

主管单位 右江民族医学院
主办单位 右江民族医学院
主编 黄龙坚
执行主编 黄俊杰
编辑 右江民族医学院
学报编辑部
出版 右江民族医学院
学报编辑部
广西百色市城乡
路 98 号
邮编:533000
电话:0776-2843414
E-mail:yyxb1979@126.com
http://xb.ymun.edu.cn/
印刷 南宁市彩印厂
国内发行 广西壮族自治区邮
政书报刊发行局
订购 全国各地邮政局
代码 48-310
中国标准连续出版物号:
ISSN 1001-5817
CN 45-1085/R
定价 10.00 元

目次

●论著与临床报道●

木鳖子丝石竹皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖醛酸甲酯体外抗肝纤维化研究 …
…………… 袁喜东,黄媛恒,吴耀生 (193)

二甲双胍通过调节 GPX4/ACSL4 轴改善高糖高脂诱导的足细胞铁死亡
…………… 叶伟,忻钰棋,朱文君,俞诗琦,何冲,孔祥,姚新明 (200)

POM121 蛋白在肝细胞癌中的表达及临床意义 ……………
…………… 姚兆女,宋鑫,裴钰琳,李迪,朱小年,谭盛葵 (207)

EGFR 通过 AKT/c-Jun 途径上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对索拉非尼
的敏感性 …………… 薛子晗,高佳丰,涂丽,刘洋,于滢,唐小龙 (215)

铬、锌、铝相互作用及对糖尿病小鼠血糖影响的研究 ……………
…………… 杨远清,郑璐萍,周文婷,罗家镠,黄衍强 (225)

紫草素去氧糖苷的合成及其抗肿瘤细胞增殖活性评估 ……………
…………… 刘大川,梅恬恬,王影 (231)

HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展
…………… 周莹,刘中,余定玥,于佳琪,张梓萌,李多杰 (237)

不同尺寸钛颗粒对巨噬细胞 M1 极化的影响和机制探讨 ……………
…………… 陈丽羽,唐礼 (242)

九华黄精炮制前后化学成分差异研究 ……………
…………… 章能胜,王金彬,叶红兵 (249)

基于 Box-Behnken 响应面法结合 GA-BP 神经网络多指标优化罗布麻叶微丸的制备工艺 葛俊,邹纯才,鄢海燕 (257)

HIV 患者马尔尼菲篮状菌感染的影响因素及预测模型构建 ... 韦叙,陈高,盘丽华,梁慧娜,梁丽花 (264)

基于 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷抵抗关系指导冠心病患者抗血小板药物选择临床应用的研究 叶三宁,贺艳,蒋芳,王欣欣 (270)

低密度脂蛋白与转铁蛋白比值在肺癌患者中的预后价值 张全,刘丽雯,莫远新,陆榆金,邱模勤,丘宏图,苏翠云,赵文华 (275)

长链非编码 RNA HOXA11-AS 在早期妊娠稽留流产绒毛组织中的表达和临床意义 练梦南,李浩,陈敏,许誉耀,宾仕凤,梁雁,农艳玫,陈秋霞,龚丽森 (281)

可复性与不可复性牙髓炎牙髓血流状态及影响因素的研究 谢松桂,覃艳宁,黄晓凤,官骏昊,黎淑芳 (286)

鼻咽癌与重度抑郁症的生物标记物研究..... 宁家杰,邓静,李珊珊,廖燕,黄建华,龙建雄,曾萍萍 (291)

lncRNA AFAP1-AS1 与 METTL14 对三阴性乳腺癌患者预后的影响 陈春春,唐经纬,孙岩峰,张浩,乔梦祥,郭伟 (301)

炎症调节因子对子宫内膜异位症风险的影响:一项孟德尔随机化研究..... 唐燕燕,童鑫 (306)

1 例免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退的个案报道并文献分析 夏亚楠,金锐,耿亚,赵宁 (313)

中国医疗资源配置研究热点及演进趋势分析 赵龙,黄龙坚 (319)

2020—2022 年广西疾病预防控制中心人员流动情况分析 白欣玉,梁文杰,李佳颖,黄倩薇,张欣梅,张菲谊,马贞玉,陈国湘 (325)

百色市某医院女性生殖道沙眼衣原体、解脲支原体和淋病奈瑟菌感染的分析..... 黄麟荣,黄衍强 (329)

●中医药现代研究●

基于数据挖掘的中医药治疗异位妊娠的用药规律研究..... 田昱晨,谢良玉,马润泽,毕是昊,师彬 (335)

●医学综述●

幽门螺杆菌在哺乳动物中定植和致病的研究进展 杨万平,阳桂艳,申亚灵,辛雅楠,李文露,黄赞松,黄干荣 (341)

高密度脂蛋白在脓毒症中的研究进展..... 黄浩,梁琼,王春芳,向淑麟,梁燕冰,邓琪,皮尔誉 (346)

腹主动瘤腔内修复术后内漏的预防策略与治疗进展..... 闭覃宇,黄柄桦,罗世官 (351)

大肠癌筛查策略及手术方式的选择 周子阳,孙纲 (357)

水通道蛋白 9 在脓毒症中的分子机制及治疗进展 韦梦秋,黄霞 (362)

●医学教育研究●

民族医科院校基础医学研究生培养模式创新与实践 覃洪含,覃灵艳,周文婷,曾红,莫小强,罗家锚,黄衍强 (367)

●临床护理●

基于 MBTI 性格分析的术前心理护理干预对初次接受试管婴儿助孕夫妻心理健康及夫妻关系的影响 陈慧中,周梦春,李媛,曾海琴 (371)

《右江民族医学院学报》稿约 (封二)

《右江民族医学院学报》入选 2024《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊 (封三)

本期责任编辑 钟琳 覃洪含 覃黎黎

本期微机排版 卢娇红

期刊基本参数: CN45-1085/R * 1979 * b * A4 * 30 * zh * P * ￥10.00 * 500 * 182 * 2025-04

Responsible Institution

Youjiang Medical University
for Nationalities

Sponsor

Youjiang Medical University
for Nationalities

Editor-in-Chief

Huang Longjian

Executive Editor-in-Chief

Huang Junjie

Edited

Editorial Board, Journal of
Youjiang Medical University
for Nationalities

Published

Editorial Board, Journal of
Youjiang Medical University
for Nationalities, No. 98,
Chengxiang Road, Baise
533000, Guangxi, China
Tel:0776-2843414
E-mail:yyxb1979@126.com
http://xb.ymun.edu.cn/

Printed

Nanning Color Printing
Factory

Domestic Distribution

Guangxi Post Publishing
Bureau

Subscribe

China Post Offices
throughout the Country
No. 48-310

**China Standard Serial Num-
ber**

ISSN 1001-5817
CN 45-1085/R

Price ¥10.00

MAIN CONTENTS

Study on anti-hepatic fibrosis of gypsogenin-3-O-β-D-glucuronide isolated
from Semen Momordicae *in vitro* Yuan Xidong, Huang Yuanheng, Wu Yaosheng (193)

Metformin ameliorates ferroptosis in podocytes induced by high glucose and
high fat through regulation of the GPX4/ACSL4 axis YE Wei, XIN Yuqi, ZHU Wenjun,
YU Shiqi, HE Chong, KONG Xiang, YAO Xinming (200)

Expression and clinical significance of POM121 protein in hepatocellular
carcinoma YAO Zhaonu, SONG Xin,
PEI Yulin, LI Di, ZHU Xiaonian, TAN Shengkui (207)

EGFR upregulates PD-L1 via the AKT/c-Jun pathway to reduce the
sensitivity of Hep3B cells to Sorafenib XUE Zihan,
GAO Jiafeng, TU Li, LIU Yang, YU Ying, TANG Xiaolong (215)

Research on the interaction among chromium, zinc, and aluminum and their
effects on blood glucose in diabetic YANG Yuanqing, ZHENG Luping,
ZHOU Wenting, LUO Jiazi, HUANG Yanqiang (225)

Synthesis of shikonin deoxyglycoside and evaluation of its antitumor cell
proliferation activity LIU Dachuan,
MEI Tiantian, WANG Ying (231)

HDAC inhibitor SAHA combined with radiotherapy inhibits the progression
of estrogen receptor-positive breast cancer cells ZHOU Ying, LIU Zhong,
YU Dingyue, YU Jiaqi, ZHANG Zimeng, LI DuoJie (237)

Effects and mechanisms of titanium particles of different sizes on M1
polarization of macrophages CHEN Liyu, TANG Li (242)

Study on the differences in chemical composition of *Polygonatum*
Cyrtonea Hua in Jiuhua Mountain before and after processing
ZHANG Nengsheng, WANG Jinbin, YE Hongbing (249)

Multi-index optimization of the preparation process of Apocynum venetum
leaf pellets based on the Box-Behnken response surface methodology
combined with the GA-BP neural network GE Jun, ZOU Chuncai, YAN Haiyan (257)

本文引文格式:袁喜东,黄媛恒,吴耀生,等.木鳖子丝石竹皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯体外抗肝纤维化研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):193-199,214.

【论著与临床报道】

木鳖子丝石竹皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯体外抗肝纤维化研究

袁喜东^{1,2},黄媛恒^{2,3},吴耀生^{1,2}

- (1. 广西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,广西 南宁 530021;
2. 广西高校生物分子医学研究重点实验室,广西 南宁 530021;
3. 广西医科大学基础医学院机能学实验教学中心,广西 南宁 530021)

摘要:目的 研究木鳖子丝石竹皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯(gypsogenin-3-O- β -D-glucuronide,GYP)对人肝星状细胞株 LX2 细胞增殖、细胞外基质分泌情况及其潜在的作用通路机制。方法 在 LX2 细胞中分别加入 400 μ mol/L 乙醛和不同浓度的 GYP 进行培养;用 CCK-8 检测试剂盒来测 GYP 作用于 LX2 细胞的 IC₅₀ 值及 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞增殖情况;划痕实验检测 LX2 细胞迁移情况;实时荧光定量(qPCR)检测 COL1A1 和 ACTA2 基因的表达水平;Western Blot 检测 Col-I、 α -SMA、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、TGF β R II、p-Smad3、Smad3、Bax 和 Bcl-2 蛋白水平的情况。结果 GYP 对 LX2 细胞 24 h 半数抑制率(IC₅₀)为 80.22 μ mol/L;GYP 能浓度依赖性地抑制乙醛诱导的 LX2 细胞存活状态($P < 0.05$);一定浓度的 GYP 能抑制 LX2 细胞的迁移($P < 0.05$)和下调乙醛诱导的 LX2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 基因的表达($P < 0.05$);GYP 可浓度依赖性地下调 Col-I、 α -SMA、p-PI3K、p-AKT、AKT、TGF β R II、p-Smad3 和 Bcl-2 蛋白的表达($P < 0.05$),并且 GYP 可浓度依赖性地上调 Bax 的表达($P < 0.05$)。结论 GYP 可能是通过调控 PI3K/AKT、TGF- β 1/Smad 和凋亡通路来抑制 LX2 细胞增殖活化,从而发挥抗肝纤维化作用。

关键词:木鳖子;丝石竹皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯;肝纤维化;PI3K/AKT 通路;TGF- β 1/Smad 通路

中图分类号:R259;R28

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0193-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.001

Study on anti-hepatic fibrosis of gypsogenin-3-O- β -D-glucuronide isolated from Semen Momordicae *in vitro*

Yuan Xidong^{1,2}, Huang Yuanheng^{2,3}, Wu Yaosheng^{1,2}

- (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Biological Molecular Medicine in Colleges and Universities, Nanning 530021, Guangxi, China;
3. Experimental Teaching Center of Functional Sciences, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of gypsogenin-3-O- β -D-glucuronide (GYP) isolated from Semen Momordicae on the proliferation and extracellular matrix secretion of human hepatic stellate LX2 cells and its underlying signaling pathways. **Methods** LX2 cells were cultured with 400 μ mol/L acetaldehyde and different concentrations of GYP respectively. The CCK-8 detection kit was used to measure the IC₅₀ value of

基金项目:广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281209)

第一作者:袁喜东,在读硕士研究生,研究方向:中草药有效成分药效研究,E-mail:1756211687@qq.com

通讯作者:吴耀生,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中草药有效成分药效研究,E-mail:2681138707@qq.com

GYP acting on LX2 cells and the proliferation of LX2 cells induced by acetaldehyde treated with GYP. The scratch wound healing assay was used to detect the migration of LX2 cells. Real-time fluorescence quantitative (qPCR) was used to detect the expression levels of *COL1A1* and *ACTA2* genes. Western Blot was performed to detect the protein levels of Col- I, α -SMA, p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, TGF β R II, p-Smad3, Smad3, Bax and Bcl-2. **Results** The 24-hour median inhibitory concentration (IC_{50}) of GYP on LX2 cells was 80.22 μ mol/L; GYP could inhibit the survival state of LX2 cells induced by acetaldehyde in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$); A certain concentration of GYP could inhibit the migration of LX2 cells ($P < 0.05$) and downregulated the expression of *COL1A1* and *ACTA2* genes in LX2 cells induced by acetaldehyde ($P < 0.05$). GYP downregulated the expression of Col- I, α -SMA, p-PI3K, p-AKT, AKT, TGF β R II, p-Smad3 and Bcl-2 proteins ($P < 0.05$) and GYP upregulated the expression of Bax ($P < 0.05$) in a concentration-dependent manner. **Conclusion** GYP may inhibit the proliferation and activation of LX2 cells by regulating PI3K/AKT, TGF- β 1/Smad and apoptotic pathways, thereby exerting anti-hepatic fibrosis effect.

