,以满足随机体发育而不断增长的循环和代谢需求。心脏经历了生心细胞分化、心管发生、心脏环化、左右不对称发育和室腔形成等独特发育阶段,最终形成由心肌细胞、自律细胞、成纤维细胞、内皮细胞等多种细胞类型组成的高度功能化的复杂三维生物组织。从昆虫到哺乳动物的进化研究^[1]中发现,心脏发育受到 Hand、Nkx、GATA、Tbx 等高度保守基因的精细调控,并依赖这一基因网络对各种生理和病理刺激作出迅速有效的响应,基因调节异常将引起心脏功能和结构缺陷,从而导致多种心血管疾病发生。研究心脏基因调控网络将有助于揭示心脏发育和心血管疾病的分子机制,为新的靶向性临床治疗措施提供实验依据^[2]。

人类基因组约有 30 亿对碱基,包含了调控器官发育和功能的大量遗传信息。生物信息的传递有赖于基因组、表观组、转录组和蛋白组的协调统一,这需要一个巨大且精细的调节机制整合不同层次的分子信息网络。人类基因组计划和 DNA 元件百科全书计划(encyclopedia of DNA elements,ENCODE)发现,超过 98% 的基因组序列会被转录,但仅有约 1.5% 参与编码氨基酸,大量非编码 RNA 是基因网络的重要调控元件^[3-4]。其中,长于 200 个核苷酸的长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是非编码 RNA 的主要组成部分^[5],分布于特定的亚细胞结构中,具有时间和组织表达特异性,提示 lncRNA 在控制器官发育和维持生理功能中可能发挥重要作用^[3]。以下对 lncRNA 的分子机制及其在心脏发育和心血管疾病中的作用作一综述。

基金项目:国家自然科学基金项目(81200192 和 81270179)资助

作者单位:310009 浙江杭州,浙江大学医学院附属第二医院麻醉手术部(于硕),心血管内科(马宏、项美香)

通信作者:项美香,电子邮箱为 xiangmxhz@163.com

1 lncRNA 的生物学特征和分类

lncRNA 广泛分布于基因组中,其基因结构和转录机制与信使 RNA(messenger RNA, mRNA)类似^[3]。lncRNA 主要由 RNA 聚合酶 II 转录合成,具有 RNA 聚合酶 II 相关的染色质标志、5' 端帽子和 3' 端多聚腺苷酸尾结构,并可产生多种剪接形式^[6]。与蛋白编码基因不同, lncRNA 不具备开放阅读框,其密码子具有随机性,无法编码蛋白质^[6-7]。由于 lncRNA 具有 RNA 聚合酶 II 产物的一般特征,由此推测其极有可能存在多种内源性调节分子,促进 lncRNA 的生物合成、降解和维持其稳定性^[8-9],但具体机制尚待进一步深入研究。

根据上述生物学特征,结合 RNA-Seq 测序和 Tiling Array 芯片技术可以定位和发现大量的 lncRNA^[10]。目前在小鼠和人类中已分别发现超过 3 万个 lncRNA^[11-12],根据他们与蛋白编码基因的相对位置关系^[11,13],上述已知 lncRNA 可分为 5 种:① 正义型,与蛋白编码基因的外显子有部分重叠;② 反义型,与蛋白编码基因的外显子呈部分互补;③ 内含子型,位于蛋白编码基因的内含子中;④ 双向型,与蛋白编码基因紧密相邻,但转录方向相反;⑤ 基因间型,与邻近蛋白编码基因的距离在 5 kb 以上^[10]。

2 lncRNA 的生物学功能

lncRNA 能够与 DNA 或多种 RNA[mRNA、微小 RNA(microRNA)等]形成核酸复合体,具备与蛋白质结合并调节其活性的能力,故 lncRNA 可能在基因网络的多个调控层次发挥作用。目前已发现, lncRNA 在基因的表观遗传调控、转录、转录后调节和蛋白代谢中均发挥重要作用。

lncRNA 可通过募集染色质修饰蛋白调控基因表达。Paul 和 Duerksen 在 1975 年就发现染色质中含有大量 RNA,其数量甚至为 DNA 的 2 倍,提示 RNA 可能影响染色质结构^[14],但直到近年

才发现 lncRNA 可能是这一关键的调节性 RNA。哺乳动物中 X 染色体的剂量补偿是维持雌雄两性生物基因表型一致的重要遗传效应,但是机体如何使雌性动物其中 1 条 X 染色体的遗传性状失活,其分子机制尚不完全清楚。由 X 染色体转录出的 X 染色体失活特异转录本(X-inactive specific transcript, Xist)能够募集多梳抑制复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2),从而抑制 X 染色体上的基因转录^[15]。类似的,同源异形盒基因转录反义 RNA(Hox transcript antisense RNA, HOTAIR)、冷辅助内含子非编码 RNA (cold assisted intronic noncoding RNA, COLDAIR)等能通过募集 PRC2 抑制靶基因表达^[13],这些 lncRNA 与 PRC2 间的结合机制仍有待进一步研究。此外,lncRNA 还可通过募集其他染色质修饰蛋白调控基因表达,如胰岛素样生长因子受体 2 反义 RNA(antisense of IGF2R RNA, AIR)和电压门控钾通道 KCNQ1 基因重叠转录本 1 (KCNQ1 overlapping transcript 1, Kcnqlot1)经募集甲基化酶 G9a 抑制相邻基因表达,包装 RNA (packaging RNA, pRNA)可以募集 DNA 甲基转移酶 DNMT3b 抑制核糖体 RNA 基因表达,类固醇受体激活物(steroid receptor RNA activator, SRA)则通过募集转录阻抑蛋白 CTCF(又称 11-锌指蛋白或 CCCTC-结合因子)抑制蛋白编码基因胰岛素样生长因子 2(insulin-like growth factor 2, IGF2)的表达^[16]。

lncRNA 能够经碱基互补与 DNA 或其他 RNA 结合,通过修饰启动子结构、改变剪切位点、掩盖 microRNA 结合位点等方式在转录和转录后水平发挥调节作用^[17]。例如,胚腹前脑-2 (embryonic ventral forebrain-2, Evf2)可以作为转录因子 Dlx-2 的共激活因子,在小鼠神经发育中发挥作用。转录自磷酸酯酶与张力蛋白同源物假基因 1(phosphatase and tensin homolog pseudogene 1, PTENP1)的非编码 RNA 具有与磷酸酯酶与张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homolog, PTEN)转录本类似的 3'端非转录区序列,能够竞争性结合 microRNA,从而在转录后水平上调 PTEN 的表达,抑制肿瘤细胞增殖^[18]。lncRNA 也能够转录后水平下调基因表达。生长停滞特异性转录子 5(growth arrest-specific 5, Gas5)具有与糖皮质激素受体 DNA 结合域类似的

二级结构,因此可以竞争性与靶基因结合,从而抑制糖皮质激素受体靶基因的表达,改变细胞的代谢状态^[19]。

lncRNA 还可以直接影响蛋白质的功能。活化 T 细胞核内因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)在免疫反应和肿瘤发生、发展中发挥重要作用,NFAT 主要经钙调蛋白磷酸酶 Calcineurin 活化,通过核易位与特定 DNA 区域结合,上调靶基因。NFAT 的非编码抑制子(ncRNA repressor of the nuclear factor of activated T cells, NRON)通过与入核因子 Importin β 结合干扰 NFAT 的核易位,从而下调 NFAT 的活性^[20]。

3 lncRNA 的分子机制

目前关于 lncRNA 分子机制的研究有限,已知的 lncRNA 分子机制有 4 种类型^[13,21]:① 信号型,lncRNA 的转录状态可作为一种分子信号,用来反映其所在基因组区域对内外环境刺激的响应情况,如 Kcnqlot1、Air、Xist 等;② 诱饵型,lncRNA 作为分子诱饵,捕获各种具有调控功能的蛋白质(如转录因子、染色质修饰蛋白等),从而阻碍这些蛋白质因子与 DNA 靶序列结合而发挥生物学功能,如 NEAT2、PANDA、TERRA、Gas5 等;③ 支架型,lncRNA 可发挥衔接分子的作用,辅助多个蛋白形成功能性复合体,如 ANRIL 等;④ 引导型,lncRNA 参与形成核酸-蛋白复合体,引导复合体定位至靶序列,是 lncRNA 反式调控的分子基础,如 HOTAIR、lincRNA-p21。

4 lncRNA 与心脏发育

lncRNA 在心脏发育和心血管疾病领域的研究还处于起步阶段,已有一些研究提示,lncRNA 可能在其中发挥至关重要的作用,为进一步揭示心脏发育的调控机制和寻找新的心血管疾病治疗方法带来启示。

lncRNA 是胚胎干细胞基因调控网络的重要调节元件,在干细胞自我更新、维持多能性和定向分化中发挥关键作用^[22]。2011 年 Guttman 等^[23]在小鼠胚胎干细胞中成功干扰了 147 个 lncRNA 的表达,发现其中 26 个 lncRNA 能够调节 Nanog、Oct4 等多能干细胞标志物的表达,影响细胞增殖,对维持干细胞多能状态至关重要,进一步

研究还发现特定的 lncRNA 能引导干细胞定向分化至不同胚层。2013 年 Klattenhoff 等^[24] 通过 RNA-Seq 发现了 1 个新的基因间 lncRNA Braveheart(AK143260)。Braveheart 具有种属特异性,仅在小鼠中表达,干扰其表达水平并不影响胚胎干细胞的多能状态,但能够显著抑制干细胞向心脏分化,由 Braveheart 缺失造成的心脏分化障碍能被高表达心脏发育中胚层相关蛋白 1 (mesoderm posterior 1, MesP1)所逆转。2013 年 Grote 等^[25] 发现,小鼠侧中胚层特异性表达的 Fendrr (FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA)通过抑制染色质修饰蛋白复合体 PRC2 和 TrxG/MLL 的活性,上调 Tbx5、Nkx2.5 等基因的表达,促进心室壁的发育。上述研究结果表明,lncRNA 在由中胚层向心脏前体干细胞分化中发挥重要作用。

lncRNA 在促进心肌细胞成熟和维持收缩功能中发挥重要作用。心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I,cTN I)是成熟心肌细胞的标志之一,其通过改变肌球蛋白/肌动蛋白结合状态在心肌收缩中发挥重要作用。Podlowski 等^[26] 发现,大鼠和人体中存在种属特异性的反义型 lncRNA,可与 cTNI mRNA 形成 RNA 复合体,抑制 cTNI

表达,可能参与由心脏前体细胞向成熟心肌细胞分化的过程。肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)亚型与心肌收缩力和能量代谢效率相关。在心脏发育中,胚胎期以收缩频率慢但能量利用率较高的 β -MHC 为主,出生后收缩能力更强的 α -MHC逐步占据主导地位。Haddad 等^[27] 发现大鼠中存在 β -MHC 的反义型 lncRNA,该 lncRNA 通过抑制 β -MHC 启动子功能而下调 β -MHC 表达,同时还能启动并促进 α -MHC 转录,从而可能参与促进心肌成熟的生理过程。由于 MHC 亚型转化在压力超负荷导致的心肌肥厚、甲状腺功能减低性心肌病、糖尿病心肌病等疾病中也发挥重要作用,因此该 lncRNA 可能同时在心脏发育和心脏病理改变中发挥调节作用。此外,SRA 具有蛋白和 lncRNA 两种存在形式,其 lncRNA 形式在心脏、骨骼肌中呈组织特异性高表达,能够通过辅助激活成肌分化因子 (myogenic differentiation, MyoD) 促进骨骼肌分化,Friedrichs 等^[28] 发现,在斑马鱼中抑制 SRA lncRNA 表达能够导致心肌细胞收缩功能障碍,但其分子生物学机制尚不清楚。已明确或部分明确机制的与心脏发育和心血管疾病相关的 lncRNA 及其生物学功能见表 1。

表 1 与心脏发育和心血管疾病相关的 lncRNA 及其生物学功能

lncRNA	分类	功能	疾病相关
SRA lncRNA	正义型	核受体辅助激活分子,激活 MyoD 促进骨骼肌分化	与扩张型心肌病相关
反义 cTN I	反义型	抑制 cTN I 表达	暂无
反义 β -MHC	反义型	抑制 β -MHC 启动子而下调 β -MHC 表达	暂无
ANRIL	反义型	暂无	与冠状动脉性心脏病易感性相关
CHRF(AK048451)	内含子型	募集并抑制 miR-489,上调 Myd88,促进心肌肥厚	暂无
Braveheart (AK143260)	基因间型	上调 Mesp1,促进心肌细胞分化	暂无
Fendrr	基因间型	抑制染色质修饰蛋白复合体 PRC2 和 TrxG/MLL 的活性, 上调 Tbx5、Nkx2.5 等基因的表达,促进心室壁的发育	暂无
Kcnq1ot1	基因间型	调节钾通道 α 亚基由 Kcnq1 基因表达	暂无
LIPCAR	基因间型	暂无	与心脏重构和心血管死亡风险相关
MIAT	基因间型	可能影响蛋白编码	与心肌梗死易感性相关

miR: microRNA

5 lncRNA 与心血管疾病

心脏相关转录因子的突变和功能失调是心血管疾病的重要发病机制,由于 lncRNA 与心脏基因调控网络密切相关,因此 lncRNA 极有可能参与心血管疾病的发生和发展。已有研究结果显示,lncRNA 与心血管疾病相关的单核苷酸基因多态性(SNP)相关。全基因组关联性分析(GWAS)发现,人类基因多态性位点很大一部分位于基因

组的非编码区域,为 lncRNA 参与疾病的发生、发展提供了理论假说的基础。细胞周期激酶抑制因子 4b 位点的反义非编码 RNA (antisense non-coding RNA in the INK4 locus,ANRIL)是位于 9p21 染色体区域的反义型 lncRNA,这一染色体区域中有 8 个与冠状动脉性心脏病相关的 SNP 位于 ANRIL 的 3'端^[29],其中 rs10757278 纯合子罹患心肌梗死的风险是野生型的 1.64 倍^[30],并且 ANRIL 的表达水平和剪切亚型与冠状动脉性心