Key words: Semen Momordicae; gypsogenin-3-O- β -D-glucuronide; hepatic fibrosis; PI3K/AKT pathway; TGF- β 1/Smad pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是因慢性肝损伤而导致的渐进性病理过程,可由肝炎(尤其是乙型肝炎和丙型肝炎)、寄生虫、酒精及药物、化学毒物等因素诱发。多数的慢性肝脏疾病几乎最终都会导致 HF。如果在 HF 可逆阶段不及时进行治疗,最后会逐渐发展成肝硬化甚至肝癌^[1]。每年因慢性肝病而死亡的人数在全球约有 200 万人,在全球死亡原因的排行上肝硬化并发症位于第 11 位,肝癌位于全球死亡原因第 16 位^[2]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的过度增殖与活化已被诸多学者证实是导致 HF 主要原因^[3]。当 HSC 受到各种损伤因素刺激时, HSC 由静止期活化增殖为肌成纤维细胞,进而分泌大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),伴随纤维降解相对或绝对不足,导致 ECM 过度沉积,造成 HF^[4]。然而,由于 HF 病理机制的复杂性,临床上仍缺乏有效的治疗药物。因此,研发有效的抗 HF 的药物就成了迫在眉睫的研究课题。研究表明,中药木鳖子可以显著降低慢性肝病患者血清 HF 指标即透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅲ型前胶原(Type Ⅲ procollagen, PC-Ⅲ)和Ⅳ型胶原(Collagen type Ⅳ, Ⅳ-C)的水平,有一定的抗 HF 作用^[5]。另有研究表明,木鳖子总皂苷明显减轻四氯化碳(CCl_4)所致的大鼠肝细胞坏死、肝组织纤维化和肝硬化的程度,表明木鳖子总皂苷有一定的抗 HF 作用^[6]。丝石竹皂苷元 3-O- β -D-葡萄糖醛酸甲酯(gypsogenin-3-O- β -D-glucuronide, GYP)是 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)规定的中药木鳖子质量检测的主要指标,是木鳖子皂苷降解后的次级苷^[7]。但 GYP 是否是木鳖子抗 HF 的有效成分有待进一步探究。因本课题前期通过网络药理学对木鳖子 GYP 抗肝纤维化靶点及通路富集分析发现,其主要靶点富集在 TGF- β 1/Smad 通路及 PI3K/AKT

通路、细胞凋亡通路上,故主要针对这些通路中的关键蛋白及基因进行检测分析。乙醛(AcCHO)作为机体内乙醇氧化的主要活性代谢产物,是导致酒精相关性肝纤维化的主要介质之一,能够激活肝星状细胞,导致分泌 ECM 增加,最终促进肝纤维化的形成。已有较多的实验研究采用乙醛作为激活剂,在体外用于激活 LX-2 细胞模型进行一些药物抗肝纤维化机制的研究^[8-11]。LX-2 是正常人肝星状细胞株,具有较稳定的肝星状细胞表型特征,可增殖并合成胶原等肝纤维化功能,常用作抗肝纤维研究细胞模型。本研究旨在通过乙醛激活 LX2,在细胞水平上经体外实验探讨 GYP 对 HF 的作用机制,为 HF 治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 GYP 购于美仑生物科技有限公司,从木鳖子提取(HPLC $\geq 98\%$,标准品);人肝星状细胞株 LX-2 购于武汉赛维尔生物科技有限公司;GYP、胎牛血清、DMEM(高糖)基础培养基、青链霉素(双抗)、细胞计数试剂盒(CCK-8 试剂盒)购于美仑生物科技有限公司;40%乙醛溶液购于上海麦克林化学试剂有限公司;RNA 提取试剂盒购于苏州优逸兰迪生物技术有限公司;逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒购于 TaKa-Ra 公司;兔抗 I 型胶原(Collagen I, Col- I)抗体、兔抗磷酸化母亲抗 DPP 同源物 3(mothers against decapentaplegic homolog 3, Smad3)抗体购于英国 Cohesion biosciences 公司;兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体购于美国 Cell Signaling 公司;兔抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体、兔抗转化生长因子- β 受体 II(transforming growth factor- β receptor II, TGF β R II)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购于北京博奥森生

物技术有限公司;小鼠抗磷酸化蛋白激酶 B(Protein kinase B,AKT)、小鼠抗 AKT、小鼠抗 BCL2-相关 X(BCL2-Associated X,Bax)、小鼠抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/ Leukemia-2,Bcl-2)抗体购于美国 Santa 公司;小鼠抗 PI3K、小鼠抗 Smad3、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 LX-2 细胞培养 LX-2 细胞在含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM(高糖)中培养,保持 37℃、5% CO₂。细胞每天传代培养 1 次,每次实验取对数生长期细胞进行。

1.2.2 CCK-8 法测半数抑制率(IC₅₀) LX-2 细胞接种在 96 孔板(5×10³ 个细胞/孔)中,培养 24 h 后加入不同浓度(0 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L、64 μmol/L、128 μmol/L) 的 GYP 继续培养 24 h,CCK-8 法测定细胞活力并计算 IC₅₀ 值。后续选择<IC₅₀ 的浓度进行实验。

1.2.3 CCK-8 法测 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞活力 根据 GYP 对 LX-2 半数抑制率实验的结果,选择小于半数抑制率的 GYP 安全浓度,再按等比依次递减设置高、中、低 3 个浓度;参照袁亚平等^[12] 研究,乙醛诱导 LX-2 细胞活化的最佳浓度是 400 μmol/L,设置空白对照组(不加试剂)、模型组(400 μmol/L 乙醛)、GYP 低剂量组(400 μmol/L 乙醛+16.25 μmol/L GYP)、GYP 中剂量组(400 μmol/L 乙醛+32.5 μmol/L GYP)、GYP 高剂量组(400 μmol/L 乙醛+65 μmol/L GYP)进行实验。LX-2 细胞接种在 96 孔板(5×10³ 个细胞/孔)中,培养 24 h 后按上述分组加入试剂后继续培养 24 h,CCK-8 法测定细胞活力。

1.2.4 划痕实验 分组设置同 1.2.3。于 6 孔板背面用 marker 笔平行画 5 条横线。培养 LX-2 细胞,接种原则为过夜后融合率达到 100%。接着按照上述分组处理细胞 24 h。所有培养孔在培养 0 h 和 24 h 时置于倒置显微镜(10 倍镜)下观察结果并拍照,使用 ImageJ 软件测量分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qPCR) 分组设置同 1.2.3。用 60 mm 细胞培养皿培养 LX-2 细胞,每皿接种 4×10⁵ 个细胞,培养 24 h。接着按照分组处理细胞 24 h,用 RNA 试剂盒提取总 RNA;再用逆转录试剂盒逆转录 RNA,获得 cDNA。逆转录程序为:去除基因组 DNA:42℃,2 min;逆转录:37℃ 15 min,85℃ 5 s;根据 NCBI 设计 COL1A1、ACTA2、GAPDH 的引物,由宝生物工程(大连)有限公司设计,见表 1。反应程序:95℃ 30 s,1 个循环;95℃ 5 s,60℃ 34 s,

40 个循环。用 2^{-△△Ct} 计算基因的相对表达量。

表 1 qPCR 检测 COL1A1、ACTA2 所需引物

序号	基因	引物序列(5'→3')	
1	COL1A1	CCCCGAGGCTCTGAAGGT	COL1A1-F
		GCAATACCAGGAGCACCATTG	COL1A1-R
2	ACTA2	GTTCCGCTCCTCTCTCCAAC	ACTA2-F
		GTGCGGACAGGAATTGAAGC	ACTA2-R
3	GAPDH	GAAAGCCTGCCGGTGACTAA	GAPDH-F
		GCCCAATACGACCAAATCAGAG	GAPDH-R

1.2.6 Western Blot 分组设计同 1.2.3。细胞培养和处理同 1.2.5。用含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞,裂解液在离心机中 12 000 r/min 4℃离心 30 min,收集上清液用于进一步分析,使用 BCA 测定试剂盒测量蛋白浓度,100℃变性 10 min,总蛋白经 10%凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,1×TBST 摇床洗涤 3 次,每次 5 min。与下列一抗孵育:Col-I、α-SMA、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、TGFβR II、p-Smad3、Smad3、Bcl-2、Bax 和 GAPDH。4℃孵育过夜。1×TBST 摇床洗涤 3 次,每次 10 min。将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后使用化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)采集图像,并通过 ImageJ 分析软件进行量化,测定蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参对目的蛋白进行半定量分析。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.5.0 统计软件对数据进行分析 and 作图,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GYP 对 LX-2 细胞增殖的影响 GYP 对 LX-2 的 IC₅₀ 为 80.22 μmol/L,即细胞存活率降到 50%时的 GYP 浓度。后续实验选择相对安全的浓度,即≤65 μmol/L 的 GYP 进行后续实验。细胞存活率=(OD_{实验孔} - OD_{空白孔})/(OD_{对照组} - OD_{空白孔})×100%,见图 1。

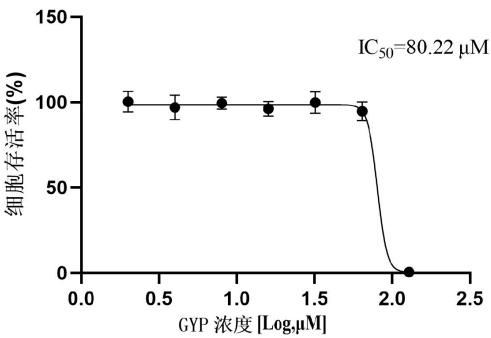
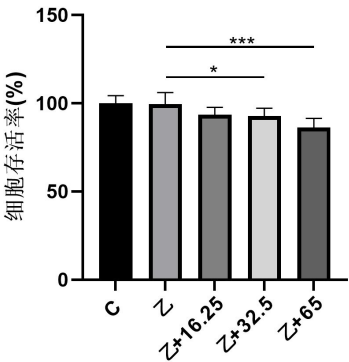


图 1 GYP 对 LX-2 细胞增殖的影响

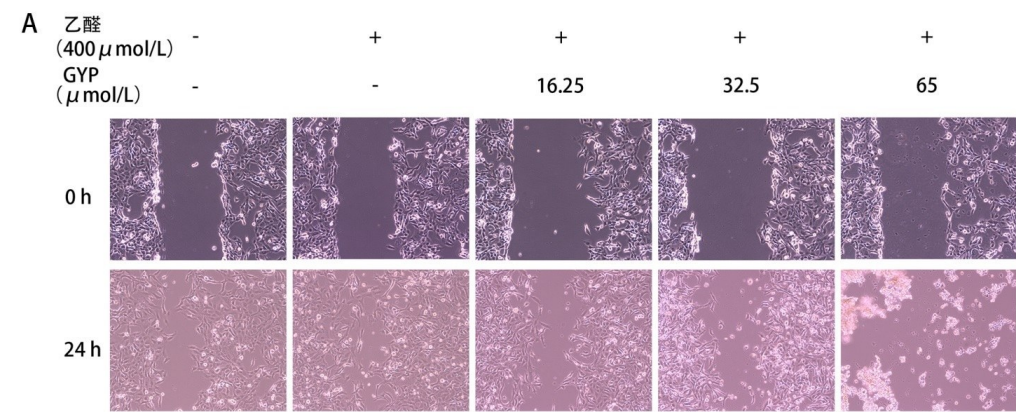
2.2 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞增殖的影响 选择对 LX-2 细胞增殖没有影响也就是安全的 GYP 浓度进行实验。结果虽然显示乙醛并没有进一步促进 LX-2 细胞增殖,但所采用的 GYP 剂量依赖性地抑制了乙醛作用后 LX-2 细胞增殖,细胞存活率下降。其中,32.5 $\mu\text{mol/L}$ 、65 $\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 LX-2 细胞增殖的抑制有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),见图 2。

2.3 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移的影响 与对照组相比,乙醛具有一定的促进 LX2 细胞迁移能力的趋势,但差异无统计学意义。而 GYP 对这种促进有一定的抑制作用,32.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 LX2 细胞迁移能力的抑制具有统计学意义($P < 0.05$),见图

3。而无血清下 LX2 细胞无法耐受 65 $\mu\text{mol/L}$ 的 GYP。



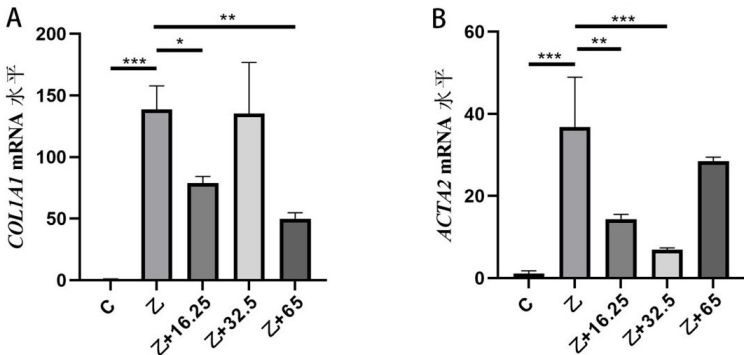
注:与乙醛对照组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。
图 2 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞存活率的影响



注:A 为 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移能力的影响;B 为相对迁移率;与乙醛对照组相比,* $P < 0.05$ 。
图 3 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移的影响($\times 10$)

2.4 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 的 mRNA 水平的影响 与对照组相比,乙醛上调了 LX2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平,具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。而 GYP 对 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平的上调有抑制作用,

其中 16.25 $\mu\text{mol/L}$ 、65 $\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 COL1A1 mRNA 水平的上调抑制具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),16.25 $\mu\text{mol/L}$ 、32.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 ACTA2 mRNA 水平的上调抑制具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),见图 4。

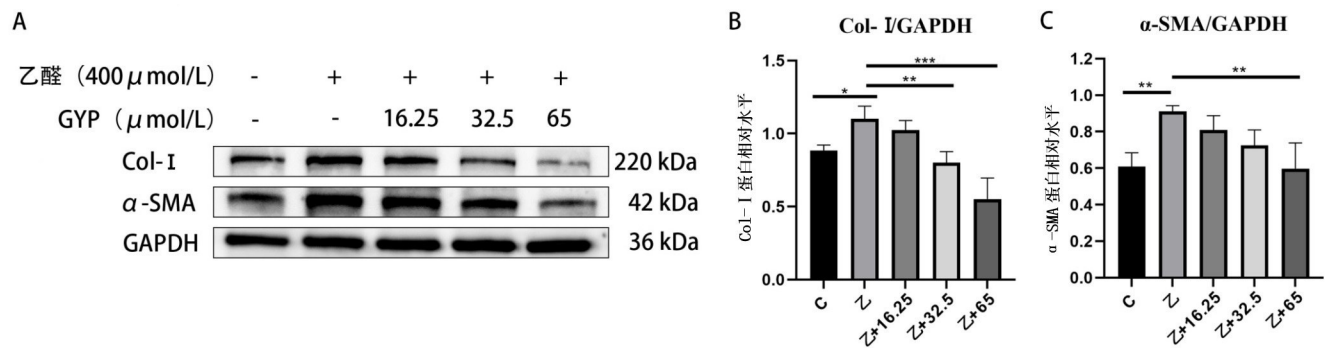


注:A 为 COL1A1 mRNA 水平;B 为 ACTA2 mRNA 水平;
* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 4 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平的影响

2.5 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 Col-I 和 α -SMA 蛋白水平的影响 与对照组相比,乙醛上调了 LX2 细胞 Col-I 和 α -SMA 蛋白水平,具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而 GYP 呈剂量依赖性地抑制了

蛋白上调,其中 $32.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 Col-I 蛋白的上调抑制有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 α -SMA 蛋白的上调抑制有统计学意义($P < 0.01$),见图 5。

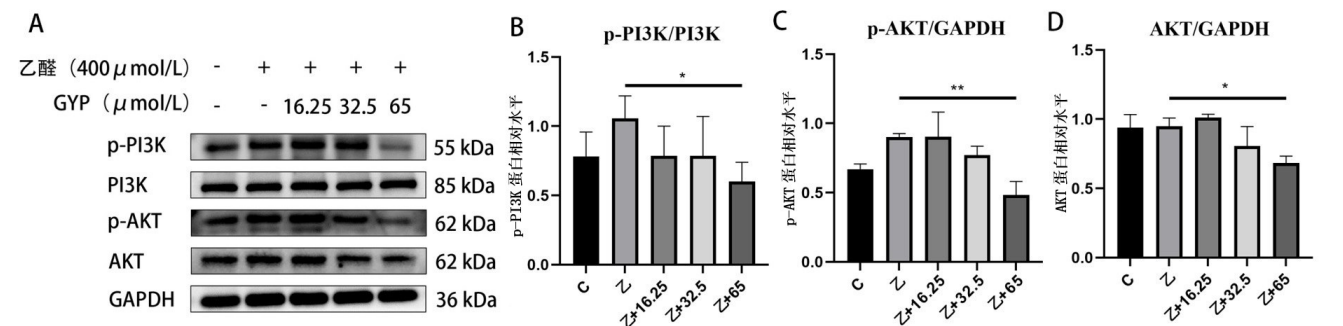


注:A 为 Col-I 和 α -SMA 的 WB 条带图;B 为 Col-I 蛋白相对水平;
C 为 α -SMA 蛋白相对水平;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 Col-I 和 α -SMA 蛋白水平的影响

2.6 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 PI3K/AKT 通路的影响 与对照组相比,乙醛有上调 LX2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白水平的趋势。而 GYP 对这种上调有一定的抑制作用,其中 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的上调抑制有统计学意义($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$)。此外,乙醛没有诱导 AKT 蛋白的表达,但 GYP 抑制了乙醛作用后的 LX2 细胞 AKT 蛋白的表达,其中 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 AKT 蛋白表达的抑制有统计学意义($P < 0.05$),见图 6。



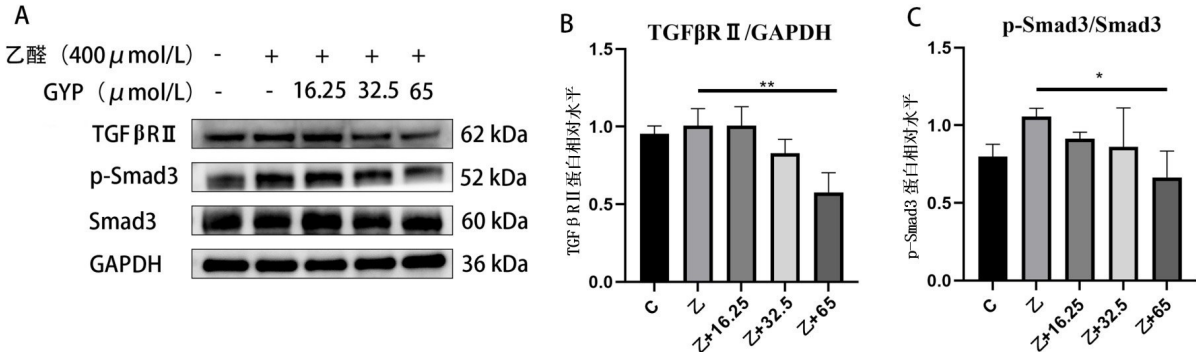
注:A 为 p-PI3K,PI3K,p-AKT 和 AKT 的 WB 条带图;B 为 p-PI3K 蛋白相对水平;
C 为 p-AKT 蛋白相对水平;D 为 AKT 蛋白相对水平;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 PI3K/AKT 通路的影响

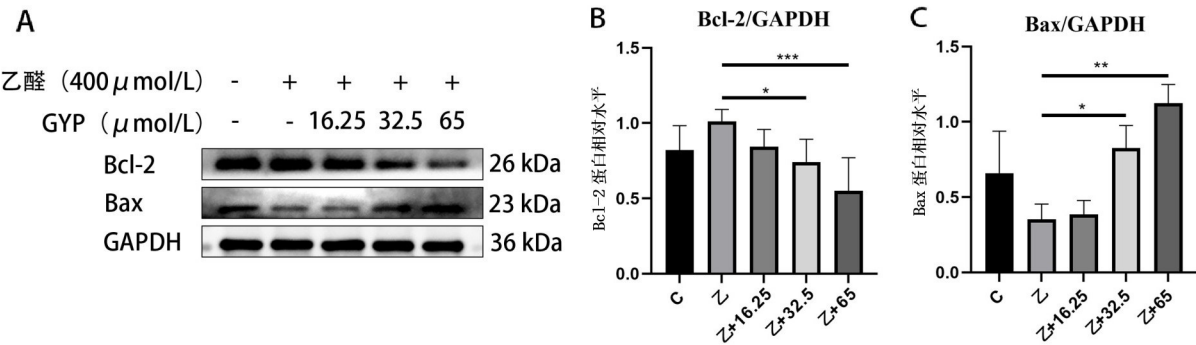
2.7 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 TGF- β 1/SMAD 通路的影响 与对照组相比,尽管乙醛上调 LX2 细胞 TGF β R II 和 p-Smad3 蛋白水平趋势不明显,但 GYP 呈剂量依赖性地抑制蛋白上调趋势;其中 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 TGF β R II 和 p-Smad3 蛋白的上调抑制有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 7。

2.8 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞凋亡通路的影响 与对照组相比,乙醛有一定的上调 LX2 细胞 Bcl-2 蛋

白水平的作用。而 GYP 呈剂量依赖性地抑制了这种上调,其中 $32.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 Bcl-2 蛋白的上调抑制有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。同时,乙醛还有下调 LX2 细胞 Bax 蛋白水平的趋势,而 GYP 呈剂量依赖性地促进了 Bax 蛋白的表达,其中 $32.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $65\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GYP 对 Bax 蛋白的促进表达有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 8。



注:A为 TGFβR II, p-Smad3 和 Smad3 的 WB 条带图;B 为 TGFβR II 蛋白相对水平;
C 为 p-Smad3 蛋白相对水平;* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 7 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 TGF-β1/SMAD 通路的影响



注:A为 Bcl-2 和 Bax 的 WB 条带图;B:Bcl-2 蛋白相对水平;C:Bax 蛋白相对水平;
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
图 8 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞凋亡通路的影响

3 讨论

木鳖子^[5]及木鳖子总皂苷^[6]可以发挥抗 HF 作用,但木鳖子皂苷单体 GYP 的抗 HF 研究鲜少报道。有报道木鳖子总皂苷对小鼠具有一定毒性^[13]。本研究采用木鳖子总皂苷的降解产物 GYP(纯度 HPLC $\geq$ 98%),探讨了 GYP 在体外抗 HF 作用的潜在机制。实验中所使用的 GYP 浓度,是经细胞毒性实验后选择对 LX-2 未呈现毒性的安全剂量。结果表明,GYP 抑制 HF 和抑制 HSC 增殖、活化、迁移有关,其可能机制是通过调节 PI3K/AKT、TGF-β1/Smad 和凋亡信号通路来实现的。