脏病和动脉粥样硬化程度密切相关^[30-31],表明 ANRIL 可能成为评估冠状动脉性心脏病及其并发症风险的临床指标,但是其具体的分子机制尚不清楚。心肌梗死相关转录本 (myocardial infarction associated transcript, MIAT) 中已发现 6 个 SNP,其中 A11741G 与心肌梗死易感性密切相关^[32]。在视网膜细胞分化研究中发现,MIAT 可能通过与内部核糖体进入位点 IRES 结合,通过影响蛋白编码发挥作用,但其在心肌梗死中的分子机制仍有待进一步研究。

lncRNA 可能与多种心脏疾病直接相关。扩张型心肌病是以心肌功能受限、心室显著扩张为特点的心脏疾病,遗传因素在其中发挥重要作用。Friedrichs 等^[28]发现,SRA lncRNA 基因所在的 5q31.2-3 区域存在基因连锁不平衡现象,并在扩张型心肌病家系研究中得到证实,而当利用干扰核酸 morpholino 下调 SRA lncRNA 表达时可引起斑马鱼心脏收缩功能障碍,提示 SRA lncRNA 可能在扩张型心肌病的病理机制中发挥重要作用。心肌肥厚既是发生心脏损伤后的适应性改变,也是猝死等重大心血管事件的独立危险因素。2014 年李培峰课题组^[33]在 小鼠心肌肥厚模型中发现一个心肌肥厚相关 lncRNA AK048451(心肌肥厚相关因子,cardiac hypertrophy related factor, CHRF),CHRF 通过募集并抑制 miR-489,上调 miR-489 靶基因 Myd88 的表达,从而促进心肌肥厚的发展。钾通道参与心肌细胞静息电位和动作电位复极形成,在维持心脏正常功能中发挥重要作用。钾通道 α 亚基由 Kcnq1 基因编码,Korostowski 等^[34]在 小鼠中发现了能够抑制 Kcnq1 基因表达的 lncRNA Kcnq1ot1,推测 Kcnq1ot1 可能参与某些离子通道相关心脏疾病。

尽管 lncRNA 在心血管疾病中的作用机制尚未阐明,但在多种体液中均检测出 lncRNA,使其成为新一代生物标志物的热门候选^[35]。2014 年 Kumarswamy 等^[36]在 788 例心力衰竭患者中发现血清中线粒体长链非编码 RNA uc022bqs.1 (long intergenic noncoding RNA predicting cardiac remodeling, LIPCARN) 水平与心脏重构和心血管死亡风险相关,且独立于性别、年龄、糖尿病、射血分数和峰氧耗量等因素之外。未来选择不同疾病人群进行血清 lncRNA 的芯片筛选或者深度测序可能发现更多的候选标志物,从而为临床评估提供更多帮助。

6 总 结

新一代测序技术的大规模应用在不同物种内均发现大量 lncRNA,目前仅有小部分阐明了其生理功能,随着越来越多实验证据出现,lncRNA 在生物发育、细胞生理和分子代谢领域中的重要作用将被逐步揭示。同时,lncRNA 也为更深入研究和理解心脏的病理生理机制开启了全新的视角。由于 lncRNA 数量巨大,几乎在所有基因网络调控层次均能发挥作用,故今后的研究重点和难点将是建立筛选心脏 lncRNA 更加高效的研究体系,结合 TALEN、CRISPR 等新一代基因编辑工具寻找心脏 lncRNA 的靶分子,并通过高通量研究手段明确潜在的分子机制。随着心脏 lncRNA 研究的不断深入,心脏发育和心血管疾病基因调控网络的逐步完善,将会出现更有效且个体化的靶向性治疗措施,推动临床医学的发展。

参 考 文 献

- [1] DAVIDSON E H, ERWIN D H. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans[J]. Science, 2006, 311(5762): 796-800.
- [2] BRUNEAU B G. The developmental genetics of congenital heart disease[J]. Nature, 2008, 451(7181): 943-948.
- [3] ULITSKY I, BARTEL D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. Cell, 2013, 154(1): 26-46.
- [4] BATISTA P J, CHANG H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1307.
- [5] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-874.
- [6] CABILI M N, TRAPNELL C, GOFF L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses[J]. Genes Dev, 2011, 25(18): 1915-1927.
- [7] ULITSKY I, SHKUMETA VA A, JAN C H, et al. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution[J]. Cell, 2011, 147(7): 1537-1550.
- [8] LEUCCI E, PATELLA F, WAAGE J, et al. MicroRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus[J/OL]. Sci Rep, 2013, 3: 2535[2013-08-23]. <http://www.nature.com/srep/2013/130829/srep02535/full/srep02535.html/>
- [9] GEISLER S, LOJEK L, KHALIL A M, et al. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes[J]. Mol Cell, 2012, 45(3): 279-291.
- [10] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, et al. Chromatin

- signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J]. *Nature*, 2009, 458(7235): 223-227.
- [11] DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression [J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-1789.
- [12] VOLDERS P J, HELSENS K, WANG X, et al. LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D246-D251.
- [13] RINN J L, CHANG H Y. Genome regulation by long noncoding RNAs[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 145-166.
- [14] BERNSTEIN E, ALLIS C D. RNA meets chromatin[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(14): 1635-1655.
- [15] WUTZ A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(8): 542-553.
- [16] MERCER T R, MATTICK J S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(3): 300-307.
- [17] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159.
- [18] POLISENO L, SALMENA L, ZHANG J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology[J]. *Nature*, 2010, 465(7301): 1033-1038.
- [19] KINO T, HURT D E, ICHIO T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor[J/OL]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): ra8 [2010-02-02]. <http://stke.sciencemag.org/content/3/107/ra8.long/>
- [20] WILLINGHAM A T, ORTH A P, BATALOV S, et al. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1570-1573.
- [21] WANG K C, CHANG H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [22] PAULI A, RINN J L, SCHIER A F. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(2): 136-149.
- [23] GUTTMAN M, DONAGHEY J, CAREY B W, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 295-300.
- [24] KLATTENHOFF C A, SCHEUERMANN J C, SURFACE L E, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment[J]. *Cell*, 2013, 152(3): 570-583.
- [25] GROTE P, WITTLER L, HENDRIX D, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse[J]. *Dev Cell*, 2013, 24(2): 206-214.
- [26] PODLOWSKI S, BRAMLAGE P, BAUMANN G, et al. Cardiac troponin I sense-antisense RNA duplexes in the myocardium[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85(1): 198-207.
- [27] HADDAD F, BODELL P W, QIN A X, et al. Role of antisense RNA in coordinating cardiac myosin heavy chain gene switching[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37132-37138.
- [28] FRIEDRICHS F, ZUGCK C, RAUCH G J, et al. HBEGF, SRA1, and IK: Three cosegregating genes as determinants of cardiomyopathy[J]. *Genome Res*, 2009, 19(3): 395-403.
- [29] BOCHENEK G, HÄSLER R, EL MOKHTARI N E, et al. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(22): 4516-4527.
- [30] FOLKERSEN L, KYRIAKOU T, GOEL A, et al. Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7677 [2009-11-02]. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007677/>
- [31] HOLDT L M, BEUTNER F, SCHOLZ M, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3): 620-627/
- [32] ISHII N, OZAKI K, SATO H, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(12): 1087-1099.
- [33] WANG K, LIU F, ZHOU L Y, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489[J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1377-1388.
- [34] KOROSTOWSKI L, SEDLAK N, ENGEL N. The Kcnqlot1 long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of Kcnq1, but does not regulate its imprinting in the developing heart[J/OL]. *PLoS Genet*, 2012, 8(9): e1002956 [2012-09-20]. <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1002956/>
- [35] VAN ROOSBROECK K, POLLET J, CALIN G A. miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2013, 13(2): 183-204.
- [36] KUMARSWAMY R, BAUTERS C, VOLKMANN I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure[J]. *Circ Res*, 2014, 114(10): 1569-1575.

(收稿日期:2014-03-22)

(本文编辑:唐清蓉)

• 综述 •

狼疮性肾炎的小管间质缺氧和功能 磁共振成像评价的意义

李 晓 陈 楠

系统性红斑狼疮(SLE)是一种好发于年轻女性的自身免疫性疾病,其患病率高达 70/10 万^[1]。SLE 可累及人体多系统而威胁生命,肾脏受累是其常见的临床表现,肾衰竭是 SLE 患者最主要的死亡原因。出现肾脏损伤临床表现者占 SLE 患者的 35%~90%,若结合免疫病理学检查,此比例可高达 80%~100%。因此,狼疮性肾炎(LN)是中国最常见的继发性肾小球肾炎之一。

1 LN 的小管间质病变直接影响其进展速度和预后

LN 主要表现为蛋白尿、血尿,严重者可发生肾病综合征,半数患者发生肾功能减退,偶有发生急性肾衰竭。参考 2003 年国际肾脏病协会和肾脏病理组织(ISN/RPS)LN 分型标准,LN 首次经肾活组织检查出的病理类型可帮助判断其预后。在病程中,LN 的病理类型可发生转变,混合类型亦很常见。60%~70%的 LN 患者可发生不同程度的间质炎性反应、小管损伤和间质纤维化,间质病变的程度通常与肾小球损伤程度相关^[2]。其中,活动度高的Ⅲ型和Ⅳ型 LN 患者往往存在较明显的小管间质病变。

肾间质炎性细胞浸润、纤维化和肾小管萎缩的严重程度直接影响 LN 的进展速度和预后。其可能的机制:慢性肾病时肾小球和肾小管周围微小血管受损而减少,以致肾脏血流动力学发生障碍,肾脏血供明显减少,肾小管内皮细胞损伤,炎性细胞浸润和肾间质纤维化。肾小管受损和细胞外基质的增加进一步加重微循环障碍,并造成周围肾小管损伤。如果受损的微小血管或肾小管是

未发生病变的肾小球的流出道,那么,通过反馈将引起该肾小球损伤,从而导致病变的进展,并最终致肾脏功能丧失^[3-5]。因此,ISN/RPS 的 LN 分型标准强烈建议单独描述肾小管间质病变的范围、程度、类型,以及严重性分级(轻、中、重)。

2 肾缺血、缺氧在 LN 小管间质损伤中作用

近年来,组织缺血、缺氧在急性肾损伤(AKI)的发生、发展和慢性肾脏病(CKD)持续进展中的病理生理作用逐渐被认识。缺氧可导致肾小管上皮细胞代谢异常、生化紊乱、结构和功能损伤,诱发炎症反应,产生活性氧(ROS)等,从而引起或加重肾脏病理变化。已有证据表明,肾小管间质的慢性缺氧性损伤可能是各种 CKD 进展至终末期肾病(ESRD)的共同途径^[5-6]。

在 LN 的肾小管间质病变发生过程中,免疫复合物在肾小管基底膜沉积和 T 淋巴细胞介导的免疫损伤,均可能导致内皮细胞活化、组织缺血和缺氧,肾内 ROS 大量产生,在 ROS、P-选择素和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)作用下中性粒细胞聚集黏附,进而加重肾小管间质的损伤^[7]。目前认为,ROS 主要来源于线粒体氧化呼吸链和 NADPH 氧化酶。细胞黏附分子 P-选择素主要表达于活化的血小板/内皮细胞表面,是在炎症反应早期介导中性粒细胞于血管内皮滚动和初始黏附的关键成分,有利于炎症反应部位中性粒细胞募集。LN 患者血浆和肾组织中的 P-选择素表达显著上调,P-选择素及其介导的树突状细胞在 LN 肾间质浸润聚集,可能参与启动 LN 肾小管间质早期的炎性免疫反应和组织病理损伤^[8-9]。

3 目前缺乏理想的检查方法评价 LN 的肾小管间质缺氧状态

判断 LN 肾组织的损伤主要依赖于肾活组织

基金项目:国家自然科学基金(81170671)、“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI10B06)资助

作者单位:200025 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院肾脏科

通信作者:陈楠,电子邮箱为 chen-nan@medmail.com.cn

检查,而且 LN 存在转型的可能,常需要重复进行肾活组织检查。虽然通过肾活组织检查可以得到直接的病理形态学信息,但其属于有创检查,SLE 患者往往因存在出凝血功能异常导致进行肾活组织检查的风险极大,部分患者甚至因肾脏萎缩而不具备肾活组织检查的条件,因此肾活组织检查并不适用于对 LN 治疗效果的随访。此外,肾活组织检查仅可获得以肾皮质为主的病变信息,而对于呈局灶分布的病变和肾间质分布最广泛的肾髓质病变均较难提供准确的形态学和功能学信息。

临床上常用的检查肾脏形态学的超声检查方法简便且无创,近年出现的新型超声微泡造影技术使其在肾功能检查方面的价值得以初步实现,但超声检查结果的准确性容易受到检查者技术水平、患者体重过轻或过重的影响;CT 和静脉尿路造影(IVU)能同时提供肾功能和肾形态学信息,但两者均需应用具有肾毒性的对比剂,这对于严重肾衰竭的患者来说是禁忌,且亦具有一定的放射性。采用生化检测方法测定血浆肌酐水平和肌酐清除率较简单,且无放射线损伤,但对肾功能的早期变化不敏感,且不能对单侧肾功能进行评价。近年来常采用基于内源性肌酐的公式法如 Cockcroft-Gault 公式和肾脏病膳食改良试验(MDRD)公式评估肾小球滤过功能,但由于受到肌酐测定方法的影响,且患者体重过轻或过重,以及年龄等因素均可导致结果产生偏差,故不适用于所有人群。肾小球滤过率核素显像是直接反映肾脏滤过功能,以及确诊 CKD 分期的主要依据,是被公认的检测肾小球滤过率的金标准,能很好地评价肾功能,但其空间分辨率较低,所提供的形态学信息有限,此外,放射性污染、价格、设备等因素也在很大程度上限制了其临床应用范围^[10]。因此,目前尚无理想的检查方法可同时评估 LN 患者的肾脏形态和功能,更缺乏对肾小管间质缺氧状态的评价手段,使临床上难以动态监测这些患者的病变进展。

4 扩散加权成像(DWI)和血氧水平依赖法(BOLD)磁共振(MR)功能成像可全面评价 LN 的肾脏形态和功能

MR 功能成像作为评价肾功能的一种无创性检查技术,具有较高的组织分辨率和空间分辨率,

既能准确显示肾脏的形态学改变,又能提供肾功能信息,是当今影像学功能检查的一种重要方法。

肾脏 MR 功能成像方法主要包括磁共振灌注成像(PWI)、DWI、BOLD 等^[11-13]。PWI 曾为部分学者所关注,但由于其信号强度和对对比剂浓度值之间的关系较复杂,且有研究^[14]报道严重肾功能不全患者使用含钆对比剂有发生肾源性系统纤维化的风险,因而无需对比剂的 DWI、BOLD 等逐渐成为 MRI 研究的重点。

4.1 DWI DWI 是唯一能在活体组织内通过测量水分子扩散情况分析病变内部结构和组织成分,从而反映活体组织功能状态的功能成像方法。在腹部脏器中,肾脏位于腹膜后受呼吸影响相对小,其血供丰富,组织含水量高,有尿液的稀释和浓缩功能,是 MR 功能检查最理想的器官之一。CKD 虽然病因各不相同,但都具有相同的基本病理生理变化,即肾血供减少、肾小球硬化、肾小管萎缩和肾间质纤维化,以致肾组织内水分子扩散状态发生异常改变,这些变化为肾脏 DWI 奠定了基础^[15-17]。DWI 测量的表观扩散系数(ADC)与肾组织中水分子的扩散能力和微循环灌注有关。当肾组织发生炎性反应、坏死、水肿和纤维化等不同性质的病变时,均会影响水分子的扩散和组织血流灌注情况。通过多 b 值 DWI 技术所测定的 ADC(仅与水分子扩散能力有关)和灌注分数(与微灌注有关),可在一定程度上反映肾脏病变的性质和肾脏滤过功能^[18]。Xu 等^[19]发现,DWI 可评价早期肾损伤,且对 CKD 分期具有诊断价值,肾 ADC 值可较好地反映单侧肾脏的肾功能情况;肾 DWI 与肾小管间质病变,特别是肾小管萎缩关系较密切,可为临床预后评估和疗效评价提供一种新的无创性检查方法。

4.2 BOLD BOLD 成像依赖的是血液氧合水平的变化。脱氧血红蛋白为顺磁性物质,而氧合血红蛋白为反磁性物质,所以血液的磁性随血红蛋白的氧合和去氧合的过程而发生改变。血中脱氧血红蛋白增加将引起周围局部组织磁场的不均匀性,导致血液中质子相位一致性丧失,T2* 加权梯度回波像上信号降低。通过计算一系列不同回波时间 T2* 图像信号强度对数的斜率可获得表观自旋-自旋弛豫率(R2*),即 $R2^* = 1/T2^*$ 。而 R2* 与组织内脱氧血红蛋白的含量成比例,R2* 升高提示脱氧血红蛋白增加(含氧血红蛋白减少)和氧

分压(p_aO_2)下降^[20]。肾脏作为人体高灌注器官,正常情况下肾皮质氧分压(约 50 mmHg,1 mmHg=0.133 kPa)明显高于肾髓质(10~20 mmHg)。由于 BOLD 对氧分压较低情况下的变化最为敏感,因而非常适合评价肾髓质的氧合状态。最多见的是用于高血压、急性肾缺血、急性输尿管梗阻、糖尿病和肾移植患者肾氧合水平的变化^[21-24]。本课题组在前期研究^[25]中发现,LN 患者进行肾 BOLD 检查显示其皮、髓质 $R2^*$ 值均显著低于正常肾脏,且肾髓质 $R2^*$ 值与尿蛋白、血肌酐、病理活动指数等均呈负相关。其原因可能是活动性 LN 的肾小球细胞明显增生甚至新月体形成、间质大量炎细胞浸润,上皮和内皮下有大量免疫复合物沉积,炎性反应因子和免疫损伤可导致肾小球和肾小管周围微小血管受损,肾内因血流动力学障碍而发生缺氧,故肾脏 $R2^*$ 值降低。

4.3 MRI-动脉自旋标记成像技术(ASL) 据报道^[26],MRI-ASL 采用内源性标志物,无需对比剂,利用肾动脉或腹主动脉血液中被标记的水分子进入肾实质,与组织内质子进行交换缩短组织弛豫时间,肾实质信号下降,被标记的血液不断进入肾脏使肾实质成为稳态弛豫状态,无创性观察肾脏的组织血供情况,通过测量肾皮、髓质的此种信号变化来观察肾灌注情况。以往 ASL 主要用于脑组织灌注方面的研究^[27],近年来已被逐渐应用于肾脏病变的研究^[28-29]。DWI 可反映肾组织病理变化,而 BOLD-MRI 对肾脏血氧水平的变化非常敏感。以上三者结合可对 LN 的肾脏形态、功能改变和血流灌注情况进行全面的无创性评价。

5 小结与展望

肾脏 MR 功能成像技术是目前国内外的研究热点,其具有无创、无辐射、可重复性等特点,可全面分析肾脏形态、血流灌注和肾小球滤过改变的过程,有着广阔的科研和临床应用前景。初步研究结果表明,DWI 和 BOLD 成像可反映 LN 病变尤其是肾小管间质病变、肾脏缺血和缺氧、髓质氧合水平的变化,为动态监测 LN 肾损伤和肾组织病理改变提供了一种无创性的新方法,可能为临床干预的疗效评价提供依据。由于 MR 功能检查缺乏技术的标准化,后处理方法亦存在一些技术问题,其检测数据的稳定性和可重复性还有待提高,故将其应用于 LN 的肾小管间质缺氧和功能

性评价,尚需进行进一步的多中心、大样本的研究验证。

参 考 文 献

- [1] BORCHERS A T, NAGUWA S M, SHOENFELD Y, et al. The geoeidemiology of systemic lupus erythematosus [J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(5): 277-287.
- [2] ALEXOPOULOS E, SERON D, HARTLEY R B, et al. Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function[J]. *Kidney Int*, 1990, 37(1): 100-109.
- [3] EDDY A A. Progression in chronic kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12(4): 353-365.
- [4] NORMAN J T, FINE L G. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(10): 989-996.
- [5] NANGAKU M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(1): 17-25.
- [6] FINE L G, NORMAN J T. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(7): 867-872.
- [7] MILLAR T M, PHAN V, TIBBLES L A. ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment [J] *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(8): 1165-1177.
- [8] 周 同,李 晓,郝翠兰,等. 粘附分子 P 选择素在狼疮性肾炎中的作用[J]. *上海第二医科大学学报*, 1998, 18(6): 441-443.
- [9] 李 晓,周 同,孙桂芝,等. 树突状细胞在狼疮性肾炎肾组织中的分布及其临床意义[J]. *现代免疫学*, 2004, 24 (2): 142-145.
- [10] DURAND E. Comparison of magnetic resonance imaging with radionuclide methods of evaluating the kidney [J]. *Semin Nucl Med*, 2014, 44(2): 82-92.
- [11] HERGET-ROSENTHAL S. Imaging techniques in the management of chronic kidney disease: current developments and future perspectives[J]. *Semin Nephrol*, 2011, 31(3): 283-290.
- [12] NOTOHAMIPRODJO M, REISER M F, SOURBRON S P. Diffusion and perfusion of the kidney[J]. *Eur J Radiol*, 2010, 76(3): 337-347.
- [13] CHANDARANA H, LEE V S. Renal functional MRI: Are we ready for clinical application? [J]. *Am J Roentgenol*, 2009, 192(6): 1550-1557.
- [14] MARCKMANN P, SKOV L, ROSSEN K, et al. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(9): 2359-2362.
- [15] THOENY H C, DE KEYZER F, OYEN R H, et al. Diffusion-weighted MR imaging of kidneys in healthy

volunteers and patients with parenchymal diseases: initial experience[J]. Radiology, 2005, 235(3): 911-917.

[16] TOGAO O, DOI S, KURO-O M, et al. Assessment of renal fibrosis with diffusion-weighted MR imaging: study with murine model of unilateral ureteral obstruction[J]. Radiology, 2010, 255(3): 772-780.

[17] THOENY H C, GRENIER N. Science to practice: Can diffusion-weighted MR imaging findings be used as biomarkers to monitor the progression of renal fibrosis? [J]. Radiology, 2010, 255(3): 667-668.

[18] COVA M, SQUILLACI E, STACUL F, et al. Diffusion-weighted MRI in the evaluation of renal lesions: preliminary results[J]. Br J Radiol, 2004, 77(922): 851-857.

[19] XU X, FANG W, LING H, et al. Diffusion-weighted MR imaging of kidneys in patients with chronic kidney disease: initial study[J]. Eur Radiol, 2010, 20(4): 978-983.

[20] PRASAD P V, EPSTEIN F H. Changes in renal medullary pO₂ during water diuresis as evaluated by blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging: effects of aging and cyclooxygenase inhibition[J]. Kidney Int, 1999, 55(1): 294-298.

[21] LI L P, HALTER S, PRASAD P V. Blood oxygen level-dependent MR imaging of the kidneys[J]. Magn Reson Imaging Clin N Am, 2008, 16(4): 613-625.

[22] 刘 艳, 徐学勤, 李 晓. 肾脏血氧水平依赖磁共振成像的研究进展[J]. 诊断学理论与实践, 2014, 13(2): 216-219.

[23] DJAMALI A, SADOWSKI E A, SAMANIEGO-PICOTA M, et al. Noninvasive assessment of early kidney allograft dysfunction by blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging[J]. Transplantation, 2006, 82(5): 621-628.

[24] ALFORD S K, SADOWSKI E A, UNAL O, et al. Detection of acute renal ischemia in swine using blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging[J]. J Magn Reson Imaging, 2005, 22(3): 347-353.

[25] 李 晓, 徐学勤, 张 文, 等. 磁共振功能成像方法评价狼疮肾炎的肾损害[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(11): 853-856.

[26] RITT M, JANKA R, SCHNEIDER M P, et al. Measurement of kidney perfusion by magnetic resonance imaging: comparison of MRI with arterial spin labeling to para-aminohippuric acid plasma clearance in male subjects with metabolic syndrome[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4): 1126-1133.

[27] GOLAY X, HENDRIKSE J, LIM T C. Perfusion imaging using arterial spin labeling[J]. Top Magn Reson Imaging, 2004, 15(1): 10-27.

[28] KIEFER C, SCHROTH G, GRALLA J, et al. A feasibility study on model-based evaluation of kidney perfusion measured by means of FAIR prepared true-FISP arterial spin labeling (ASL) on a 3-T MR scanner[J]. Acad Radiol, 2009, 16(1): 79-87.

[29] BOSS A, MARTIROSIAN P, GRAF H, et al. High resolution MR perfusion imaging of the kidneys at 3 Tesla without administration of contrast media[J]. Rofo, 2005, 177(12): 1625-1630.

(收稿日期: 2014-10-28)
(本文编辑: 许海燕)

• 书讯 •

《心脏起搏器新功能解析》出版

本书由复旦大学附属中山医院心内科宿燕岗、葛均波主编。以全球主要心脏起搏器生产公司近年来上市的心脏起搏器为基础,对心脏起搏器近年来出现的新功能进行详细解析。这些新功能主要指现代脉冲发生器除常规感知和起搏功能以外的其他新功能。本书将起搏器分为以下三大类介绍其新功能:治疗缓慢心律失常的脉冲发生器、治疗快速心律失常的脉冲发生器(ICD)和治疗心力衰竭的脉冲发生器(双室同步起搏器,CRT)。在解析过程中使用大量的图片,清晰易懂。

全国各大新华书店、医药书店、当当网(www. dangdang. com. cn)、卓越亚马逊网(www. amazon. cn)、易文网(www. ewen. cc)均有销售。定价 78 元。如需邮购,请联系上海科学技术出版社邮购组(上海钦州南路 71 号);邮政编码: 200235; 电话: 021-64089888-80102。

• 综述 •

干细胞移植治疗帕金森病的细胞类型及其选择

曹 膺 靳令经

帕金森病(PD)是一种常见于中老年人的神经退行性疾病,其主要临床表现为静止性震颤、运动迟缓、肌肉强直和姿势步态异常等。其主要病理特征为黑质多巴胺(DA)能神经元变性缺失和路易小体形成,从而导致脑内重要神经递质——DA的减少并表现为运动障碍^[1]。由于PD的确切病因和发病机制至今仍未阐明,尚无治愈方法,临床上主要以对症治疗为主,包括药物治疗、脑深部电刺激(DBS)疗法等。长期的药物治疗较易引起症状波动,以及异动症等并发症发生,尚不能阻止疾病的发展,无法使已损伤的神经元再生^[2]。近年来,由于对干细胞的广泛研究,PD的细胞移植治疗成为热点,为PD的彻底治愈提供了希望。

干细胞是一类具有自我更新能力并可分化为至少一代种子细胞的原始祖细胞而具有向DA能神经元分化潜能的细胞类型,主要包括胚胎干细胞(ESC)、成人或胚胎神经干细胞(NSC)、诱导多能干细胞(iPSC)、间充质干细胞(MSC)等,其已成为细胞治疗PD中常用的种子细胞^[3]。现就近年来用于细胞移植治疗PD研究的干细胞类型作一综述,并对其治疗PD的优缺点进行比较。

1 ESC

1981年,英国Evans等^[4]从鼠囊胚中分离出ESC,首次建立小鼠ESC系。1998年,Thomson等^[5]又在体外受精5d的人囊胚中成功分离出人ESC(hESC),首次建立hESC系。ESC的生物学特性:ESC具有无限的增殖能力,且hESC系的建立可为ESC用于PD的实验室研究和临床应用提供可靠的细胞来源;ESC具有分化的多潜能性,在特定条件下可分化为3个胚层来源的各种细胞,包括定向诱导分化为DA能神经细胞;此外,ESC

还易于进行基因改造,为提高移植成功率、移植后存活率和定向分化转化率提供了可能^[6-7]。因此,ESC是细胞移植最理想的种子细胞,将其应用于PD的干细胞移植治疗具有非常广阔的前景。

为尽量避免移植ESC在脑内过度增生而形成致命畸胎瘤,一般采用体外诱导产生DA神经细胞或神经前体细胞,再移植入脑内的方法,目前主要有两大类:基因外诱导和基因修饰诱导^[8]。2005年,Kim等^[9]采用基因修饰诱导与基因外诱导相结合的方法,将携带Nurr1基因的ESC和PA6基质细胞共培养,再加入音猬因子(sonic hedgehog, SHH)、成纤维细胞生长因子8(FGF8)辅助诱导,明显提高了DA能神经元的诱导率(可高达90%),且其可表达中脑DA能神经元的表面标志物,分泌DA,并具有DA能神经元特有的电生理特性。一项近期的实验^[10]证明,除了Nurr1基因,Lmx1a也与ESC的转化有关,诱导Lmx1a在小鼠中过表达也能够提高ESC的转化率。虽然ESC移植治疗PD的研究发展迅猛、前景广阔,但目前仍存在一些缺陷和未解决的问题:①关于诱导ESC转化为DA能神经元,虽然方法众多,但其机制还不清楚,尚无公认的最佳诱导方案。因此,要稳定获得大量的特定分化细胞还很困难。②ESC移植后可能产生致死性畸胎瘤^[11]。③ESC的免疫原性很低,但移植仍为异体细胞来源,故存在免疫排斥反应^[12]。④ESC移植治疗还存在一定的伦理问题^[13]。以上这些问题都极大地限制了ESC在移植治疗PD中的临床应用。