HSC 的增殖与活化为 HF 发生的中心环节^[14]。各种致病因子导致肝损伤,诱发 HSC 增殖分化为肌成纤维细胞后大量分泌 ECM 在肝内蓄积,诱发 HF 的发生^[15]。α-SMA 被认为是 HSC 激活的标志^[16]。Col-I 和 纤维连接蛋白是 ECM 的主要成分,其过度蓄积是 HF 的特征性病理改变^[17]。在本研究中,用乙醛诱导 LX-2 细胞建立了体外 HF 模型,乙醛诱导 LX-2 细胞后,ECM Col-I 和 HSC 激活的标志成分 α-SMA 不论从转录水平还是蛋白水平,均明显表达增加。说明采用乙醛作用后的 LX-2 细胞的确是激活的,可用作

GYP 抗肝纤维化的细胞模型。GYP 处理显著下调了乙醛诱导的 Col-I、α-SMA 的蛋白和 mRNA 的表达。这表明 GYP 在体外能抑制 LX-2 的活化而减弱 HF 进程。TGF-β1/Smad 通路是 HF 的经典通路之一,当转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)与细胞膜表面 TGFβR II 形成复合物,使 TGFβR I 被 TGFβR II 磷酸化,从而激活 TGFβR I 的激酶活性,激活的 TGFβR I 通过其丝氨酸/苏氨酸激酶活性磷酸化受体调节的 Smad 蛋白如 Smad2 和 Smad3,磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 形成三聚体复合物,进入细胞核调节特异性促纤维化的基因转录,从而导致 HF 的发生^[18]。周林华等^[19]研究表明栀子苷显著改善了 CCl₄ 诱导的小鼠 HF,其可能机制是通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白的表达来实现。本研究中,GYP 显著下调了乙醛诱导 LX-2 细胞的 TGFβR II 和 p-Smad3 蛋白的表达, TGFβR II 和 p-Smad3 蛋白是 TGF-β1/Smad 通路上的关键蛋白。提示 GYP 在体外抑制 HSC 活化和 HF 可能是通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路实现的。

PI3K/AKT 是 HF 一个重要的信号通路,其中 PI3K 是一种磷脂酰肌醇 3 激酶,可因磷酸化修饰激

活,能够将细胞膜上的磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸,从而引发磷酸化 AKT 而激活。AKT 被激活后调节多个 HSC 细胞代谢、生存和增殖相关的通路。LI H G 等^[20]研究表明郁肝龙通过抑制 PI3K/AKT 通路 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,显著改善 CCl₄ 诱导的 HF。本研究中,GYP 显著下调了乙醛作用 LX-2 细胞后 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,提示 GYP 在体外抑制 HF 和 HSC 活化也可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

本课题前期做了 GYP 抗肝纤维化作用靶点及通路的网络药理学分析,发现 GYP 的抗肝纤维化靶点及通路主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路、细胞凋亡等(数据待发表)。因 TGF- β 1/Smad 通路是 HF 的经典通路之一,且 PI3K/AKT 也是 HF 一个重要的信号通路,故本研究主要选择 TGF- β 1/Smad 通路、PI3K-Akt 信号通路进行实验验证,结果也说明 GYP 抗肝纤维化与上述两条通路有关。由上述研究可知,GYP 抗 HF 是一个多通路、多靶点的复杂过程,GYP 调控的 TGF- β 1/Smad 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路可能互为上下游,也可能是单独同时作用的两条通路,需要做进一步深入探究。但其 GYP 调控的最终效应都是抑制 HSC 活化增殖,从而减少 ECM 的分泌和蓄积,进而减轻 HF。

Bcl-2 家族主要由抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 组成,其主要作用是通过促进线粒体蛋白的释放对 HSC 的凋亡进行控制^[21]。活化的 HSC 中,Bcl-2/Bax 比值升高,即 Bcl-2 过表达,Bax 的表达基本消失,从而抑制 HSC 的凋亡,使 HSC 持续处于活化状态,不断分泌 ECM,最终导致 ECM 过度沉积,形成 HF^[22]。本研究中,GYP 显著下调了乙醛诱导的 LX-2 细胞 Bcl-2 蛋白的表达并且显著上调了 Bax 蛋白的表达。本研究中 GPY 也显著抑制乙醛作用 LX-2 细胞后 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,而抑制 PI3K/Akt 信号通路传导可降低 Bcl-2/Bax 比率来调节线粒体功能,诱导成纤维细胞凋亡,并激活 Caspase-9 和 Caspase-3 及 PARP-2,诱导凋亡逆转纤维化^[23]。提示 GYP 可能是通过 PI3K-Akt 信号通路进一步促进 LX-2 细胞凋亡,从而发挥体外抗 HF 作用的。

综上所述,GYP 在体外能抑制 HF 和 HSC 增殖、活化、迁移,其机制可能是通过抑制 PI3K/AKT、TGF- β 1/Smad 和凋亡通路来实现的。本研究结果表明,木鳖子 GYP 可能是一种有前途的抗 HF 治疗药物,但其抗 HF 的分子机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈艳,郭朋. 活血化瘀法治疗肝纤维化的理论基础及作用机制探讨[J]. 中西医结合肝病杂志,2019,29(4):299-300.
- [2] ASRANI S K,DEVARBHAVI H,EATON J,et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol,2019,70(1):151-171.
- [3] KAMM D R,MCCOMMIS K S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology[J]. J Physiol,2022,600(8):1825-1837.
- [4] DU K,HYUN J,PREMONT R T,et al. Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology,2018,154(5):1465-1479. e13.
- [5] 牛玉东,牛玉红,王亚雄. 中药抗肝纤维化 60 例疗效观察[J]. 陕西中医,2003,24(1):31-32.
- [6] 汪斌. 木鳖子总皂苷的制备及其抗肝纤维化作用的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2011.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部):2020 年版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:66-67.
- [8] 武雪. CD73 通过调控肝星状细胞自噬加重酒精相关性肝纤维化及机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2023.
- [9] YANG Y,YANG F,WU X J,et al. EPAC activation inhibits acetaldehyde-induced activation and proliferation of hepatic stellate cell *via* Rap1[J]. Can J Physiology Pharmacol,2016,94(5):498-507.
- [10] WANG Q,DAI X F,YANG W Z,et al. Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells[J]. Int Immunopharmacol,2015,25(2):340-352.
- [11] SVEGLIATI-BARONI G,RIDOLFI F,DI SARIO A,et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells[J]. Hepatology,2001,33(5):1130-1140.
- [12] 袁亚平,孙启山,周小倩,等. 草乌甲素对乙醛诱导的 LX-2 细胞 ECM 分泌及相关蛋白表达的影响[J]. 皖南医学院学报,2022,41(5):416-419.
- [13] 汪斌,程德怀,黄带,等. 木鳖子中总皂苷的提取分离工艺及其急性毒性的研究[J]. 安徽医药,2011,15(2):147-149.
- [14] 孙竟然,卢秉久,郑佳连,等. 扶正化纤方调控 PI3K/AKT/BAD 信号通路对肝纤维化小鼠的作用及机制[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(11):1652-1660.
- [15] LACKNER C,TINIAKOS D. Fibrosis and alcohol-related liver disease[J]. J Hepatol,2019,70(2):294-304.

本文引文格式:叶伟,忻钰棋,朱文君,等.二甲双胍通过调节 GPX4/ACSL4 轴改善高糖高脂诱导的足细胞铁死亡[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):200-206.

【论著与临床报道】

二甲双胍通过调节 GPX4/ACSL4 轴改善 高糖高脂诱导的足细胞铁死亡

叶伟^{1,2},忻钰棋¹,朱文君^{1,2},俞诗琦^{1,2},何冲¹,孔祥²,姚新明²

(1. 皖南医学院研究生学院,安徽 芜湖 241002;

2. 皖南医学院第一附属医院内分泌科,安徽 芜湖 241001)

摘要:目的 探究高糖高脂诱导小鼠足细胞发生铁死亡的作用机制以及二甲双胍(Met)能否通过抑制铁死亡改善足细胞损伤。方法 ①将小鼠肾足细胞(MPC-5 细胞)分组:MPC-5 细胞分别在正常组(葡萄糖浓度为 5.6 mM 的 DMEM 培养基,Con 组)、高糖组(葡萄糖浓度为 33.3 mM 的 DMEM 培养基,HG 组)、高脂组(葡萄糖浓度为 5.6 mM,棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,HP 组)、高糖高脂组(葡萄糖浓度为 33.3 mM,棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,GP 组),孵育 24 h。②加入铁死亡抑制剂 Fer-1 处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+Fer-1 组(MPC-5 细胞于铁死亡抑制剂 Fer-1 浓度为 10 μ M 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Fer-1 浓度为 10 μ M 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。③加入降糖药物处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+Met 组(MPC-5 细胞于 Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基)、GP+沙格列汀(Sax)组(MPC-5 细胞于 Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基)、GP+达格列净(Dap)组(MPC-5 细胞于 Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。分别检测各组细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白(xCT、GPX4 及 ACSL4)的表达。结果 ①与 Con 组相比,HP 组、GP 组 MPC-5 细胞生存率降低,GSH/GSSG 比值下降,脂质过氧化物含量升高,铁离子浓度增加,GPX4 表达下降,ACSL4 表达上升。②GP 组 MPC-5 细胞在 Fer-1 作用下,细胞生存率增加,GSH/GSSG 比值上升,脂质过氧化物水平下降,铁离子浓度降低,GPX4 表达增加而 ACSL4 表达下降。③GP 组 MPC-5 细胞在 3 种降糖药作用下,细胞生存率均增加,GSH/GSSG 比值上升,脂质过氧化物水平下降,铁离子浓度降低,GPX4 表达增加而 ACSL4 表达下降,而其中 Met 的作用效果最为明显。结论 铁死亡参与了 GP 引起的足细胞损伤过程,Met 可通过 GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡改善足细胞损伤。

关键词:铁死亡;足细胞;糖尿病肾病;二甲双胍

中图分类号:R587.24

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0200-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.002

Metformin ameliorates ferroptosis in podocytes induced by high glucose and high fat through regulation of the GPX4/ACSL4 axis

YE Wei^{1,2}, XIN Yuqi¹, ZHU Wenjun^{1,2}, YU Shiqi^{1,2}, HE Chong¹, KONG Xiang², YAO Xinming²

(1. Graduate School, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of
Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism underlying ferroptosis in mouse podocytes induced by high glucose and high fat and to determine whether metformin (Met) can ameliorate podocyte injury by inhibi-

基金项目:国家自然科学基金项目(81970699);安徽省自然科学基金项目(2308085MH252);芜湖市科技项目(2023jc27)

第一作者:叶伟,住院医师,研究方向:内分泌学,E-mail:yw8155@sina.com

通讯作者:姚新明,博士,主任医师,研究方向:内分泌学,E-mail:yxm6965@sina.com

ting ferroptosis. **Methods** ① Mouse podocytes (MPC-5 cells) were divided into five groups: control (Con group, DMEM medium with glucose at 5.6 mM), high glucose (HG group, DMEM medium with glucose at 33.3 mM), high fat (HP group, DMEM medium with glucose at 5.6 mM and sodium palmitate at 0.25 mM), and high glucose + high fat group (GP group, DMEM medium with glucose at 33.3 mM and sodium palmitate at 0.25 mM), followed by 24-hour incubation. ② Ferroptosis inhibitor Fer-1 treatment: MPC-5 cells were divided into Con, GP, and GP + Fer-1 groups (MPC-5 cells were pretreated with Fer-1 at a concentration of $10\mu\text{M}$ in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Fer-1 concentration of $10\mu\text{M}$), followed by 24-hour incubation. ③ Antidiabetic drug treatment: MPC-5 cells were divided into Con, GP, GP + Met groups (MPC-5 cells were pretreated with Met at a concentration of 0.5 mM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Met concentration of 0.5 mM), GP + saxagliptin (Sax) group (MPC-5 cells were pretreated with Sax at a concentration of 100 nM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Sax concentration of 100 nM), GP + dapagliflozin (Dap) group (MPC-5 cells were pretreated with Dap at a concentration of $2\mu\text{M}$ in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Dap concentration of $2\mu\text{M}$), followed by 24-hour incubation. Cell viability, GSH/GSSG ratio, lipid peroxide content, iron ion concentration, and expression of ferroptosis-related proteins (xCT, GPX4, and ACSL4) were measured in each group. **Results** ① Compared with the Con group, MPC-5 cells in the HP and GP groups showed decreased cell viability, reduced GSH/GSSG ratio, increased lipid peroxide levels, elevated iron ion concentration, decreased GPX4 expression, while increased ACSL4 expression. ② MPC-5 cells in the GP group showed increased cell viability treated with Fer-1, increased GSH/GSSG ratio, decreased lipid peroxidation and iron concentration, and increased GPX4 expression but decreased ACSL4 expression. ③ Under the action of the three antidiabetic drugs in the GP group, MPC-5 cells showed increased cell viability, elevated GSH/GSSG ratio, decreased lipid peroxide levels, reduced iron ion concentration, increased GPX4 expression, and decreased ACSL4 expression. Among them, Met exhibited the most significant effect. **Conclusion** Ferroptosis contributes to podocyte damage induced by GP, and Met can ameliorate podocyte damage by inhibiting ferroptosis through the GPX4/ACSL4 axis.