2 NSC

1992年Reynolds等^[14]首次从成年小鼠脑纹状体中分离出NSC,打破了神经组织不能再生的观念。NSC为一类具有自我更新能力,并能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等的干细胞,其存在于胚胎中脑组织和成人海马齿状回下分子层和前脑的室管膜下区等^[15]。近20年来,NSC也被广泛应用于

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(1508219048)

作者单位:200065 上海,同济大学附属同济医院神经内科

通信作者:靳令经,电子邮箱为 lingjingin@hotmail.com

细胞移植治疗 PD 的实验室研究^[12]。

有研究^[16]结果表明,将获得的 NSC 进行体外培养并诱导转化使其能够产生 DA 能神经元,再将其移植入 PD 大鼠脑后,可改善 PD 大鼠的部分运动功能。2009 年朱庆丰^[17]将体外培养的能表达绿色荧光蛋白(EGFP)的 NSC 分别定向移植入 PD 大鼠的黑质和纹状体内,结果发现,与对照组比较,植入 NSC 的黑质和纹状体两组大鼠的诱导旋转行为均得到明显改善;通过检测 EGFP,研究者们发现,在移植后 1、2、4 个月在注射部位均能够检测到 NSC,表明 NSC 能够在注射部位长期存活。Carvey 等^[18]报道,NSC 在包含有 IL-1、IL-11 和胶质源性神经营养因子(GDNF)等分化介质中可形成酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞,转化率为 20%~25%。

与 ESC 相比,NSC 最大的优点是其基因组较 ESC 稳定,且在稳定复制到一定阶段后开始衰老,因此其产生畸胎瘤的概率明显降低。然而,NSC 分化为 DA 能神经元的转化率不高,并且不同来源的 NSC 对症状的改善可能产生不同效果。研究^[19]发现,中脑来源的 NSC 能使动物的旋转行为得到改善,而皮质来源的 NSC 则无此作用。此外,如何正确引导 NSC 到达靶目标以产生正确的细胞类型、细胞数量和比例,以及在正确的位置与正确的靶组织建立正确的联系而无错误连接,仍是有待解决的问题^[19-20]。总之,NSC 用于移植治疗 PD 具有一定的优势,但是其缺点也不容忽视,并且目前尚处于基础研究阶段,距离临床应用尚有较远距离。

3 iPSC

2006 年 Takahashi 等^[21]首先利用反转录病毒载体导入 4 种基因 Oct3/4、Sox2、C-Mye 和 Klf4,将小鼠成纤维细胞重新编程逆转为一类类似 ESC 的多功能干细胞,即 iPSC,因此其具有与 ESC 极其相似的高度增殖和多向分化潜能。随后有多项研究^[22-25]证明,从各个胚层来源的胚胎、新生儿、成人体细胞(如上皮细胞、肝细胞、胃细胞、成熟 B 淋巴细胞、胰岛 B 细胞等)均可成功地诱导出 iPSC。

自 Takahashi 等^[26]发现小鼠 iPSC 可分化为 DA 能神经元后,更多关于 iPSC 移植治疗 PD 的研究被报道。Wernig 等^[27]将大鼠 iPSC 在体外培养成 DA 神经前体细胞后移植入 PD 大鼠纹状体内,结果发现,iPSC 来源的神经元与受体大鼠原有的神经元形成突触,且 PD 大鼠的症状得以明显改

善。值得关注的是,在 iPSC 诱导方法方面有较大突破:以往应用病毒载体进行转染,对于被转染的细胞而言,病毒基因插入的不可控制性可能导致原癌基因的激活;目前还有很多采用其他方法诱导成功的案例陆续被报道,包括表达质粒、化学因子、“自体裂开”多肽、“piggyback”转座、cite 重组酶可切割病毒、游离基因载体、细胞渗透性重组蛋白等。Vierbuchen 等^[28]利用细胞株转变技术在体外通过诱导小鼠胚胎或新生小鼠成纤维细胞联合表达 3 种神经特异性基因(Ascii、Brn2 和 Mytl1)也成功得到 DA 能神经元。

不仅如此,Park 等^[29]最先从 1 例 57 岁男性 PD 患者的表皮成纤维细胞中成功诱导出 PD 特异性 iPSC,之后 Soldner 等^[30]发现由 PD 特异性、非 PD 特异性和 hESC 分化成为 DA 能神经元的效率的差异无统计学意义。疾病特异性人 iPSC 不仅可用于病因学、毒理学研究和药物筛选,也使将患者自体成熟分化的体细胞诱导成为可供研究和临床治疗的 iPSC 成为可能。

iPSC 与 ESC 类似,其无限增殖和多向分化潜能远远超过其他已知的成体干细胞,且取材方便,来源广泛,其可以是患者特异性或疾病特异性来源,具有无免疫排斥反应和伦理问题等优点;可进行自体移植。因此,iPSC 用于 PD 的细胞移植治疗具有很广阔的应用前景。iPSC 也具有形成肿瘤的风险,不同诱导方案间其转化效率、致癌风险的差异亦未明确。综上所述,iPSC 具有很高的研究和应用价值,今后的研究重点为如何提高 iPSC 转化率,以及选择更严密、有效的分化和筛选技术,以降低肿瘤形成的风险。

4 骨髓 MSC(BMSC)

BMSC 为一种来源于骨髓,并能够分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞等的成体干细胞类型,该类细胞经过诱导也可转化为神经细胞和心肌细胞,因此 MSC 被认为可能应用于临床治疗 PD 等退行性病变,并引起广泛的关注和研究兴趣。

有研究者利用反转录病毒载体将 DA 合成的关键酶——TH 和三磷酸鸟苷(GTP)环化水解酶(GCH-1)的基因成功地转入小鼠的 BMSC,并移植到 PD 鼠的纹状体内,结果发现其产生的 L-dopa 和 DA 明显高于空白对照组,且阿朴吗啡诱导的旋转行为明显减少。此外,将携带胶质细胞源性

神经营养因子(GDNF)基因的 MSC 移植给 PD 小鼠时,发现其脑内 TH 阳性细胞的转化率提高,并且小鼠的动物学行为也有明显改善^[31]。

与其他细胞相比, MSC 用于 PD 的临床治疗有以下优势:① 极大程度克服了免疫排斥的发生,由于 MSC 具有内在的组织相容性,可以自体移植,来源也相对更经济、方便;② MSC 自体移植无伦理问题;③ MSC 是基因治疗中非常有价值的运载细胞,方便进行基因修饰诱导。因此,将 MSC 应用于细胞移植治疗 PD 值得期待。

然而,与 NSC 类似, MSC 应用于临床尚存在诸多问题,如 MSC 分化为神经细胞的机制和如何提高其分化转化率。进一步研究 MSC 自动迁移的机制及其微环境,将有利于发现更好、更便捷的移植途径。已有研究结果证实, EGFP-MSC 经鼻无创通路治疗 PD 有效。也有一些关于 MSC 移植会导致肿瘤发生,被成纤维细胞污染的 MSC 移植治疗 PD 后导致已有的神经元变性继续恶化并加重运动障碍等负面报道。因此,需要进行更多的研究以阐明 MSC 用于移植治疗 PD 的安全性和有效性。

5 其他干细胞

脐带血是靠近新生儿一侧胎盘和脐带内的血液,经研究发现脐血中不仅含有丰富的造血干细胞,同骨髓一样,其还含有丰富的 MSC,即脐带血来源的 MSC(UBMSC)。2006 年 Weiss 等^[32]将 UBMSC 分别移植入未经免疫抑制的 PD 大鼠和正常大鼠脑内,结果发现, PD 组大鼠用阿朴吗啡诱导的旋转行为得到明显改善,正常组大鼠未出现脑部肿瘤,无不良旋转行为,亦无免疫排斥反应发生。因此,可见 UBMSC 是一种来源丰富、不具争议性,且取之不尽、用之不竭的可能用于细胞移植研究和治疗的细胞类型。

与其他细胞类型相比, UBMSC 用于细胞移植具有以下优点:① 来源广泛,采集方便,易保存和运输,且对供者几乎无伤害;② UBMSC 较 BMSC 更原始,增殖分化能力更强;③ 免疫原性低,免疫排斥反应的发生率较低;④ 微生物和肿瘤细胞污染的可能性较小;⑤ 社会、伦理等方面的争议不大;⑥ 收集的脐血不仅可用于异体移植,还可被低温冷冻/解冻,用于自体移植,治疗相关疾病。这些优点使 UBMSC 成为细胞移植治疗 PD 理想的种子细胞,有着广泛的临床应用前景。由于

UBMSC 移植治疗 PD 的研究起步晚,将其用于临床前需要花费更多的时间和精力进行如寻找完善的分离、培养和扩增 UBMSC 的方案;筛选其特异性的标记分子,建立鉴定 UBMSC 的统一标准;诱导 UBMSC 向多系分化的分子机制,提高其分化转化率等实验室研究。尽管目前 UBMSC 作为一种真正意义上的种子细胞还存在许多研究空白,但其应用前景仍令人期待。

此外,也有研究发现,羊膜上皮细胞、脂肪组织和皮肤来源的干细胞等也有可能转化为神经细胞,但关于其分化潜能、能否将其应用于 PD 的细胞治疗等方面仍处于较初级的阶段,有待更多的研究发现和证明。

6 总 结

ESC、NSC、iPSC、MSC 和 UBMSC 是目前细胞移植治疗 PD 常用或具有广阔应用前景的干细胞类型,各具优缺点。如 ESC 转化率较高,但其产生致死畸胎瘤的概率很大; NSC 取材不易,体外扩增、诱导为 DA 能神经元数量少(即转化率低)。 MSC 不存在上述问题,且用于自体移植,能够解决供体来源和免疫排斥问题,但其安全性和有效性尚有待进一步研究。值得一提的是, iPSC、UBMSC、iPSC 有类似于 ESC 无限增殖和分化潜能的特质,但其无免疫排斥反应和伦理问题,且取材方便,甚至可以是患者来源,关于其可能产生肿瘤的问题,随着更严密、有效的分化和筛选技术的发展可得以改善。因此,目前虽然对于 UBMSC 在细胞移植治疗 PD 的研究成果有限,但是其无可比拟的优势不容忽视。

参 考 文 献

- [1] 冯 涛. 解读中国帕金森病治疗指南[J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(11): 986-988.
- [2] OKUN M S. Deep-brain stimulation for Parkinson's disease [J]. N Engl J Med, 2012, 367(16): 1529-1538.
- [3] DYSON S C, BARKER R A. Cell-based therapies for Parkinson's disease[J]. Expert Rev Neurother, 2011, 11(6): 831-844.
- [4] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.
- [5] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.

- [6] BEN-DAVID U, KOPPER O, BENVENISTY N. Expanding the boundaries of embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 666-677.
- [7] CHO M S, LEE Y E, KIM J Y, et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(9): 3392-3397.
- [8] TOMASKOVIC-CROOK E, CROOK J M. Human embryonic stem cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(4): 440-448.
- [9] KIM T S, NAKAGAWA T, KITA T, et al. Neural connections between embryonic stem cell-derived neurons and vestibular hair cells *in vitro*[J]. *Brain Res*, 2005, 1057(1-2): 127-133.
- [10] FRILING S, ANDERSSON E, THOMPSON L H, et al. Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(18): 7613-7618.
- [11] KOOREMAN N G, WU J C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging[J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7 (Suppl 6): S753-S763.
- [12] PIQUET A L, VENKITESWARAN K, MARUPUDI N I, et al. The immunological challenges of cell transplantation for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 88(4): 320-331.
- [13] EMBORG M E, ZHANG Z, JOERS V, et al. Intracerebral transplantation of differentiated human embryonic stem cells to hemiparkinsonian monkeys[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(5): 831-838.
- [14] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [15] 田增民, 孙君昭. 神经干细胞应用研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(10): 734-737.
- [16] RIAZ S S, JAUNIAUX E, STERN G M, et al. The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons *in vitro*[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 136(1): 27-34.
- [17] 朱庆丰. 帕金森病模型大鼠神经干细胞移植基础研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2010.
- [18] CARVEY P M, LING Z D, SORTWELL C E, et al. A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease[J]. *Exp Neurol*, 2001, 171(1): 98-108.
- [19] PARDAL R, LÓPEZ-BARNEO J. Neural stem cells and transplantation studies in Parkinson's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 741: 206-216.
- [20] SCHWARZ S C, WITTLINGER J, SCHOBER R, et al. Transplantation of human neural precursor cells in the 6-OHDA lesioned rats: effect of immunosuppression with cyclosporine A[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2006, 12(5): 302-308.
- [21] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [22] VAN BEKKUM D W, MIKKERS H M. Prospects and challenges of induced pluripotent stem cells as a source of hematopoietic stem cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1266: 179-188.
- [23] LEE G, STUDER L. Induced pluripotent stem cell technology for the study of human disease [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(1): 25-27.
- [24] STADTFELD M, NAGAYA M, UTIKAL J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration [J]. *Science*, 2008, 322(5903): 945-949.
- [25] OKITA K, NAKAGAWA M, HYENJONG H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- [26] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [27] WERNIG M, ZHAO J P, PRUSZAK J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(15): 5856-5861.
- [28] VIERBUCHEN T, OSTERMEIER A, PANG Z P, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035-1041.
- [29] PARK I H, ARORA N, HUO H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886.
- [30] SOLDNER F, HOCKEMEYER D, BEARD C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors[J]. *Cell*, 2009, 136(5): 964-977.
- [31] GARCÍA-CASTRO J, TRIGUEROS C, MADRENAS J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6B): 2552-2565.
- [32] WEISS M L, MEDICETTY S, BLEDSOE A R, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 781-792.