Key words: ferroptosis; podocytes; diabetic nephropathy; metformin

近年来,随着社会发展,人们饮食结构、生活习惯发生变化,肥胖人群增多,全球 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患病率逐年升高,已成为当今世界备受瞩目的公共卫生问题^[1]。糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)作为糖尿病最严重的微血管并发症之一,是进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的主要原因之一,也是导致心血管疾病发生的危险因素,增加患者死亡风险^[2-3]。DKD 的病理变化复杂,最初为肾脏肥大,肾小球滤过率增加,随着病情进展,肾小球系膜细胞增殖、系膜细胞外基质增多、基底膜增厚最后发展成肾小球硬化。有研究发现链脲佐菌素诱导的 DKD 大鼠肾脏组织中有铁死亡的发生,加重了肾脏损伤^[4]。而足细胞是肾脏组织中重要的固有细胞,与内皮细胞、肾小球基底膜构成了肾小球的 3 层滤过屏障,研究发现,足细胞的特殊形态和结构对于维持肾小球滤过屏障的完整性起到重要作用^[5]。因此,足细胞的铁死亡严重影响肾小球滤过功能,探究足细胞铁死亡对 DKD 的诊治具有深远意义。DIXON S J 等^[6]在研究中首次提出把铁死

亡和其他死亡方式加以区别,不同于细胞凋亡、坏死、焦亡和自噬,其主要特征是铁离子的积累和脂质过氧化物的发生;形态学上主要表现为包膜破裂,线粒体密度增加,体积减小等。目前常用的降血糖药物对缓解或者逆转 DKD,延缓其发展成 ESRD 收效甚微^[7]。因此,迫切需要探索一种降血糖同时保护肾脏的药物。

1 材料与仪器

1.1 细胞 实验用小鼠肾足细胞 MPC-5 购自商城北纳创联生物科技有限公司,编号为 BNCC342021。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 10% 血清、 1% 双抗条件下增殖,10~14 d 后分化成熟。

1.2 药物 二甲双胍(批号 H20023370)购自中美上海施贵宝制药有限公司,沙格列汀(批号 H20160088)购自阿斯利康制药有限公司,达格列净(批号 H20234464)购自阿斯利康制药有限公司,上述药物均用 DMSO 配制。

1.3 试剂 Ferrostatin-1(货号: A4371)购自于上海伟寰生物科技有限公司;棕榈酸钠(货号: P9767)购自于默克生命科学; $10\times\text{PBS}$ 缓冲液(货号: BL316A)、

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)(货号:BL502A)购自于安徽碧云天生物技术有限公司;铁离子比色法检测试剂盒(货号:E1042-100)购自于北京普利莱基因技术有限公司;总谷胱甘肽(GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)测定试剂盒(货号:A-061-1)购自于南京建成生物工程研究所有限公司;BODIPY 581/591 C11(货号:D3861)购自于赛默飞世尔科技公司;彩虹 130 广谱蛋白 marker(货号:PR1910)购自于北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒(货号:C0037)、SDS-PAGE 凝胶快速试剂盒(产品编号:P0012AC)购自于安徽碧云天生物技术有限公司;GPX4 蛋白抗体(Ab125066)、xCT 蛋白抗体(Ab175186)、ACSL4 蛋白抗体(Ab155282)购自于艾博抗(上海)贸易有限公司; β -actin 抗体(AF7018)购自于爱必信(上海)生物科技有限公司;山羊抗兔 IgG(货号:G1213-100UL)、山羊抗鼠 IgG(货号:G1214-100UL)购自于武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.4 仪器 超净工作台[安泰生物工程(上海)有限公司];超纯水制备仪(默克密理博);多功能酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];电泳仪电源[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];垂直电源设备[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];转印设备[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];化学发光仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];高速冷冻离心机(赛默飞尔科技公司);细胞培养箱(赛默飞尔科技公司);高压蒸汽灭菌器(松下三洋);生物安全柜[安泰生物工程(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 实验分组 ①将小鼠肾足细胞(MPC-5 细胞)分组:MPC-5 细胞分别在正常组(葡萄糖浓度为 5.6 mM 的 DMEM 培养基,Con 组)、高糖组(葡萄糖浓度为 33.3 mM 的 DMEM 培养基,HG 组)、高脂组(葡萄糖浓度为 5.6 mM、棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,HP 组)、高糖高脂组(葡萄糖浓度为 33.3 mM、棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,GP 组),孵育 24 h。检测各组 MPC-5 细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白(xCT、GPX4 及 ACSL4)的表达。②将 MPC-5 细胞置于 GP 下孵育 0 h、12 h、24 h、36 h,检测各组细胞的细胞生存率变化情况及铁死亡相关蛋白的表达。③加入铁死亡抑制剂 Fer-1 处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+Fer-1 组(MPC-5 细胞于铁死亡抑制剂 Fer-1 浓度为 10 μ mol/L 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Fer-1 浓度为 10 μ mol/L 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。检测各组细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子

浓度以及铁死亡相关蛋白的表达。④加入降糖药物处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+二甲双胍(Met)组(MPC-5 细胞于 Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基)、GP+沙格列汀(Sax)组(MPC-5 细胞于 Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基)、GP+达格列净(Dap)组(MPC-5 细胞于 Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。检测各组细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白的表达。

2.2 实验方法

2.2.1 MPC-5 细胞活性检测 于 96 孔板中接种 MPC-5 细胞,每孔加入约 2 000 个细胞 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 细胞培养箱内孵育 24 h。镜下观察细胞贴壁情况,根据不同实验需求,对细胞进行相应处理。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,每孔直接加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液并继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 h。孵育完成后酶标仪检测各孔在 450 nm 处的 OD 值,并计算出各组细胞的活性值。

2.2.2 脂质过氧化的测定 将 MPC-5 细胞按适当密度接种到 6 孔板中,7 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h 后,继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,按照每孔 50 μ mol/L 的浓度,加入脂质过氧化荧光探针 C11-BODIPY581/591,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。吸弃陈旧培养基,PBS 洗涤 2 遍,胰酶消化液收集各孔细胞,做好标记,1 000 r/min 5 min 离心弃去上清液,加入含 5%血清的 PBS,轻轻吹打使其变成均匀的单细胞悬液,使用流式细胞仪进行检测。

2.2.3 GSH/GSSG 比值的测定 收集各组细胞,并对各组细胞样本进行处理:加入 4 倍新配制的试剂四,旋涡混匀 30 s 后,4 $^{\circ}$ C 静置 5 min。随后 3 000 r/min 10 min 取上清液。按试剂盒说明加入相应试剂后,使用酶标仪测定 A405,计算出各组 GSH、GSSG 含量。

2.2.4 Western Blot 测定 xCT、GPX4、ACSL4 蛋白表达 取出 6 孔板,将陈旧培养基吸弃,PBS 清洗。每孔加入 150 μ L 含 1%PMSF 的裂解液,冰上裂解 10 min,4 $^{\circ}$ C,14 000 r/min 10 min,收集上清液,取少量样本用于 BCA 法测定蛋白浓度。于各组中的蛋白上清液中,加入 5X 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳:配置 12%分离胶和 5%浓缩胶,上样后按照 S1:80 V 30 min,S2:120 V 90 min 进行电泳。PVDF 膜经甲醇浸泡活化 1 min,按照 115 V 75 min 进行转膜。封闭:5%脱脂牛奶室温水平摇

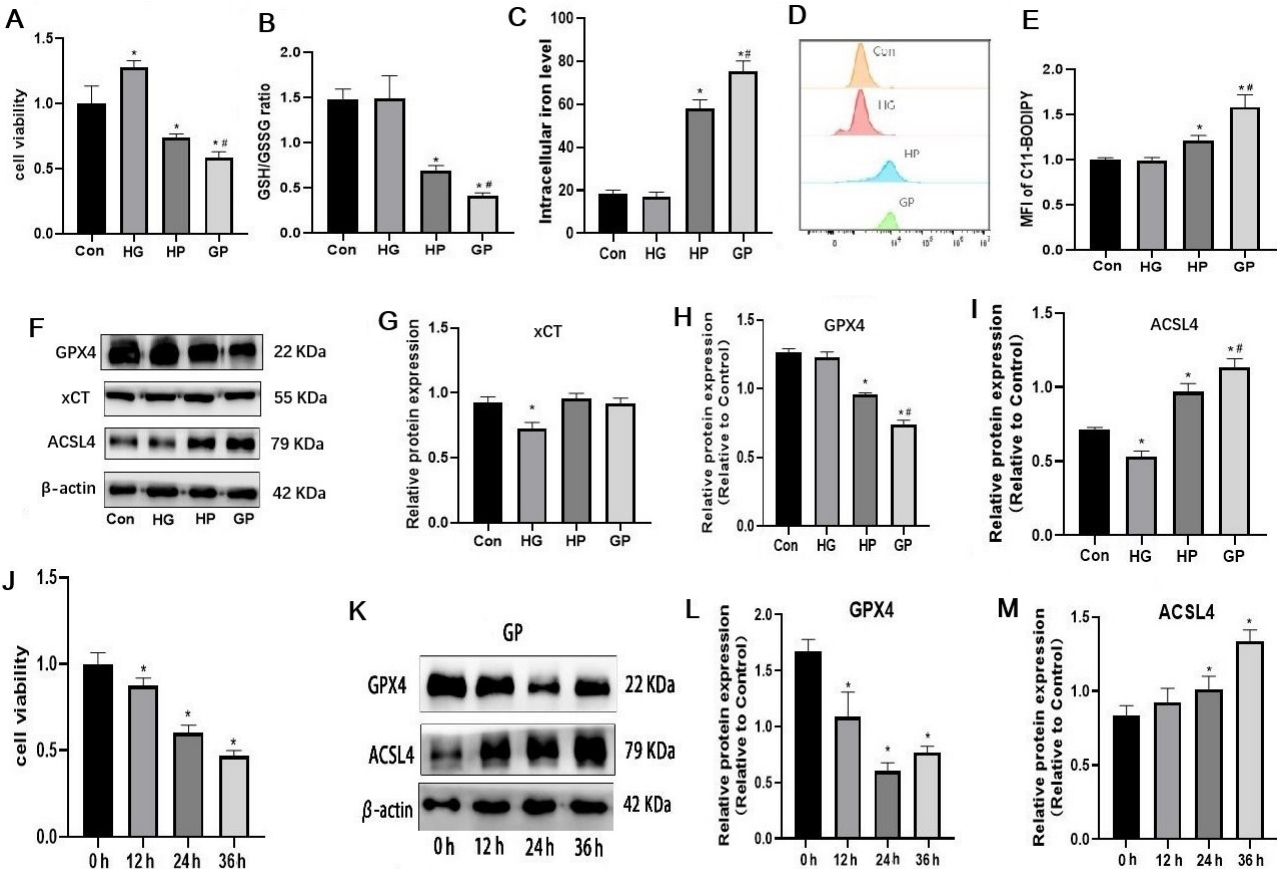
床上封闭 2 h。抗体孵育:封闭完成后,弃去封闭液, TBST 溶液漂洗 3 次,每次 10 min,裁剪所需条带,放入相应的一抗中,4 ℃ 水平摇床孵育过夜。次日取出条带,将条带转移至 TBST 溶液中,洗涤 3 次,每次 10 min。按照一抗来源选择相应的二抗,水平摇床温室孵育 1~2h。显影:取出条带,二抗回收,同样于 TBST 溶液中,洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 发光显影。统计分析:ImageJ 软件处理相应的条带灰度值和内参,进行灰度值分析。

2.2.5 细胞铁离子浓度检测 将各组细胞收集起来,然后用预冷的 PBS 清洗,吸弃,加入 100~200 μL 裂解液,震荡、裂解,12 000 r/min 5 min 高速离心取上清液。按照试剂盒说明倍比稀释标准品,并设置空白对照管,标准品管和样品管。60 ℃ 孵育 1 h。冷却至室温,加入 30 μL 铁离子检测剂,混匀,温室孵育 30 min,12 000 r/min 5 min 离心取上清液。取 200 μL 于 96 孔板中,用酶标仪在 550 nm 测定吸光度。根据标准品绘制标准曲线,得出计算公式,计算各组的 Fe^{2+} 含量。

2.2.6 统计学方法 实验数据均以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,本研究采用 SPSS 23.0 对实验数据进行统计分析,用 GraphPad prism 8.0 作图,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 高脂、高糖高脂诱导 MPC-5 细胞发生铁死亡 结果显示高糖(HG 组)并未诱导足细胞铁死亡的发生,高脂(HP 组)、高糖高脂(GP 组)均导致 MPC-5 细胞生存率和 GSH/GSSG 比值降低(见图 1A、图 1B),细胞亚铁离子浓度升高(见图 1C),脂质过氧化物含量也相应增多(见图 1D、图 1E),GPX4 表达下降,ACSL4 表达上升(P 均 <0.05),xCT 未见明显的变化(图 1F~图 1I)。而高糖高脂相较于高脂加重了足细胞铁死亡的发生,因此选择高糖高脂进行后续实验。随着高糖高脂孵育时间延长,MPC-5 细胞生存率呈进行性下降(见图 1J),同时 GPX4 表达逐渐下降,ACSL4 与之相反则呈现上升趋势(P 均 <0.05 ,见图 1K~图 1M)。

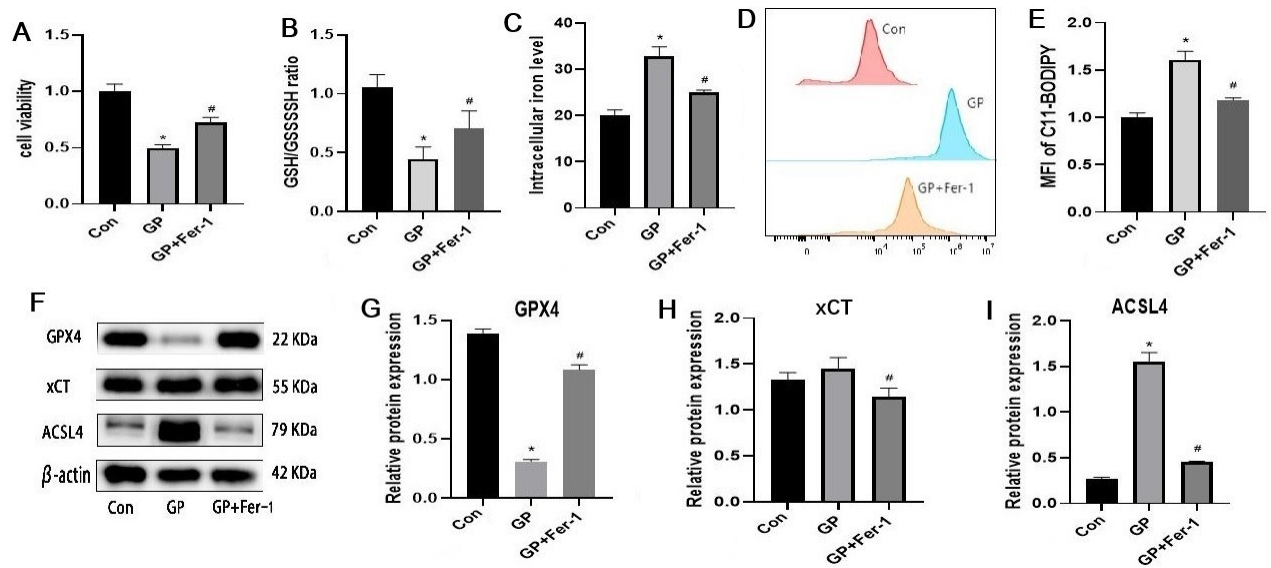


注:A 为 CCK-8 检测 MPC-5 细胞生存率的变化;B 为 GSH/GSSG 比值变化;C 为 MPC-5 细胞中铁离子浓度变化;D、E 为 BYDIPY581/591 探针检测 MPC-5 细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度;F、G、H、I 为 WB 检测 MPC-5 细胞中铁死亡相关蛋白 xCT、GPX4 和 ACSL4 表达水平;J 为 GP 孵育 0 h、12 h、24 h、36 h 细胞生存率的变化;K、L、M 为 WB 检测 GP 孵育 0 h、12 h、24 h、36 h 后,MPC-5 细胞中铁死亡相关蛋白 GPX4 和 ACSL4 表达水平。* $P<0.05$,# $P<0.05$ 。

图 1 HP、GP 诱导 MPC-5 细胞产生铁死亡

3.2 Fer-1 抑制高糖高脂诱导 MPC-5 细胞铁死亡
如图 2 所示, Fer-1 能够上调高糖高脂引起的 MPC-5 细胞活性和 GSH/GSSG 比值的降低 ($P < 0.05$, 见图 2A 和图 2B); 而下调高糖高脂引起的 MPC-5 细胞亚

铁离子浓度和脂质过氧化物水平的升高 ($P < 0.05$, 见图 2C~图 2E); 另外 Fer-1 增加 GPX4 蛋白表达, 同时下降 ACSL4 蛋白表达 ($P < 0.05$, 见图 2F~图 2I)。

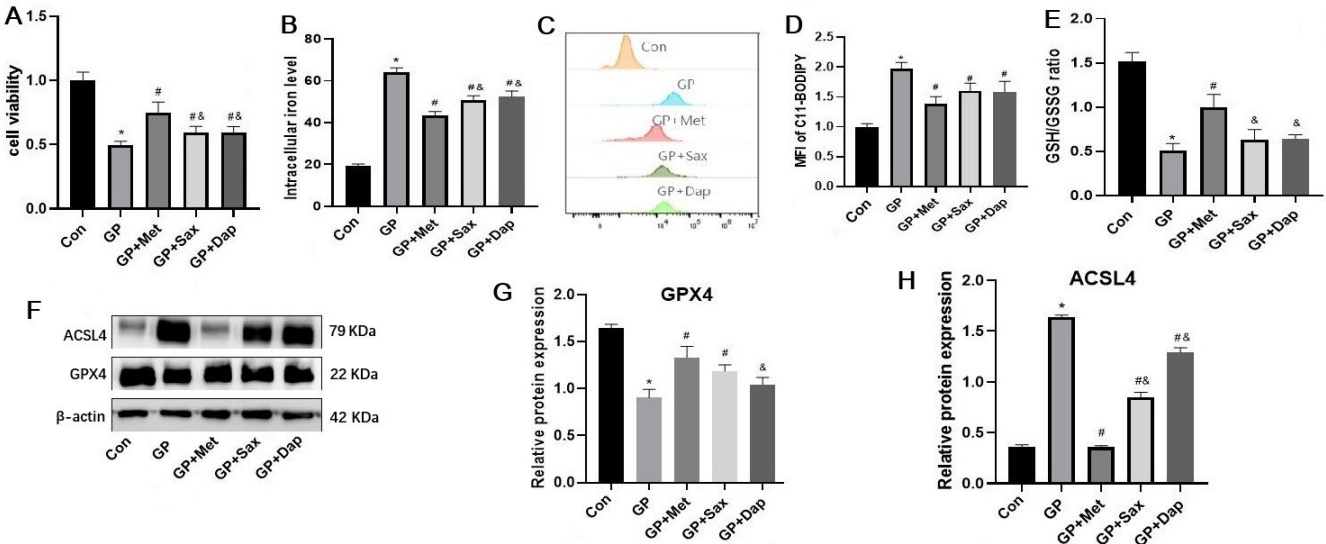


注: A 为 MPC-5 细胞分别和 GP、GP+Fer-1 共孵育 24 h 细胞活性的变化; B 为 GSH/GSSG 比值变化; C 为 MPC-5 细胞中铁离子浓度变化; D、E 为 C11-BODIPY581/591 探针检测 MPC-5 细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度; F、G、H、I 为 WB 检测细胞铁死亡相关蛋白的表达变化。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

图 2 Fer-1 抑制 GP 诱导 MPC-5 细胞铁死亡

3.3 Met 对小鼠足细胞铁死亡发挥保护作用 Met、Sax、Dap 均对高糖高脂引起的 MPC-5 细胞死亡具有保护作用(见图 3A), 同时降低 MPC-5 细胞亚铁离子浓度(见图 3B)和脂质过氧化物浓度(见图 3C、图 3D),

提高 GSH/GSSG 比值(见图 3E), 另外上调 GPX4 表达和下调 ACSL4 表达(见图 3F~图 3H), 其中 Met 的效果最强, P 均 < 0.05 。



注: A 为 CCK-8 检测在 0.5 mM Met、100 nM Sax、2 μ M Dap 和 GP 共同孵育 24 h 下 MPC-5 细胞生存率的变化; B 为铁离子浓度变化; C、D 为 C11-BODIPY581/591 探针检测 MPC-5 细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度; E 为 GSH/GSSG 比值变化; F、G、H 为 WB 检测在 3 种降糖药 2 μ M Dap、100 nM Sax、0.5 mM Met 和 GP 共同孵育 24 h 下 MPC-5 细胞中 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达情况。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$, & $P < 0.05$ 。

图 3 Met 对小鼠足细胞铁死亡发挥保护作用

4 讨论

糖尿病肾脏足细胞的抗氧化防御能力比较弱, 较容易受到氧化应激的影响而发生损伤。据文献报道, 在高糖环境中, 足细胞会发生铁死亡, 而小檗碱可以抑制铁死亡, 其机制可能与调控 NRF2/HO-1/GPX4 信号通路有关^[8]。关于高糖、高脂对足细胞的损伤作用和铁死亡效应的关联研究并不多, 有研究发现高糖、高脂可促进足细胞转化生长因子- β 和血管内皮生长因子的表达, 同时增多的转化生长因子- β 又可诱导足细胞表达血管内皮生长因子, 导致胶原产生增多, 造成肾小球基底膜增厚^[9]。慢性高血糖和血清高水平游离脂肪酸通常是导致足细胞损伤的原因^[10]。高血糖可加重脂毒性诱导的细胞功能障碍(糖脂毒性)^[11]。在本研究中, 高糖环境作用下, 并未诱导足细胞铁死亡发生, 这可能与本细胞株特性有关, 高脂诱导了足细胞铁死亡的发生, 而高糖高脂明显加重了此诱导作用。同时, 在 MPC-5 细胞中检测到铁死亡的生化特征^[12], 如铁积累、GSH/GSSG 比率降低和脂质活性氧过量产生。此外, Fer-1 具有防止活性氧蓄积和抑制脂质过氧化的作用, 是特异性铁死亡抑制剂, 其显著逆转了糖脂毒性诱导 MPC-5 细胞铁死亡的作用。这些数据表明, 铁死亡与高糖高脂诱导的 MPC-5 细胞损伤有关。

xCT 是胱氨酸/谷氨酸反向转运系统的重要组成部分, 已被证明可介导细胞外胱氨酸与细胞内谷氨酸的交换^[13]。胱氨酸进入细胞, 还原生成半胱氨酸, 然后由谷氨酸-半胱氨酸连接酶和谷胱甘肽合酶催化合成谷胱甘肽(GSH)^[14]。而 GSH 是 GPX4 降解过氧化脂质的必需反应底物。GPX4 利用 GSH 将脂质过氧化的过氧化键转化为羟基, 失去脂质过氧化活性^[15]。作为氧化应激和细胞死亡信号的感应器, GPX4 被认为是触发铁死亡程序的重要靶点, 其表达量的降低会导致体内活性氧的显著增加。因此, 抑制 GSH/GPX4 通道会引起过脂质活性氧的蓄积, 造成铁死亡现象的发生。ACSL4 是多不饱和脂肪酸代谢的重要同工酶, 通过催化以花生四烯酸为代表的多聚不饱和脂肪酸产生脂质过氧化物, 使细胞对铁死亡的敏感性提高^[16]。然而, 在糖尿病相关代谢产物影响下, MPC-5 细胞中的 xCT 表达情况是有争议的, 既有补偿性增加^[17], 也有减少^[18]的报道。在本研究中, GP 处理的 MPC-5 细胞中 xCT 表达没有显著变化, 这表明糖脂毒性诱导的足细胞铁死亡可能不是由胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白的变化引起的。xCT 表达的差异可能与不同的细胞类型和加工因子有关, 这些需要进一步研究。在本研究中, GP 促进 MPC-5 细胞死亡, 同时 MPC-5 细胞中 GPX4 的表达降低, ACSL4 的表达增加。这表明糖脂毒性诱导的足细胞铁死亡可能归因于异常表达的