(收稿日期: 2013-01-29)

(本文编辑: 许海燕)

• 综述 •

人 β 防御素-2 与呼吸系统感染

毛彦雄 徐金富 瞿介明

呼吸道与外界环境相通,经常遭到包括病原微生物在内的外源性物质的入侵^[1]。呼吸道上皮不仅是抵抗病原微生物的物理屏障,还能通过分泌抗菌多肽和蛋白来抑制并消灭入侵的病原微生物。防御素是呼吸道上皮分泌的一种重要抗菌多肽,是一个相对分子质量为 4 000~5 000 的阳离子抗微生物多肽家族,具有广谱抗微生物活性^[2]。按照其结构中 6 个半胱氨酸残基的排列关系和链内二硫键的连接位置,防御素主要被分为 α 防御素和 β 防御素。目前在人体已有 6 种 α 防御素,即髓源性防御素(HNP)1~4、肠源性防御素(HD)-5 和 HD-6; 11 种 β 防御素,即人 β 防御素(hBD)1~6 和 hBD25~29 已被发现^[3]。其中,hBD2 具有抗微生物作用和诱导趋化炎性细胞作用,在固有免疫中发挥重要作用。呼吸系统感染时,呼吸道上皮 hBD2 表达上调从而抑制感染。现就 hBD2 的发现、诱导表达、功能,及其与呼吸系统感染的关系作一综述。

1 hBD2 的发现

1997 年 Harder 等^[2]从银屑病患者的皮屑中分离出一种新型抗微生物多肽,该多肽含有 41 个氨基酸残基,相对分子质量约为 4 300,对其氨基酸序列分析的结果显示,该多肽拥有 β 防御素的共同氨基酸序列,并与牛气管 β 防御素、牛舌 β 防御素和 hBD1 具有同源性,故该多肽被命名为 hBD2。hBD2 可有效杀死革兰阴性菌,但对革兰阳性菌的杀灭作用较差。与当时已发现的唯一一种 hBD——hBD1 不同,hBD2 可在炎症反应和感染的诱导下表达。hBD2 的编码基因 DEFB4 位于人染色体 8p22-p23.1 区,与 hBD1 基因相邻。整个 DEFB4 约 6 000 bp,包括两个外显子(72 bp 和 226 bp)和一个内含子(4 495 bp)。

hBD2 广泛地表达于多种器官(包括肺、气管、包皮、口腔黏膜和唾液腺)的上皮细胞上^[4],其在肺部主要由支气管上皮细胞和黏液下腺的浆液细胞表达^[5]。目前的研究^[6]结果已表明,上皮细胞不是 hBD2 的唯一来源,单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B 细胞和血管内皮细胞均可分泌 hBD2。

2 hBD2 的诱导表达和调控

hBD2 的一个最主要的特点是可在炎症反应和感染的诱导下表达。大量细胞因子和微生物及其产物,包括革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、TNF- α 、IL-1 β 、脂多糖(LPS)、中性粒细胞弹性蛋白酶、细菌 DNA 和疫苗等,已被证实可诱导 hBD2 的表达。鼻病毒,主要是病毒的双链 DNA(dsDNA),可上调体外培养的支气管上皮细胞 hBD2 mRNA 的表达。在鼻病毒的基础上联合 IL-17A 可进一步诱导 hBD2 的表达。23 价肺炎球菌多肽疫苗、B 型流行性感胃嗜血杆菌疫苗和流行性感胃病毒裂解疫苗均可不同程度地诱导气道上皮 hBD2 表达。对同一种细菌而言,不同的表型对 hBD2 的诱导作用也不一致。黏液型铜绿假单胞菌可诱导呼吸道上皮表达 hBD2,但非黏液型铜绿假单胞菌则无此诱导作用^[7]。

现有证据表明,不同刺激诱导 hBD2 表达的机制不完全相同,但大多涉及 NF- κ B、人 Toll 样受体(TLR)2 和 TLR4 通路。NF- κ B 通路是对 hBD2 调控的研究中报道最多的通路。就基因结构来看,hBD2 编码基因 DEFB4 的启动子区包含数个 NF- κ B 结合位点,而 NF- κ B 参与 LPS 诱导的转录调节。Tomita 等^[8]对人气道上皮细胞株 LC2/ad 进行的研究结果表明,NF- κ B、激活蛋白(AP)-1 和细胞内钙是 hBD2 表达所必需的。LPS 刺激的单核吞噬细胞可分泌 TNF- α 和 IL-1 β ,通过 NF- κ B 通路调节肺上皮细胞 hBD2 的表达。IL-1 β 、IL-17、肺炎军团菌和肺炎链球菌诱导上皮细胞分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271894)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华东医院呼吸内科
(毛彦雄、瞿介明);同济大学附属上海市肺科医院呼吸科(徐金富)

泌 hBD2 均涉及到 NF- κ B 信号通路。人类免疫缺陷病毒 (HIV) Tat 蛋白可通过 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)-NF- κ B/AP-1 依赖性通路上调 B 细胞 hBD2 表达^[9]。hBD2 调控的另一个重要通路是 TLR, 主要是 TLR2 和 TLR4。Hertz 等^[10]的研究结果显示, 细菌 LPS 诱导气道上皮细胞分泌 hBD2 必须通过 TLR2 介导。此外, 单核细胞感染肺炎衣原体后 hBD2 上调, 革兰阳性菌细胞壁主要成分磷壁酸诱导人气道上皮细胞 hBD2 表达上调, 均通过 TLR2 介导。TLR4 在 LPS 诱导的呼吸道上皮细胞 hBD2 上调中也发挥重要作用, 若阻断 TLR4 受体, LPS 将无法上调 hBD2^[11]。

3 hBD2 的功能

hBD2 具有广谱的抗菌活性, 对革兰阴性菌的杀菌作用强, 对某些多药耐药性的菌株也有明显的杀菌作用^[4]。炎症反应诱导的 hBD2 表达高度局限, 只出现在感染区域^[5,12]。hBD2 的抗菌活性为盐敏感性, 高盐环境下其杀菌作用被减弱。hBD2 的抗菌活性受阳离子影响, 且二价阳离子对 hBD2 杀菌作用的减弱程度高于一价阳离子^[5]。hBD2 可明显抑制呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染, 其机制可能是阻止病毒进入细胞。hBD2 还可以抑制水痘-带状疱疹病毒在角质形成细胞的复制^[13]。目前 hBD 抗微生物作用的具体机制尚不清楚, 现在普遍的观点认为防御素可通过形成多聚体使细胞膜穿孔, 增加细胞膜的通透性从而杀灭细胞。由于防御素携带正电荷且具有双亲性, 其可直接与携带负电荷的脂质双分子层结合, 在细胞膜上形成多聚体使细胞膜穿孔, 造成细胞死亡^[3]。

病原体也能采用某些方式抑制 hBD2 的作用保护自身。比如, 肺炎克雷伯菌的荚膜多糖不仅可降低包括 hBD2 在内的防御素对细菌的杀灭能力, 还可抑制防御素的表达。某些表达糖肽脂的脓肿分支杆菌菌株感染肺上皮细胞后不会引起 hBD2 和 IL-8 的表达。这是因为糖肽脂掩盖了具有生物活性的细胞壁脂, 阻止细胞壁脂与 TLR2 作用引起的 hBD2 和 IL-8 的表达。铜绿假单胞菌分泌的鼠李糖脂可通过抑制钙调节通路和蛋白激酶 C 通路阻止细菌诱导的 hBD2 分泌。

hBD2 还对某些细胞具有趋化作用, 可在炎症反应局部表达的 hBD2 从远处招募细胞发挥抗炎、抗感染作用。hBD2 的趋化作用主要是通过

CC 趋化因子受体 (CCR) 6、CCR2 和特异性 hBD2 受体, 作用于树突细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞和肥大细胞。Yang 等^[14]的研究结果显示, hBD2 可通过 CCR6 对未成熟树突细胞和记忆 T 淋巴细胞产生趋化作用。表明, hBD2 可能通过 CCR6 招募树突细胞和 T 淋巴细胞到微生物入侵位置从而促进获得性免疫反应。在一定条件下, hBD2 也是中性粒细胞的趋化因子, 使用 TNF- α 处理中性粒细胞后, hBD2 可通过中性粒细胞上的 CCR6 对其产生趋化效应。表明, 在感染或炎症反应过程中, 上皮细胞来源的抗菌多肽与中性粒细胞间可能存在重要的联系。hBD2 也可通过与 CCR2 结合介导趋化作用, CCR2 在单核细胞、树突细胞和巨噬细胞亚群均有表达^[15]。hBD2 还可作为肥大细胞的一种直接特异性趋化因子, 其不仅可刺激肥大细胞释放组胺, 还可通过磷脂酶 C 依赖通路诱导肥大细胞趋化作用, 该趋化作用不依赖于 CCR6 或 CCR2, 而与肥大细胞表面特异的 hBD2 受体有关^[16]。

4 hBD2 与呼吸系统感染

呼吸系统感染时, 呼吸道上皮 hBD2 表达上调从而抑制感染。Hiratsuka 等^[17]主持的研究结果显示, 在细菌性肺炎患者的支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和血浆中均可检测到 hBD2, 且肺炎患者的血浆 hBD2 水平是健康者的 3.9 倍。hBD2 对肺炎患者的预后可能有预测价值, 一项新的研究^[18]结果表明, 低血浆 hBD2 水平是肺炎患者不良预后的独立预测因素。在黏液型铜绿假单胞菌引起的下呼吸道感染患者的支气管上皮衬液中均可检测到 hBD2, 而健康者的上皮衬液中则无^[19]。机体在受到呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染时, 在 RSV 和 TNF 诱导下肺上皮细胞可通过 NF- κ B 依赖性通路分泌 hBD2, 分泌的 hBD2 可明显抑制 RSV 感染, 其机制可能是阻止病毒进入细胞。以上均说明, 作为呼吸道上皮固有防御机制的一环, hBD2 在呼吸道感染时分泌增加, 对病原微生物产生抑制和杀灭作用。

目前也有一些证据表明 hBD2 涉及肺部结核感染的发病机制。Rivas-Santiago 等^[20]发现, 结核分支杆菌感染呼吸道上皮细胞后, 可诱导上皮细胞分泌 hBD2。hBD2 表达开始于感染后 6 h, 并可持续至感染后 48 h, 且在感染后 18~24 h 到达高峰。hBD2 在

感染晚期(感染后 48 h)的表达可能单独由结核分支杆菌感染造成,也可能是结核分支杆菌感染引起继发 IL-1 β 等分泌的结果。体外使用牛型结核杆菌卡介苗感染呼吸道上皮细胞后,感染细胞可通过分泌 TNF- α 上调 hBD2 表达,这一作用受到 NF- κ B、细胞内钙、p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、蛋白激酶 C(PKC)、JNK 和磷脂酸肌醇-3-激酶(PI3K)调控。不仅结核杆菌直接感染可诱导 hBD2 表达,结核呼吸系统感染造成的病理生理改变也可影响 hBD2 表达。低氧分压是人体组织中结核肉芽肿的特征性表现,可上调巨噬细胞 hBD2 表达,增强巨噬细胞对细胞内结核分支杆菌的杀灭作用^[21]。hBD2 分泌增加后可抑制结核分支杆菌的生长。在体外,hBD2 mRNA 可有效转染体外培养的原代巨噬细胞,从而抑制巨噬细胞内结核分支杆菌的生长。在第 1 个 24 h 内,hBD2 mRNA 可抑制结核分支杆菌的生长达 50%,且单次 hBD2 mRNA 转染可使抑制作用持续至少 7 d^[22]。

目前已报道的 hBD2 治疗作用方面的研究可分为以下几类:① 以 hBD2 作为模板开发新的抗生素;② 外源性 hBD2 联合抗生素使用,以降低败血症发生风险;③ 使用外源性刺激或基因工程技术增加机体本身 hBD2 的分泌,以增强机体的抗感染能力。

hBD2 具有广谱抗菌活性,对某些多药耐药菌也有抗菌活性,是新抗生素开发的理想模板。Jung 等^[23]采用基因工程技术对 hBD2 进行改造,扩大其抗菌范围,增强其抗菌能力。改造后的 hBD2/hBD3 嵌合多肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀灭能力较两种野生型多肽更强,且其抗菌能力不受高盐环境的影响。外源性 hBD2 可与抗生素联合使用治疗革兰阴性菌引起的重症感染,降低败血症发生风险。治疗革兰阴性菌重症感染的抗生素可促进内毒素释放,从而诱发危及生命的症状和并发症。在使用抗生素的基础上加用 hBD2,不仅可调节细胞因子和内毒素的作用,还可发挥直接抗菌作用。Donnarumma 等^[24]主持的研究结果显示,莫西沙星和 hBD2 联合使用可以抑制上皮细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和细胞间黏附分子-1(ICAM-1),干预细胞因子表达,降低败血症风险。

除使用外源性 hBD2 外,还可通过刺激或基因工程技术增加内源性 hBD2 的分泌,增强机体的抗感染能力。Guaní-Guerra 等^[25]成功地通过鼻腔滴

入细菌裂解液诱导鼻腔黏膜上皮表达 hBD2,证实通过刺激固有免疫系统产生 hBD2 可预防或治疗病原微生物引起的呼吸系统感染。另一种增加内源性 hBD2 的分泌方法是使用质粒、病毒等载体将 hBD2 基因导入体内,使机体长期表达 hBD2。Yin 等^[26]的研究结果显示,携带 hBD2 基因的慢病毒可有效感染原代纤维母细胞和人原代牙龈上皮细胞,但细胞感染后 hBD2 表达水平的差异有统计学意义,其中人原代牙龈上皮细胞的 hBD2 表达水平更高。IL-1 或 TNF- α 刺激感染后的人原代牙龈上皮细胞可进一步增加 hBD2 的表达。Huang 等^[27]使用携带 hBD2 互补 DNA(cDNA)的反转录病毒转染多种细胞株和原代培养细胞成功地使这些细胞分泌 hBD2,将这些 hBD2 注入体内后可有效抑制大肠杆菌的生长。在大鼠铜绿假单胞菌肺炎肺损伤模型和败血症引起的肺损伤模型中,经气道注入携带 hBD2 基因的腺病毒可有效减轻肺损伤程度^[28]。上述研究证实了通过基因工程技术增加内源性 hBD2 分泌的可行性,但至今为止尚无任何 hBD2 相关的临床试验的报道,故其在临床治疗中的有效性和安全性尚无法评估。

5 小 结

hBD2 是一种阳离子抗微生物多肽。hBD2 弥漫地表达于多种器官的上皮细胞,其在肺部主要由支气管上皮细胞和黏液下腺的浆液细胞表达。hBD2 可在炎症反应和感染的诱导下表达,其调节机制涉及 NF- κ B、TLR2 和 TLR4 通路。hBD2 具有抗微生物作用和诱导趋化炎症细胞作用,在固有免疫中发挥重要作用。呼吸系统感染时,呼吸道上皮 hBD2 表达上调从而抑制感染。hBD2 可作为开发新的抗生素的模板,可降低败血症发生风险,还可增强机体的抗感染能力。