GPX4/ACSL4 轴。

作为常用的降血糖药物, Met、Sax 和 Dap 已被发现具有明显的肾脏保护作用^[19-22]。然而, 目前尚不清楚这些药物的保护作用是否与抑制细胞铁死亡相关。有研究发现, Met 在高脂联合链脉菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠中, 通过抑制铁死亡, 使胰岛 β 细胞损伤得到改善^[23]。另有报道称^[24], Met 可通过减少铁死亡来改善高脂血症相关的血管钙化, 以及通过 LncRNA sox2ot/Nrf2/SLC7A11 改善细胞氧化应激和铁死亡^[25], 这些证据表明, Met 具有抑制细胞铁死亡作用。在进一步的实验中, 发现 Met、Sax 及 Dap 均降低 MPC-5 细胞亚铁离子浓度和脂质过氧化物浓度, 同时提高细胞活性, 且 Met 相较于 Sax 和 Dap 具有更强的抗铁死亡作用。GPX4 和 ACSL4 在调节细胞铁死亡中的核心作用已得到肯定^[26]。本研究结果表明, Met 通过增加 GPX4 的表达和减少 ACSL4 的表达来抑制铁死亡, 有效减轻糖脂毒性诱导细胞损伤。

综上, 本研究阐明了铁死亡在高糖高脂导致足细胞损伤中发挥的作用, Met 可能通过影响 GPX4 和 ACSL4 表达进行抗铁死亡, 进而发挥细胞保护作用, 为 DKD 的治疗提供了新的手段。本研究着眼于 Met 抑制细胞铁死亡现象研究, 但未更加深入的探究 Met、GPX4、铁死亡这三者之间深层次的联系, 有待于进行进一步的分子机制研究。

参考文献:

- [1] TEO Z L, THAM Y C, YU M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis[J]. Ophthalmology, 2021, 128(11): 1580-1591.
- [2] THOMAS M C, BROWNLEE M, SUSZTAK K, et al. Diabetic kidney disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15018.
- [3] ALICIC R Z, ROONEY M T, TUTTLE K R. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(12): 2032-2045.
- [4] 韩佳瑞, 彭紫凝, 王学艺, 等. 糖尿病肾病血瘀证大鼠铁死亡相关基因 GPX4、ACSL4 表达水平变化[J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42 (2): 78-84.
- [5] GASSLER N, ELGER M, KRÄNZLIN B, et al. Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat [J]. Kidney Int, 2001, 60(1): 106-116.
- [6] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [7] LV M, CHEN Z, HU G Y, et al. Therapeutic strategies of diabetic nephropathy: recent progress and future perspectives [J].

tives[J]. Drug Discov Today, 2015, 20(3): 332-346.

[8] 关锡梅,解勇圣,倪伟建,等. Nrf2/HO-1/GPX4 对高糖诱导足细胞铁死亡的影响及小檗碱的干预机制研究[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(3): 396-403.

[9] SAITO D, MAESHIMA Y, NASU T, et al. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(4): F873- 886.

[10] ECONOMOU C G, KITSIOU P V, TZINIA A K, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt15): 3281-3294.

[11] CIREGIA F, BUGLIANI M, RONCI M, et al. Palmitate-induced lipotoxicity alters acetyl ation of multiple proteins in clonal β cells and human pancreatic islets[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13445.

[12] CHEN X, COMISH P B, TANG D L, et al. Characteristics and biomarkers of ferroptosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 637162.

[13] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620

[14] BOTTA D, WHITE C C, VLIET-GREGG P, et al. Modulating GSH synthesis using glutamate cysteine ligase transgenic and gene-targeted mice[J]. Drug Metab Rev, 2008, 40(3): 465-477.

[15] ZHOU Y. The protective effects of cryptochlorogenic acid on β -cells function in diabetes in vivo and vitro via inhibition of ferroptosis [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 1921-1931.

[16] YANG W S, STOCKWELL B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, non-apoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. Chem Biol, 2008, 15(3): 234-245.

[17] KOULAJIAN K, IVOVIC A, YE K T, et al. Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents β -cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids *in vivo* [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 305(2): E254-E262.

[18] STANCIC A, SAKSIDA T, MARKELIC M, et al. Ferroptosis as a novel determinant of β -Cell death in diabetic conditions [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3873420.

[19] LEHTONEN S. Metformin protects against podocyte injury in diabetic kidney disease[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(12): 452.

[20] KIM J, SHON E, KIM C S, et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 210821.

[21] HU Y Y, YE S D, XING Y, et al. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal nephrin and podocin in type 2 diabetic rats[J]. Acta diabetologica, 2020, 57(3): 279-286.

[22] SUN J S, ZHANG X Y, WANG S M, et al. Dapagliflozin improves podocytes injury in diabetic nephropathy via regulating cholesterol balance through KLF5 targeting the ABCA1 signalling pathway[J]. Diabetol Metab Syndr, 2024, 16(1): 38.

[23] SUN Y, BAI Y P, WANG D G, et al. Protective effects of metformin on pancreatic β -cell ferroptosis in type 2 diabetes *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 168: 115835.

[24] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. Metformin attenuates hyperlipidaemia-associated vascular calcification through anti-ferroptotic effects[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 229-242.

[25] 李晓萌. 二甲双胍通过 LncRNA sox2ot/Nrf2/SLC7A11 改善高糖培养小鼠肾小球系膜细胞氧化应激和铁死亡[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.

[26] KRÜMMEL B, PLÖTZ T, JÖRNS A, et al. The central role of glutathione peroxidase 4 in the regulation of ferroptosis and its implications for pro-inflammatory cytokine-mediated beta-cell death[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(6): 166114.

收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2025-01-01

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:姚兆女,宋鑫,裴钰琳,等. POM121 蛋白在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 207-214.

【论著与临床报道】

POM121 蛋白在肝细胞癌中的表达及临床意义

姚兆女¹, 宋鑫¹, 裴钰琳¹, 李迪¹, 朱小年¹, 谭盛葵²

(1. 桂林医科大学公共卫生学院, 广西 桂林 541199;

2. 广西肝胆疾病临床医学研究中心, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨核孔膜蛋白 121(POM121)在肝细胞癌中的表达水平并分析其与肝细胞癌(HCC)患者临床病理参数及预后的相关性。方法 采用组织微阵列结合免疫组化技术,检测 75 例肝细胞癌组织及对应癌旁组织中 POM121 的表达水平,并分析其与患者临床病理特征的关联。此外,基于生物信息学数据库,验证 POM121 在肝细胞癌中的表达模式,并预测其潜在调控通路。体外实验通过 CCK-8、划痕实验、Transwell 实验观察 POM121 表达变化对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。结果 POM121 蛋白在肝细胞癌组织中的阳性率为 62.67%(47/75),显著高于癌旁组织 42.67%(32/75),差异有统计学意义($P < 0.05$)。POM121 的表达水平在肝细胞癌患者的肝硬化发生($\chi^2 = 5.872$, $P = 0.015$)及远处转移($\chi^2 = 6.354$, $P = 0.012$)方面差异有统计学意义。POM121 阳性的肝细胞癌患者预后更差,其生存时间低于阴性表达患者($P < 0.05$)。体外功能实验证实,POM121 过表达可促进肝细胞癌的增殖活性和侵袭能力。生物信息学数据表明,POM121 在肝细胞癌组织中呈现高表达模式,且其表达水平与患者较差的生存结局相关。潜在机制分析提示,POM121 可能影响 ERBB 信号传导和补体系统激活等关键通路。结论 肝细胞癌组织中 POM121 呈现显著高表达状态,且该蛋白的高水平表达与患者不良临床预后密切相关。POM121 可增强肝癌细胞的恶性生物学行为。

关键词:核孔膜蛋白;癌;肝细胞;免疫组化;生存预后

中图分类号:R730.261

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0207-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.003

Expression and clinical significance of POM121 protein in hepatocellular carcinoma

YAO Zhaonu¹, SONG Xin¹, PEI Yulin¹, LI Di¹, ZHU Xiaonian¹, TAN Shengkui²

(1. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China;

2. Guangxi Clinical Medical Research Center for Hepatobiliary Diseases, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression level of nuclear pore membrane protein 121 (POM121) in hepatocellular carcinoma (HCC) and analyze its correlation with the clinicopathological parameters and prognosis of HCC patients. **Methods** The expression level of POM121 in 75 HCC tissues and corresponding paracancerous tissues was detected by tissue microarray combined with immunohistochemistry, and its association with clinicopathological characteristics of patients was analyzed. In addition, based on bioinformatics databases, the expression pattern of POM121 in HCC was validated, and its potential regulatory pathways were predicted. In vitro experiments, the effects of POM121 expression changes on the proliferation, migration, and invasion of HCC cells were observed through CCK-8, scratch assay, and Transwell assays. **Results** The pos-

基金项目:广西重点研发计划项目(桂科 AB22035017、桂科 AB25069071);广西自然科学基金重点项目(2020GXNSFDA297010)

第一作者:姚兆女,硕士,研究方向:肿瘤分子流行病学,E-mail:Yaozn97@163.com

通讯作者:谭盛葵,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肿瘤分子流行病学,E-mail:sktan2008@163.com

itive rate of POM121 protein in HCC tissues was 62.67% (47/75), significantly higher than that in paracancerous tissues at 42.67% (32/75), with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The expression level of POM121 showed statistically significant differences in the occurrence of cirrhosis ($\chi^2 = 5.872$, $P = 0.015$) and distant metastasis ($\chi^2 = 6.354$, $P = 0.012$) in HCC patients. HCC patients with positive POM121 expression had a poorer prognosis, with a shorter survival time compared to those with negative expression ($P < 0.05$). In vitro functional experiments confirmed that POM121 overexpression promoted the proliferation activity and invasive ability of hepatoma cells. Bioinformatics data indicated that POM121 exhibited a high expression pattern in HCC tissues, and its expression level was associated with poorer survival outcomes in patients. Potential mechanism analysis suggested that POM121 may affect key pathways such as ERBB signaling and complement system activation. **Conclusion** POM121 is significantly highly expressed in HCC tissues, and the high expression level of this protein is closely related to the poor clinical prognosis of patients. POM121 enhances the malignant biological behavior of HCC cells.