参 考 文 献

- [1] 俞云松. 社区获得性呼吸道感染主要致病菌及其耐药性变化[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(8): 647-650.
- [2] HARDER J, SIEBERT R, ZHANG Y, et al. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23. 1 [J]. Genomics, 1997, 46 (3): 472-475.
- [3] CHEN H, XU Z, PENG L, et al. Recent advances in the research and development of human defensins[J]. Peptides, 2006, 27(4): 931-940.
- [4] HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, et al. A

- peptide antibiotic from human skin[J]. *Nature*, 1997, 387(6636): 861.
- [5] BALS R, WANG X, WU Z, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(5): 874-880.
- [6] KAWSAR H I, GHOSH S K, HIRSCH S A, et al. Expression of human beta-defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor beta[J]. *Peptides*, 2010, 31(2): 195-201.
- [7] HARDER J, MEYER-HOFFERT U, TERAN L M, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(6): 714-721.
- [8] TOMITA T, NAGASE T, OHGA E, et al. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad) [J]. *Respirology*, 2002, 7(4): 305-310.
- [9] JU S M, GOH A R, KWON D J, et al. Extracellular HIV-1 Tat induces human beta-defensin-2 production via NF-kappaB/AP-1 dependent pathways in human B cells[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(4): 335-341.
- [10] HERTZ C J, WU Q, PORTER E M, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2 [J]. *J Immunol*, 2003, 171(12): 6820-6826.
- [11] MACREDMOND R, GREENE C, TAGGART C C, et al. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide[J/OL]. *Respir Res*, 2005, 6: 116 [2005-10-12]. <http://respiratory-research.com/content/6/1/116/>
- [12] SINGH P K, JIA H P, WILES K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(25): 14961-14966.
- [13] CRACK L R, JONES L, MALAVIGE G N, et al. Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2012, 37(5): 534-543.
- [14] YANG D, CHERTOV O, BYKOVSKAIA S N, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6[J]. *Science*, 1999, 286(5439): 525-528.
- [15] RÖHRL J, YANG D, OPPENHEIM J J, et al. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2[J]. *J Immunol*, 2010, 184(12): 6688-6694.
- [16] NIYONSABA F, IWABUCHI K, MATSUDA H, et al. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway[J]. *Int Immunol*, 2002, 14(4): 421-426.
- [17] HIRATSUKA T, NAKAZATO M, DATE Y, et al. Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(3): 943-947.
- [18] LIU S, HE L R, WANG W, et al. Prognostic value of plasma human β -defensin 2 level on short-term clinical outcomes in patients with community-acquired pneumonia: a preliminary study[J]. *Respir Care*, 2013, 58(4): 655-661.
- [19] YANAGI S, ASHITANI J, IMAI K, et al. Significance of human beta-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(1): 63-69.
- [20] RIVAS-SANTIAGO B, SCHWANDER S K, SARABIA C, et al. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(8): 4505-4511.
- [21] NICKEL D, BUSCH M, MAYER D, et al. Hypoxia triggers the expression of human β defensin 2 and antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages[J]. *J Immunol*, 2012, 188(8): 4001-4007.
- [22] KISICH K O, HEIFETS L, HIGGINS M, et al. Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(4): 2692-2699.
- [23] JUNG S, MYSLIWY J, SPUDY B, et al. Human beta-defensin 2 and beta-defensin 3 chimeric peptides reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(3): 954-960.
- [24] DONNARUMMA G, PAOLETTI I, BUOMMINO E, et al. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin and human beta-defensin 2 association in human lung epithelial cell line (A549) stimulated with lipopolysaccharide [J]. *Peptides*, 2007, 28(12): 2286-2292.
- [25] GUANÍ-GUERRA E, NEGRETE-GARCÍA M C, MONTES-VIZUET R, et al. Human β -defensin-2 induction in nasal mucosa after administration of bacterial lysates[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(3): 189-194.
- [26] YIN C, DANG H N, ZHANG H B, et al. Capacity of human beta-defensin expression in gene-transduced and cytokine-induced cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(1): 344-354.
- [27] HUANG G T, ZHANG H B, KIM D, et al. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities *in vivo* [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(17): 2017-2025.
- [28] SHU Q, SHI Z, ZHAO Z, et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis-induced lung injury by overexpression of beta-defensin-2 in rats [J]. *Shock*, 2006, 26(4): 365-371.

(收稿日期:2013-12-12)

(本文编辑:许海燕)

人类婆罗双树样基因-4 在消化系统肿瘤中的研究进展

王新景 邓侠兴

消化系统肿瘤包括食管癌、胃癌、肠癌、肝癌、胆囊癌和胰腺癌,早期症状常不明显,就诊时往往已为中晚期,患者预后差、死亡率高。胰腺癌被称为“癌中之王”,尽管随着诊断技术和治疗手段不断提高,但胰腺癌患者的 5 年生存率仅为 5% 左右^[1]。近年来,随着研究的深入,不断有新的癌基因和抑癌基因被发现。癌基因通过突变、转位等机制激活后的表达产物可促进细胞发生病变。作为一个新发现的癌基因,人类婆罗双树样基因(SALL)4 位于人类 20 号染色体 q13^[2],其含有 4 个外显子,编码 SALL4A 和 SALL4B 两种异构体蛋白^[3]。SALL4A 包含全部外显子,由 1 053 个氨基酸组成,具有 8 个 ZF 基序,即 1 个氨基端 C2HC 型 ZF 基序和 7 个 C2H2 型 ZF 基序^[4-5]。SALL4B 缺少第 2 外显子羧基端 385-820 区域,由 617 个氨基酸组成,仅有 1 个氨基端 C2HC 型 ZF 基序和 2 个 C2H2 型 ZF 基序^[4-5]。SALL4A 和 SALL4B 的表达均呈组织特异性,前者在脑、胎盘、肺、肾、肌肉、卵巢和 CD34⁺ 细胞中表达;后者在多数组织中均有表达,但不表达于 CD34⁺ 细胞^[6]。

作为干细胞因子,通过与 Nanog 和 Oct4 之间的作用,SALL4 对维持胚胎干细胞的多向发育潜能和自我更新具有重要作用^[6-11]。在生殖细胞肿瘤中,SALL4 被证实是一个敏感性和特异性均较高的诊断新型标志物^[12-16];在造血系统中,SALL4 通过第 10 号染色体上缺失的与张力蛋白同源的磷酸酯酶(PTEN)、多梳基因家族重要的调节基因(Bmi-1)和 Wnt 等多条信号通路与白血病、淋巴瘤的发生和发展密切相关^[5,17-22]。近期,相继出现

消化道肿瘤中 SALL4 致癌发生、发展及其相关机制的报道,有望为肿瘤的诊断和治疗提供新的方法。以下就目前已了解的 SALL4 基因与消化道肿瘤的发生、发展及其可能的机制进行综述。

1 SALL4 在肝脏肿瘤中的作用

Oikawa 等^[23]首先在小鼠胚胎肝脏中发现有 SALL4 表达,随着小鼠发育,肝脏中的 SALL4 表达水平逐渐降低,至成年期则无 SALL4 表达。该研究结果显示,在胚胎肝干细胞(即肝母细胞)中过表达 SALL4,并观察到其诱导分化成熟肝细胞的能力受到明显的抑制,诱导分化胆管细胞的能力则通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI-3K)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路而明显增强。随后,Oikawa 等^[24]证实,人肝脏的肝干细胞和胆道干细胞中有 SALL4 表达,成熟的肝细胞和胆道细胞中无 SALL4 表达。

免疫组织化学检查发现,在 20 个肝癌组织样本中有 17 个 SALL4 表达阳性,通过 Lee 等^[25]公布的组织芯片数据库发现,SALL4 表达水平较高的肝癌患者的生存时间较短。Yong 等^[26]采用免疫组织化学方法检测多地区大样本(新加坡 171 例肝癌和相应的非瘤肝组织,香港 228 例肝癌和相应的非瘤肝组织)中 SALL4 表达的情况,结果显示,在非瘤肝组织中无 SALL4 表达,但却表达于一部分肝癌组织,且高表达 SALL4 组患者的预后相对较差,与其他研究^[24, 27]结果一致。基因表达谱分析显示,SALL4 阳性的肝癌中有大量与增殖和转移相关的基因高表达,可能与 SALL4 致不良预后有关。Gao 等^[28]以一种针对 SALL4 的小分子肽来处理癌细胞,结果显示,其能抑制细胞生长,并使 PTEN^[18](一种抑癌基因)表达水平升高;体内移植瘤试验也证实,该小分子肽在体内具有抑制肿瘤生长的作用。Oikawa 等^[24]在肝癌细胞

基金项目:上海市科学技术委员会生药重点项目资助(10411955600)

作者单位:200025 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科

通信作者:邓侠兴,电子邮箱为 kejiadx@hotmai.com

系中发现, SALL4 通过促进细胞周期蛋白 D1 和 D2 的表达来提高细胞的增殖能力, 且其可使间质转换基因如趋化因子受体 (CXCR4) 和上皮-间充质转变调控因子 (TWIST1) 的表达水平升高, 但对细胞侵袭和迁移能力无明显影响; 此外, 研究结果还表明 SALL4 可增强细胞抵抗 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的能力。Zeng 等^[27] 发现, 肝癌细胞中 SALL4 的表达上调, 肝干细胞标志分子如 KRT19、EPCAM 和 CD44 的表达也随之上调, 侵袭能力增加; 下调时则相反。此外, 该研究结果还表明, SALL4 表达与组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 的活性相关, HDAC 抑制剂能够抑制 SALL4 阳性细胞的生长, 与 Lu 等^[18] 的研究结果类似。

有研究^[12-16] 结果表明, SALL4 可作为原发性或继发性生殖细胞肿瘤的诊断标志物, 肝细胞肝癌与肝样卵黄囊瘤中 AFP 均为阳性表达, 两者难以区分, 卵黄囊瘤转移瘤与肝细胞癌亦难以鉴别^[29]。作为生殖细胞肿瘤, 卵黄囊瘤与一般的体细胞肿瘤不同, 只要诊断明确, 治疗效果和预后均较佳, 故两者的鉴别诊断显得十分重要。Gonzalez-Roibon 等^[30] 构建组织芯片, 采用免疫组织化学方法检测肝癌标本中 SALL4 的表达, 并与卵黄囊瘤进行比较; 结果表明, SALL4 表达水平可作为鉴别卵黄囊瘤与肝细胞肝癌的标准, 以 25% 表达率为界时诊断卵黄囊瘤的敏感度和特异度分别为 100% 和 92.8%, 阳性预测值和阴性预测值分别为 66.6% 和 100%。

Gnemmi 等^[31] 采用免疫组织化学方法对 12 例肝母细胞瘤组织样本进行检测, 结果显示, 阳性结果 7 例, 阳性区域均为胚胎性成分, 胎儿和间叶性成分均无 SALL4 阳性染色。另有研究者发现肝癌中 SALL4 为阴性表达。Ushiku 等^[32] 主持的研究结果显示, 60 例肝癌、6 例肝母细胞瘤中的 SALL4 均为阴性表达, 48 例胆管癌患者中有 2 例弱表达 SALL4。Ikeda 等^[33] 主持的研究结果显示, 20 例 AFP 阳性的胃癌中有 19 例表达 SALL4, 而 20 例肝细胞肝癌和胆管细胞癌中 SALL4 均为阴性表达。

2 SALL4 在胃癌中的表达

Sugai 等^[34] 的研究发现, 早期胃癌中, 黏膜下癌的 SALL4 启动子区域甲基化水平显著高于黏膜内癌, 表明 SALL4 甲基化可能增加黏膜内癌向

黏膜下层侵袭的能力。Ushiku 等^[32] 主持的研究结果显示, 孕龄 < 9 周的胎胃中有 SALL4 表达, 之后则几乎检测不到其表达; 在成人正常胃组织中无 SALL4 表达, 15% (51/338) 的胃癌组织有不同程度的阳性表达。结合临床病理学检查资料的分析结果表明, SALL4 阳性表达与患者的年龄 (老龄)、性别 (男性)、病理类型 (肠型胃癌) 和肿瘤分期 (T1、T2 期) 显著相关。此外, 分析结果显示, 3% (10/338) 的胃癌 AFP 表达阳性, 该部分患者 SALL4 均为阳性表达; 17% (56/338) 的患者表达磷脂酰肌醇蛋白多糖 3 (GPC3), 其中 39% (22/56) 的患者 SALL4 表达阳性; 表明胃癌中 SALL4 表达与 AFP、GPC3 的表达显著相关。为进一步明确 AFP 阳性胃癌中有 SALL4 表达, 该研究另选取 31 例 AFP 阳性的胃癌组织, 结果发现 SALL4 均为阳性表达, 且病理学检查证实为肝样胃癌的组织中 SALL4 的表达较腺体状胃癌明显。Ushiku 等^[32] 主持的研究中, 6 例肝母细胞瘤、60 例肝细胞肝癌中 SALL4 均为阴性表达, 而 AFP、GPC3 大部分为阳性表达; 结果表明, SALL4 可用来鉴别肝样胃癌与肝细胞肝癌。Ikeda 等^[33] 主持的研究亦得出了与之类似的结论。

Fujii 等^[35] 主持的研究结果表明, 胃癌肠上皮化生中尾端相关同源异形盒基因 1 (CDX1) 激活了 SALL4 的畸形表达, 激活的 SALL4 可促使胃黏膜细胞化生为肠型上皮, 从而与致癌相关。

有研究^[32-35] 结果表明, SALL4 在胃癌组织中相对高表达, 可进一步应用于肝样胃癌与肝细胞肝癌的鉴别, 并可能因其自身突变和与影响下游靶基因相互作用而促使胃癌发生和发展, 其具体机制尚待进一步。

3 SALL4 与结直肠癌的进展和转移

SALL4 具有干细胞因子的自我更新能力, 与肿瘤细胞类似。Forghanifard 等^[36] 通过实时定量 PCR 对 46 例结直肠癌组织及其相应的正常组织进行比较, 结果显示, 87% 的癌组织中 SALL4 表达水平高于正常组织 2 倍以上。该研究^[36] 对 SALL4 表达与结直肠癌临床病理学检查资料的关系进行分析, 9 例淋巴结转移患者的癌组织 SALL4 均呈高表达, 33 例无淋巴结转移者中有 5 例的 SALL4 为正常表达或低表达, 6 例正常或低表达患者中有 5 例无淋巴结转移; 结果表明,

SALL4 可能与结直肠癌的发生、发展和淋巴结转移密切相关。该研究选取的病例数较少,结果可能存在偏倚,故需要进一步大样本的研究来证实。

Habano 等^[37]主持的研究结果显示,结直肠癌的非整倍体癌组织中 SALL4 启动子区域的甲基化发生率显著高于整倍体癌组织,且在细胞系中去甲基化后能使 SALL4 表达增加;表明 SALL4 的表观沉默与肿瘤非整倍体的发生相关,SALL4 可能维持染色体的平衡。SALL4 在结直肠肿瘤中的研究尚缺乏,启动子区域的甲基化和癌组织中表达等需进一步深入挖掘,以期从另一层次解释结直肠肿瘤的发生和发展。

4 展 望

目前,SALL4 在肝癌、胃癌、结直肠癌等消化系统肿瘤中均表现为具有致癌作用,但其具体表达水平和作用机制仍有待进一步探讨。而 SALL4 在胰腺癌、胆囊癌、食管癌等肿瘤中的作用尚未见报道,根据其致癌相关机制,以及其在胃癌、肠癌、肝癌中的作用和进展,值得进一步深入探索。深入研究 SALL4 编码的蛋白质的功能、启动子区甲基化和突变等与各种肿瘤发生、发展的关系,将有助于阐明消化系统肿瘤的发病机制,有望为消化系统肿瘤的早期诊断和鉴别诊断提供一种新的方法,也将有可能为疾病的治疗提供新的契机,以期开发新的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.

[2] KOHLHASE J, SCHUBERT L, LIEBERS M, et al. Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy[J]. J Med Genet, 2003, 40(7): 473-478.

[3] KOHLHASE J, SCHUH R, DOWE G, et al. Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt [J]. Genomics, 1996, 38(3): 291-298.

[4] AL-BARADIE R, YAMADA K, ST HILAIRE C, et al. Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family[J]. Am J Hum Genet, 2002, 71(5): 1195-1199

[5] MA Y, CUI W, YANG J, et al. SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice[J]. Blood, 2006, 108(8): 2726-2735.

[6] SAKAKI-YUMOTO M, KOBAYASHI C, SATO A, et al. The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development [J]. Development, 2006, 133 (15): 3005-3013.

[7] ZHANG J, TAM W L, TONG G Q, et al. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(10): 1114-1123.

[8] WANG J, RAO S, CHU J, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells [J]. Nature, 2006, 444(7117): 364-368.

[9] WU Q, CHEN X, ZHANG J, et al. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24090-24094.

[10] ELLING U, KLASSEN C, EISENBERGER T, et al. Murine inner cell mass-derived lineages depend on Sall4 function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(44): 16319-16324.

[11] WARREN M, WANG W, SPIDEN S, et al. A Sall4 mutant mouse model useful for studying the role of Sall4 in early embryonic development and organogenesis [J]. Genesis, 2007, 45(1): 51-58.

[12] CAO D, HUMPHREY P A, ALLAN R W. SALL4 is a novel sensitive and specific marker for metastatic germ cell tumors, with particular utility in detection of metastatic yolk sac tumors[J]. Cancer, 2009, 115(12): 2640-2651.

[13] CAO D, GUO S, ALLAN R W, et al. SALL4 is a novel sensitive and specific marker of ovarian primitive germ cell tumors and is particularly useful in distinguishing yolk sac tumor from clear cell carcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(6): 894-904.

[14] CAO D, LI J, GUO C C, et al. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors [J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(7): 1065-1077.

[15] WANG F, LIU A, PENG Y, et al. Diagnostic utility of SALL4 in extragonadal yolk sac tumors: an immunohistochemical study of 59 cases with comparison to placental-like alkaline phosphatase, alpha-fetoprotein, and glypican-3[J]. Am J Surg Pathol, 2009, 33(10): 1529-1539.

[16] LIU A, CHENG L, DU J, et al. Diagnostic utility of novel stem cell markers SALL4, OCT4, NANOG, SOX2, UTF1, and TCL1 in primary mediastinal germ cell tumors[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(5): 697-706

[17] YANG J, CHAI L, GAO C, et al. SALL4 is a key

- regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells [J]. *Blood*, 2008, 112(3): 805-813.
- [18] LU J, JEONG H W, KONG N, et al. Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5577 [2009-05-18]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005577/>
- [19] YANG J, CHAI L, LIU F, et al. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(25): 10494-10499.
- [20] ZHANG J, GRINDLEY J C, YIN T, et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 518-522.
- [21] IWAMA A, OGURO H, NEGISHI M, et al. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1[J]. *Immunity*, 2004, 21(6): 843-851.
- [22] PARK I K, QIAN D, KIEL M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 302-305.
- [23] OIKAWA T, KAMIYA A, KAKINUMA S, et al. Sall4 regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1000-1011.
- [24] OIKAWA T, KAMIYA A, ZENIYA M, et al. Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1469-1483.
- [25] LEE J S, HEO J, LIBBRECHT L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12(4): 410-416.
- [26] YONG K J, GAO C, LIM J S, et al. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(24): 2266-2276.
- [27] ZENG S S, YAMASHITA T, KONDO M, et al. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(1): 127-134.
- [28] GAO C, DIMITROV T, YONG K J, et al. Targeting transcription factor SALL4 in acute myeloid leukemia by interrupting its interaction with an epigenetic complex[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1413-1421.
- [29] JAIN D, MITTAL S, GUPTA M. Hepatocellular carcinoma arising in a testicular teratoma: a distinct and unrecognized secondary somatic malignancy[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2013, 17(4): 367-371.
- [30] GONZALEZ-ROIBON N, KATZ B, CHAUX A, et al. Immunohistochemical expression of SALL4 in hepatocellular carcinoma, a potential pitfall in the differential diagnosis of yolk sac tumors[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(7): 1293-1299.
- [31] GNEMMI V, LETEURET E, SUDOUR-BONNANGE H, et al. SALL4 is a marker of the embryonal subtype of hepatoblastoma[J]. *Histopathology*, 2013, 63(3): 425-428.
- [32] USHIKU T, SHINOZAKI A, SHIBAHARA J, et al. SALL4 represents fetal gut differentiation of gastric cancer, and is diagnostically useful in distinguishing hepatoid gastric carcinoma from hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34(4): 533-540.
- [33] IKEDA H, SATO Y, YONEDA N, et al. α -Fetoprotein-producing gastric carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma show similar morphology but different histogenesis with respect to SALL4 expression[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(11): 1955-1963.
- [34] SUGAI T, HABANO W, ENDOH M, et al. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(11): 2500-2509.
- [35] FUJII Y, YOSHIHASHI K, SUZUKI H, et al. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(50): 20584-20589.
- [36] FORGHANIFARD M M, MOGHBELI M, RAEISOSSADATI R, et al. Role of SALL4 in the progression and metastasis of colorectal cancer[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 6 [2013-01-30]. <http://www.jbiomedsci.com/content/20/1/6/>
- [37] HABANO W, SUGAI T, JIAO Y F, et al. Novel approach for detecting global epigenetic alterations associated with tumor cell aneuploidy[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(7): 1487-1493.

(收稿日期:2013-10-28)

(本文编辑:陈蔚)

心电图以急性前间壁 ST 段抬高型心肌梗死为表现的急性心肌炎一例

禹子清 陆 浩 杨 茗 葛均波

1 临床资料 患者男,24 岁,因发热、胸闷、气促 8 d 于 2014 年 8 月 18 日入院。患者于 2014 年 8 月 10 日因劳累后出现咽痛、低热(腋温 37.5℃)、乏力、肌肉酸痛等表现,次日凌晨突然出现右侧胸闷伴大汗淋漓,无端坐呼吸等急性左心力衰竭表现。当地医院心电图和胸部 X 线片检查未见明显异常,诊断为呼吸道感染予抗感染治疗。8 月 14 日起患者胸闷加重,胸骨后有明显憋闷感,遂再次急诊行心电图检查示非阵发性交界性心动过速,QRS 电轴明显右偏,多个导联 T 波低平或浅倒置。测肌酸激酶同工酶(CK-MB)为 31 U/L。8 月 15 日超声心动图检查示左心室射血分数(LVEF)正常,少量心包积液。当地医院仍诊断为呼吸道感染,每日予患者静脉滴注抗生素治疗。8 月 17 日患者仍存在胸闷症状,并出现体力活动受限,爬 2 层楼即出现气促,需停下休息。测 CK-MB(mass)为 11.5 ng/mL,心肌肌钙蛋白 I(cTn I)为 3.67 ng/mL,脑钠肽(BNP)为 737 pg/mL。心电图检查示 V₁ 至 V₄ 导联的 ST 段呈弓背向上抬高伴 R 波递增不良(图 1)。考虑为急性冠状动脉综合征(ACS)待排,予口服阿司匹林、氯吡格雷、他汀类调脂药,以及皮下注射低分子肝素等治疗。8 月 18 日收入复旦大学附属中山医院心内科。入院后心电图检查结果与外院 8 月 17 日的心电图结果相仿。体格检查:第一心音减弱,二尖瓣区可闻及Ⅱ级收缩期杂音。8 月 18—22 日的心电图检查示 V₁ 至 V₄ 导联的 ST 段逐渐回落至基线水平并出现 T 波倒置(图 2)。8 月 18 日,测 cTn I 为 1.16 ng/mL,CK-MB 为 38 U/L,氨基末端脑钠素前体(NT-pro BNP)为 7 544 pg/mL。8 月 19 日,cTn I 为 2.15 ng/mL,CK-MB 为 21 U/L,NT-pro BNP 为 4 606 pg/mL,CRP 为 59.2 mg/L;检测肠道病毒 RNA+,柯萨奇 B 组病毒 IgM—、IgG+;超声心动图检查示:左心室多节段收缩活动减弱,少量心包积液,LVEF 为 0.45。住院期间随访心肌酶谱和 CRP 水平呈下降趋势。8 月 23 日,冠状动脉多排螺旋 CT 血管成像(CTA)检查示冠状动脉血管未见明显狭窄,未见明显钙化斑块和软斑块形成(图 3,见封三)。诊断为急性病毒性心肌炎,嘱患者卧床休息并予抑制心室重构和营养支持治疗后胸闷缓解,心肌酶谱逐渐下降,心电图 ST 段逐渐回落,病情稳定后于 2014 年 8 月 27 日出院。

1 个月后电话随访患者症状完全缓解,当地医院的心电图检查示无动态变化。

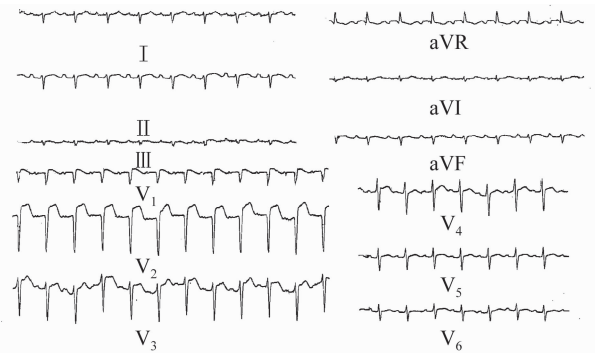
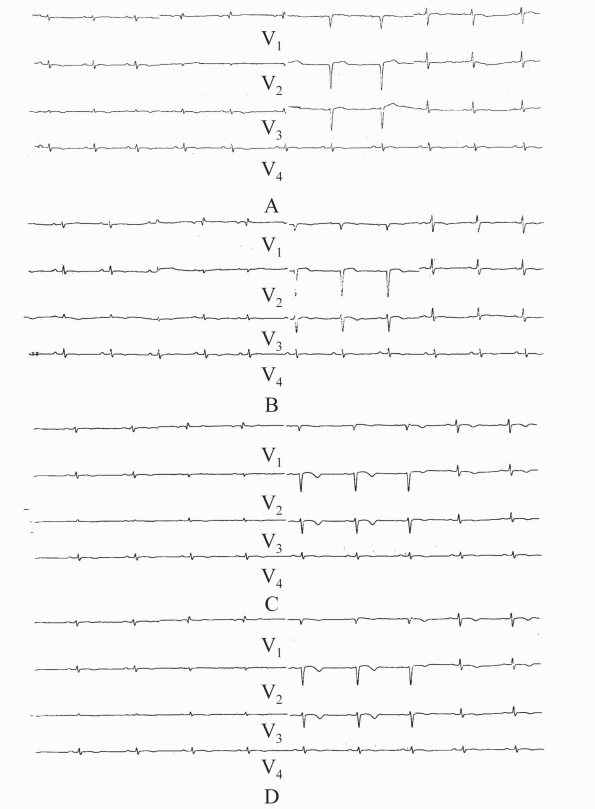


图 1 2014 年 8 月 17 日心动图检查示,肢体导联低电压, QRS 电轴极度右偏,Ⅱ、Ⅲ、aVF 导联 R 波振幅较前下降, V₁、V₂ 导联呈 QS 型,V₁ 至 V₅ 导联 ST 段弓背向上抬高



A:2014 年 8 月 19 日;B: 2014 年 8 月 20 日;C: 2014 年 8 月 21 日;D:2014 年 8 月 22 日

图 2 胸前导联 ST 段逐渐回落至基线

2 讨 论 根据 1999 年中国心肌炎心肌病专题研讨会

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院心内科,上海市心血管病研究所
通信作者:葛均波,电子邮箱为 jbge@zs-hospital.sh.cn

提出的成人急性病毒性心肌炎诊断参考标准^[1],病毒性心肌炎的诊断要点:前驱症状(3周以内发生的流行性感、腹泻等病毒感染症状),心功能异常的症状和体征(包括阿斯综合征、急性左心力衰竭等),心电图异常(包括房室传导阻滞、窦房传导阻滞、室性心动过速、多源或成对室性早搏、心室扑动、心室颤动、 ≥ 2 个导联的ST段水平或下斜型压低 <1 mm、ST段抬高),心肌损害的指标(包括血清学指标如cTn I、CK-MB,影像学指标如超声心动图或者放射性核素检查提示心腔扩大、室壁活动异常、LVEF明显降低),病原学依据(如直接心脏活组织病理学检查发现病原体、病毒血清抗体效价高且血标本中肠道病毒核酸阳性)等。

本患者急性起病,症状逐渐加重;心电图示,胸导联ST段明显弓背抬高,cTn I、CK-MB进行性升高,需与ACS鉴别。ACS患者有心电图动态演变过程,cTn I、CK-MB水平升高,室壁节段性舒缩功能障碍的影像学表现^[2-3]。心肌炎患者可因炎症反应负荷增加致CRP水平升高^[4],但ACS也存在炎症反应,ACS患者的CRP水平亦可明显升高^[5],有学者^[6]认为CRP可作为判断心肌梗死预后的指标。本患者在临床表现、心电图和心脏损伤标志物等方面与ACS鉴别诊断有困难,尤其心电图动态变化具有一定迷惑性。本患者的鉴别诊断要点为患者的心电图异常于胸闷、气促症状数日后才出现,且几乎无冠状动脉性心脏病的危险因素,冠状动脉CTA检查未见冠状动脉管腔狭窄,仅见左前降支远段可疑心肌桥。冠状动脉CTA检查无法判断冠状动脉管腔受心肌桥压迫的程度,除非极其严重的舒张期冠状动脉管腔受压迫,否则心肌桥不会引起心肌损伤性改变^[7]。此外,需与Tako-Tsubo心肌病相鉴别。该病多由应激事件诱发,特点为突发胸痛、左心力衰竭可逆、心电图ST-T段改变,但缺乏明确的冠状动脉病变依据且预后大多良好;根据急性期心尖部影像学表现如超声心动图、左心室造影检查予以诊断。本患者无明显诱因,超声心动图未见典型“章鱼套”样改变可排除该诊断。根据患者的临床表现、实验室检查和影像学资料可诊断为急性病毒性心肌炎。

假设本患者的CTA检查结果显示冠状动脉粥样硬化伴有管腔狭窄,则应进一步行冠状动脉造影检查;若为ACS则通过冠状动脉造影可发现罪犯血管并可行直接经皮冠状动脉介入治疗(PCI)或根据临床情况考虑择期PCI,若冠状动脉造影检查未见明确罪犯血管也不能完全排除急性心肌梗死(因为有可能发生心肌梗死后冠状动脉自行再通^[8])而轻易诊断急性心肌炎。对于急性心肌炎与ACS鉴别有困难的患者,根据动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)危险分层选择合适的冠状动脉检查手段可提高诊断正确性。心肌炎的诊断金标准是心肌活组织病理学检查,但因其为侵入性检查,操作难度大、并发症多、风险极高,且存在假阴性率,故临床鲜有采用此方法来诊断心肌炎。应用心脏MRI检查协助诊断心肌炎成为一种新的选择^[9],MRI具有无创性,且其T2加权像对于判断心肌有

无炎症反应水肿具有较高的敏感性和特异性^[10],对于不能通过临床表现和心电图变化鉴别急性心肌炎与ACS的患者,除了行冠状动脉CTA或者冠状动脉造影检查外,心脏MRI检查亦有助于明确诊断。在急性炎症反应的患者中,有明显的细胞水肿,但在炎症反应慢性期其水肿可不明显,提示MRI对于急性期后的心肌炎诊断效率可能不如急性期高。

参 考 文 献

- [1] 杨英珍.关于成人急性病毒性心肌炎诊断参考标准和采纳世界卫生组织及国际心脏病学会联合会工作组关于心肌病定义和分类的意见[J].中华心血管病杂志,1999,27(6):405-407.
- [2] 戴子翔,颜彦,李晨光,等. Takotsubo 心肌病两例及其与急性冠状动脉综合症的鉴别诊断[J].上海医学,2014,37(7):637-638.
- [3] CARASSO S, AGMON Y, ROGUIN A, et al. Left ventricular function and functional recovery early and late after myocardial infarction: a prospective pilot study comparing two-dimensional strain, conventional echocardiography, and radionuclide myocardial perfusion imaging[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2013, 26(11):1235-1244.
- [4] CIMINO S, CANALI E, PETRONILLI V, et al. Global and regional longitudinal strain assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography identifies early myocardial dysfunction and transmural extent of myocardial scar in patients with acute ST elevation myocardial infarction and relatively preserved LV function[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2013, 14(8):805-811.
- [5] THIELE J R, HABERSBERGER J, BRAIG D, et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein localizes and aggravates inflammation: *in vivo* proof of a powerful proinflammatory mechanism and a new anti-inflammatory strategy[J]. Circulation, 2014, 130(1):35-50.
- [6] 陈泳. C反应蛋白在心肌梗死中的检测价值[J].中国当代医药,2012,19(24):176,178.
- [7] RAPOSEIRAS-ROUBÍ N S, BARREIRO PARDAL C, Rodino Janeiro B, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a predictor of in-hospital cardiac events in acute myocardial infarction independently of GRACE risk score [J]. Angiology, 2012, 63(1):30-34.
- [8] 罗江宾,王天松,吕树铮,等.急性心肌梗死“罪犯血管”自发再通的介入治疗108例临床观察[J].心肺血管病杂志,2012,31(6):663-665,672.
- [9] 丁彬彬,张军平.心脏核磁共振成像对病毒性心肌炎诊断价值的系统评价[J].中国循证医学杂志,2011,11(3):273-277.
- [10] ZIMMERMANN O, BIENEK-ZIOLKOWSKI M, WOLF B, et al. Myocardial inflammation and non-ischaemic heart failure: is there a role for C-reactive protein? [J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104(5):591-599.

(收稿日期:2014-12-14)

(本文编辑:王小燕)

《上海医学》杂志稿约

《上海医学》杂志(*Shanghai Medical Journal*)是由上海市医学会主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。每月 25 日出版。主要报道医学各学科的科学研究成果和临床实践,并介绍国内、外医学的科研动态和新进展。读者对象主要为各科临床医师、医学科研人员和医学生。

一、本刊设有述评、专论、论著、短篇论著、病例报告、讲座、综述、会议(座谈)纪要、临床病理(病例)讨论、国内外学术动态、等栏目。欢迎来稿。

二、对来稿的要求

1. 文稿:应具有科学性、实用性,论点明确,资料可靠,文字精炼,层次清楚,数据准确,必要时应作统计学处理。

2. 文题:力求简明、醒目,反映文章的主题。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜。

3. 作者:作者姓名在文题下按序排列,顺序应在投稿时确定,在编排过程中不宜再作更动;作者单位名称(写到科室)及邮政编码脚注于同页左下方。作者应是:① 参与选题和设计,或参与资料的分析和解释者;② 起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者;③ 能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。仅参与获得课题经费或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理也不宜列为作者。并提供第一作者的联系方式,包括地址、电话、电子邮件地址和邮政编码等。

4. 摘要:论著须附中、英文摘要。中文摘要必须包括目的、方法、结果(应给出主要数据)、结论 4 个部分,各部分冠以相应的标题。英文摘要还应包括文题、所有作者姓名(汉语拼音)、单位名称(写到科室)、所在城市名及邮政编码。作者不属同一单位时,在第一作者姓名首字母左上角加“*”,同时在单位名称首字母左上角加“*”。例如:* LIN Xianyan, WU Jianping, QIN Jiong. * Department of Pediatrics, First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China. ① 目的(Objective):简要说明研究的目的,表明研究的范围和重要性。② 方法(Methods):简要说明研究课题的基本设计,使用的材料和方法,如何分组对照,研究范围及精确程度,数据是如何取得的,经何种统计学方法处理。③ 结果(Results):简要列出研究的主要结果和数据,并需给出结果的置信值、统计学显著性检验的确切值。④ 结论(Conclusions):简要叙述经验、论证取得的正确观点及其理论价值或应用价值,是否可推荐或推广等。

5. 关键词:论著需标引 3~8 个关键词。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版 Index Medicus 中医学主题词表(MeSH)内所列的词,标引的第 1 个关键词必须是主题词。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称,如“HBsAg”应标引为“乙型肝炎病毒表面抗原”。每个英文关键词第 1 个字母大写,多个关键词之间应用分号“;”分隔。

6. 医学名词:以 1989 年及以后由全国科学技术名词审定委员会审定、公布,并由科学出版社出版的《医学名词》和相关学科的名词为准,暂未公布者仍以人民卫生出版社 2000 年 7 月出版的《英汉医学词汇》(第 2 版)为准。中文药物名称应使用 2005 年版中华人民共和国药典(法定药物)或卫生部药典委员会编辑的《药名词汇》(非法定药物)中的名称,英文药物名称则采用国际非专利药名,不用商品名。

7. 图表:凡能用文字说明者,一般不用图和表。图、表分别按其在正文中出现的先后顺序以阿拉伯数字连续编码。每幅图、表应冠有简明的图、表题。说明性的资料应置于图、表下方注释中,并在注释中标明图、表中使用的正文中未注释过的缩写。表格采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计或统计学处理行(如 t 值、 P 值等),则在这行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的 1/3 确定有效位数。线条图高与宽的比例约为 5:7。以计算机制图者应提供激光打印图样。照片图要求有良好的清晰度和对比度。图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接写在照片上,每幅图的背面应贴上标签,注明图号、作者姓名及图的上下方向。图片不可折。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图、表中如有引自他刊者,应注明出处。

8. 计量单位:实行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并以单位符号表示,具体使用请参照 1991 年由中华医学会杂志社编写、人民军医出版社 2004 年 10 月出版的《法定计量单位在医学上的应用》一书。单位符号可以与非物理量的单位(如:人、台、次等)的汉字构成组合形式的单位,如:次/min。组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。量的符号一律用斜体字,如光密度(原称吸光度)的符号为斜体字母“ D ”。根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]126 号文件精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但在文中首次出现时应注明 mmHg 与千帕斯卡(kPa)的换算系数($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$);如血压数据只出现在图、表中,也

应在注释中注明换算系数。文稿的图表中,表示数值的量和单位时,应采用“量/单位”的标准化形式,即把量符号写作分子,单位符号写作分母,表示量浓度或质量浓度时,一般用 L(升)作为人体检验组分含量单位的分母。

9. 数字: 执行国家 GB/T 15835-1995《关于出版物上数字用法的规定》。公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均用阿拉伯数字。数值的修约不采用“四舍五入”法则,应为 4 舍 6 入 5 看后,5 后有数进上去,5 后为零看左数,左数奇进偶舍弃。检验结果构成比统一用小数表示,不用百分数。如白细胞分类,中性粒细胞 75% 应为 0.75。小数点前或后超过 3 位数时,每 3 位数字一节,节间空 1/4 汉字空,如 1 329.476 5 应写成 1 329.476 5;但序数词和年份、页数、部队番号、仪表型号、标准号不分节。百分数的范围和公差:前一个数字的百分符号不能省略,如 5%~95% 不要写成 5~95%;百分数的中心值与公差用圆括号括起,其后写“%”,如 (65±2)% 不得写作 65±2%。附有长度单位的数值相乘时,书写方式为: 4 cm×3 cm×5 cm,而不写成 4×3×5 cm³。

10. 统计学符号: 按国家标准 GB 3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写,常用如下:① 样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$ (中位数仍用 M);② 标准差用英文小写 s ;③ 标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$;④ t 检验用英文小写 t ;⑤ F 检验用英文大写 F ;⑥ 卡方检验用希文小写 χ^2 ;⑦ 相关系数用英文小写 r ;⑧ 自由度用希文小写 ν ;⑨ 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体统计量值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。

11. 缩略语: 文中尽量少用缩略语。必须使用时,于首次出现处叙述其全称,然后括号注出中文缩略语或英文全称及其缩略语,后两者间用逗号分开(如该缩略语已公知,也可不注出其英文全称)。缩略语不得移行。

12. 参考文献: 按国家标准 GB 7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出,对连续序号采用“-”连接。尽量避免引用摘要作为参考文献。确需引用个人通讯时,可将通讯者姓名和通讯时间写在括号内括入正文相应外。参考文献表中的作者,1~3 名全部列出;3 名以上只列前 3 名,后加“等”或其他与之相应的文字。外文期刊名称用缩写,以 Index Medicus 中的格式为准;中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起-止页。参考文献必须由作者与其原文核对无误。将参考文献按引用先后顺序(用阿拉伯数字标出)排列于文末。

举例如下:

[1] 陈义汉,龚兰生,陆林,等. 高血压大鼠心肌蛋白重链 mRNA 表达和卡托普利的作用[J]. 中华心血管病杂志,1997, 25(6):423-425.

[2] 方圻. 心脏血管神经衰弱与医源性心脏病[M]//董承琅,陶寿淇,陈灏珠. 实用心脏病学. 3 版. 上海:上海科学技术出版社,1991:1112-1119.

[3] KLEVENS R M, MORRISON M A, NADLE J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States[J]. JAMA, 2007, 298(15): 1763-1771.

13. 获基金及获奖文稿: 论文所涉及的课题凡取得国家或部、省级以上基金或属攻关项目,应脚注于文题页左下方,如“基金项目:国家自然科学基金资助项目(59637050)、八五国家科技攻关项目(85-20-74)”,并附基金证书复印件。论文刊登后获奖者,请及时通知编辑部,并附获奖证书复印件。

14. 来稿请采用网络在线投稿方式,网址:www. smasmj. com。广大作者和读者可通过该网络平台投稿、查询、获取最新的刊物信息及浏览全刊。

15. 来稿须附单位推荐信,应注明稿件的真实性以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项内容。推荐信请寄:上海市北京西路 1623 号,上海市医学会《上海医学》编辑部,邮政编码 200040。

三、根据《中华人民共和国著作权法》并结合本刊具体情况,凡来稿在接到本刊回执后 3 个月内未接到稿件处理通知者,系仍在审阅中。作者如欲投他刊,请先与本刊联系,切勿一稿两投。一旦发现一稿两投,本刊将刊登此文重复发表的声明,并在 2 年内拒绝该文第一作者的任何来稿。

四、来稿一律文责自负。依照《中华人民共和国著作权法》有关规定,本刊可对来稿作文字修改、删节,凡有涉及原意的修改,则提请作者考虑。修改稿逾 3 个月不寄回者,视作自动撤稿。

五、来稿须付稿件处理费 100 元。稿件确认刊载后,需按通知数额支付版面费。要求刊印彩图者需另付彩图印制工本费。版面费和彩图印制工本费可由作者单位从课题基金、科研费或其他费用中支付。稿件刊登后酌致稿酬,并赠当期杂志 2 册。

六、本刊录用的所有稿件均另以电子网络版、光盘版等方式出版。所付稿酬中已含上述两种版本的稿酬。