Key words: nuclear pore membrane protein; carcinoma, hepatocellular; immunohistochemistry; survival prognosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 以下称为肝癌), 作为原发性肝癌的主要亚型, 在全球范围内是发病率排名第六、致死率位列第三的恶性肿瘤^[1]。在我国, 该疾病的致死率高居癌症相关死亡第三位, 仅次于肺癌与结直肠癌^[2], 值得注意的是, 广西地区属于肝癌高发区域, 2018 年统计数据显示, 其发病率和病死率均居各类肿瘤之首^[3]。由于 HCC 早期临床表现不典型且隐匿, 多数病例确诊时已进展至中晚期。尽管手术切除联合多学科治疗显著改善了患者的总体生存率, 但术后 5 年内肿瘤转移与复发的比例仍居高不下^[4]。因此, 寻找可用于预测肝癌临床预后的分子标志物, 仍是当前肝癌防治研究的关键方向^[5]。

核孔复合物(nuclear pore complexes, NPCs)由 30 余种核孔蛋白(nucleoporins, NUPs)组装形成的超大分子复合体, 是细胞核质交换的关键结构基础, 这些直径约 120 nm 的超分子机器在真核细胞中普遍存在, 每个哺乳动物细胞的核膜上约有 3 000~4 000 个 NPC^[6]。NPCs 不仅作为被动运输通道, 更通过其组成蛋白的动态变化参与细胞周期进程调控、转录激活、RNA 转录后加工以及表观遗传沉默等^[7-12]。核孔膜蛋白 121(pore membrane protein 121, POM121)是 NPC 的结构支架蛋白, 在脊椎动物中广泛表达^[13]。分子特征方面, POM121 是一种 121 kDa 的 I 型跨膜蛋白^[14], 由 18 个外显子编码, 含多个功能结构域, 共同构成其完整功能。N 末端含跨膜结构域维持其在核膜中的稳定性, 中部存在核膜定位信号序列, C 末端则包含特征性的苯丙氨酸-甘氨酸(FG)重复基序^[15-16]。现有研究显示, POM121 在多种恶性肿瘤(包括结直肠癌、食管鳞癌等)中呈现显著过表达现象, 其表达水平与肿瘤临床分期及转移潜能呈正相关^[17-18]。然而,

POM121 在肝细胞癌发生发展过程中的生物学功能及分子机制尚未明确, 相关研究仍存在重要空白。

为深入探讨 POM121 在肝癌中的表达特征及其临床意义, 本研究整合肝癌临床样本队列与 TCGA 多组学数据, 通过免疫组化技术系统分析 POM121 的表达特征, 结合体外细胞实验以及生物信息学方法探究其在肝癌发生发展中的分子机制, 为临床诊疗提供新的生物标志物和干预靶点。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究采用桂林医科大学附属医院病理科提供的 75 例经病理确诊的肝细胞癌组织及配对癌旁组织(距肿瘤边缘 > 5 cm)样本。纳入标准为: 18~80 岁中国汉族原发性 HCC 患者, 术前未接受放疗或化疗, 具有完整临床病理资料(包括 HBV 感染状态、血清 AFP 水平、肝硬化背景、肿瘤特征及 TNM 分期等)。本研究纳入的病例均经术后组织病理学确诊为肝细胞癌, 病理分级采用 Edmondson 分级系统评估, TNM 分期参照 AJCC(第 8 版, 2017)标准。总体生存期(overall survival, OS)作为主要观察终点, 其定义为自手术当日起至全因死亡或末次随访的时间间隔。本研究严格遵循医学伦理规范, 研究方案已获得桂林医科大学伦理委员会审批(批准编号: GLMC2014 003), 所有参与者均在充分知情的前提下签署书面知情同意文件。

1.2 免疫组化 将 75 例石蜡包埋的肝癌及癌旁组织制备为组织微阵列芯片, 步骤流程包括, 60 ℃ 烘片 2 h, 二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化(100%、95%、85%、75%), 高压柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)抗原修复。为消除内源性过氧化物酶干扰, 使用 3% H₂O₂ 室温封闭 10 min, 接着 10% 山羊血清封闭 20 min。一抗

(POM121,Novus Biologicals,美国)4℃孵育 16 h,二抗(HRP 标记聚合物)室温孵育 30 min,DAB 显色时间严格控制在 5 min 内。苏木精复染后经 1%盐酸酒精分化和流水返蓝,最终脱水封片。免疫组化染色结果采用双盲评估法(隐藏患者临床病理特征及其分组亚型),由两名病理医师独立判读。每例样本在高倍镜下随机选取 5 个视野,具体评分标准:①细胞核着色强度:0(阴性)、1(弱)、2(中等)、3(强);②阳性率:0($\leq 5\%$)、1(6%~25%)、2(26%~50%)、3(51%~75%)、4($>75\%$)。最终得分=强度评分 $\times$ 阳性率评分, ≤ 4 分为阴性表达, >4 分为阳性表达。每例样本于 400 倍镜下随机选取 5 个视野,计数 ≥ 500 个细胞。

1.3 CCK-8 实验 肝癌细胞 Hep-G2 转染 48 h 后,消化并计数,配制 1×10^4 个细胞/毫升的悬液,接种于 96 孔板(100 微升/孔),设置 3 个复孔。分别在 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 后,在相应时间段之后每孔加入 110 μ L 混合液(完全培养基:CCK-8 试剂=10:1),避光孵育 2 h,酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值。

1.4 细胞划痕实验 肝癌细胞 Hep-G2 转染 6~8 h 后更换完全培养基,使用 200 μ L 无菌枪头垂直于孔板底部制造划痕,PBS 轻柔洗涤 3 次去除悬浮细胞,更换为无血清培养基。于 0 h、24 h、48 h 和 72 h 时间点,在倒置显微镜下采集图像,使用 ImageJ 软件进行分析。

1.5 Transwell 实验 采用 Transwell 侵袭实验探究 POM121 对肝癌细胞侵袭能力的影响。Hep-G2 转染 48 h 后无血清培养基制备单细胞悬液,调整浓度至 2×10^5 个细胞/毫升。准备好 Matrigel 基质胶包被的 24 孔 Transwell 小室,下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的完全培养基上室加入 200 μ L 无血清细胞悬液。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h 后,移除上室未穿透基质胶的细胞,4%多聚甲醛固定 30 min,1%结晶紫染色 60 min。显微镜下随机选取 5 个视野进行细胞计数,取平均值。

1.6 平板克隆 转染 48 h 后消化 Hep-G2 细胞,调整密度至 500 个细胞/毫升,接种于 6 孔板(2 毫升/孔,含 10% FBS 的 DMEM 培养基)。于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 14 d,每 3 d 更换新鲜培养基。待肉眼可见克隆形成后,PBS 轻柔漂洗,4%多聚甲醛固定 30 min,1%结晶紫染色 60 min,双蒸水冲洗后室温晾干。

1.7 生物信息学 POM121 在肝癌中的表达谱数据通过 TCGA(The Cancer Genome Atlas)平台(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)获取,具体来源于 LI-HC(肝癌)的 RNA-seq 数据集(HTSeq-FPKM)。数据预处理阶段,FPKM 值(基于片段长度和测序深度

的标准化计数)被转化为 TPM(转录本每百万)值,随后进行 log₂ 转换。以 POM121 表达中位数为分界点,样本被分为高、低表达两组,并通过 Kaplan-Meier 法比较两组的总生存时间。基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)基因集均从 MSigDB(Molecular Signatures Database)获取,并利用 Broad Institute 提供的 GSEA 工具进行富集分析,以筛选具有统计学意义的基因集。参数设置为:Permutation type 为“phenotype”,Permutations 为 1 000 次。通过计算基因集富集分数(ES)、标准化富集分数(NES)及显著性水平(FDR q-value),筛选显著富集的基因集(FDR q-value <0.25)。结合富集图和热图分析基因集的功能分布,并进行生物学功能注释,以揭示 POM121 相关的潜在分子机制和通路。

1.8 统计学方法 统计处理、统计分析以及图表制作均通过使用 SPSS 28.1、R(v4.4.2)以及 GraphPad Prism(版本 8.0)完成。POM121 在肝癌与癌旁组织中的表达差异,采用 χ^2 检验进行评估。生存分析中,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并利用 Log-rank 检验评估不同组别之间总生存期的差异。此外,通过 COX 比例风险模型分析肝癌患者的独立预后因素。 $P<0.05$ 视为差异具有统计学意义。

1.9 影响因素赋值 肝癌患者的影响因素与赋值见表 1。

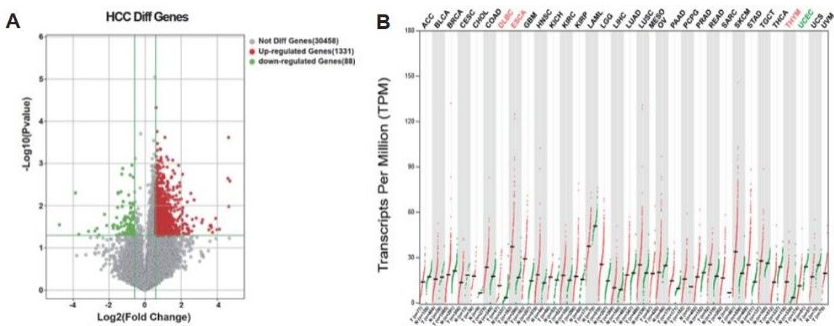
表 1 肝癌患者的影响因素与赋值

因素	变量名	赋值说明
年龄	age	$<50=0; \geq 50=1$
性别	sex	男=0;女=1
吸烟	smoking	否=0;是=1
饮酒	drinking	否=0;是=1
HBV 感染	HBV infection	阴性=0;阳性=1
AFP	AFP	$<400=0; \geq 400=1$
肝硬化	cirrhosis	否=0;是=1
家族史	family history	否=0;是=1
肿瘤数目	tumor multiplicity	单个=0;多个=1
肿瘤大小	tumor size	$<5\text{ cm}=0; \geq 5\text{ cm}=1$
病理分级	pathological grade	I+II=0;III+IV=1
TNM 分期	TNM stage	I 期=0;II~IV 期=1
远处转移	distant metastasis	否=0;是=1
POM121	pore membrane protein 121	低表达=0;高表达=1

2 结果

2.1 高通量测序筛选肝癌差异基因 收集桂林医科大学附属医院 5 例肝癌样本和 5 例癌旁样本进行 RNA-seq。通过质控,使用 R 包“DESeq2”筛选来自 HCC 组织和正常组织之间存在的差异表达基因,以 $|\log_2\text{FoldChange}|>1$ 为阈值,其中校正后 $P(\text{adj})<0.05$,找出差异表达基因 1 419 个,其中上调表达基因

1 331 个,下调表达基因 88 个,见图 1A。进一步,通过 GEPIA 在线数据库来验证上述过程中从差异基因中选出核心基因 (Hubgene),结果显示上调基因中, POM121 是一个显著上调表达的差异基因,见图 1B。



注:A 为肝癌差异基因火山图;B 为 POM121 在不同肿瘤中的表达情况。
图 1 肝癌差异表达基因筛选及 POM121 表达

2.2 POM121 蛋白在肝癌组织中的表达水平 结果显示,POM121 主要在细胞核中表达,见图 2。POM121 在肝癌中的阳性表达率为 62.75%(47/75),其表达水平显著高于癌旁组织($P=0.017$),见表 2。

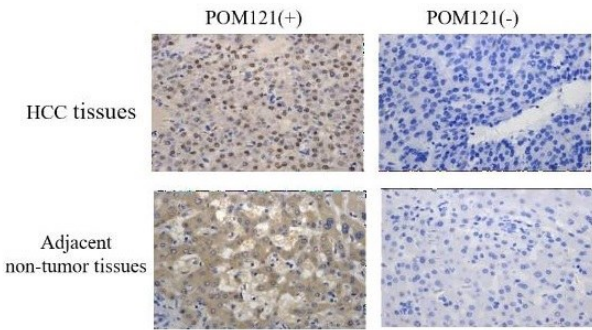


图 2 POM121 在肝癌和癌旁非癌组织中阳性和阴性表达情况(×20)

表 2 POM121 在 HCC 其癌旁组织中的表达

癌旁组织	HCC 组织		总计
	+	—	
+	22	10	32
—	25	18	43
合计	47	28	75

2.3 POM121 蛋白与肝癌患者临床病理特征的关系 结果显示,POM121 的表达在肝硬化($\chi^2=6.133$, $P=0.013$)和远处转移($\chi^2=4.118$, $P=0.042$)方面差异有统计学意义,但与患者的年龄($P=0.740$)、性别($P=0.636$)、HBV 感染($P=0.811$)、家族史($P=0.335$)差异无统计学意义,见表 3。

表 3 POM121 蛋白表达与肝癌患者临床病理特征的相关性分析

临床病理参数	n	POM121		χ^2	P
		阳性	阴性		
年龄/岁				0.111	0.740
<50	34	22	12		
≥50	41	25	16		
性别				0.244	0.636
男	61	39	22		
女	14	8	6		
饮酒				0.856	0.355
无	35	20	15		
有	40	27	13		
HBV 感染				0.057	0.811
无	15	9	6		
有	60	38	22		
家族史				0.929	0.335
无	63	38	25		
有	12	9	3		
肿瘤大小/cm				2.894	0.089
<5	39	28	11		
≥5	36	19	17		
肿瘤数目/个				0.856	0.355
单发	40	27	13		
多发(≥2)	35	20	15		
TNM 分期				0.883	0.347
T1+T2	43	25	18		
T3+T4	32	22	10		
病理分级				0.072	0.789
I+II	39	25	14		
III	36	22	14		
肝硬化				6.134	0.013
无	37	18	19		
有	38	29	9		
远处转移				4.118	0.042
无	48	26	22		
有	27	21	6		
AFP/(μg·L ⁻¹)				2.023	0.155
<400	32	23	9		
≥400	43	24	19		

2.4 POM121 蛋白与肝癌患者临床预后的关联 为了系统评估 POM121 在 HCC 中的预后价值,通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 检验比较组间差异生存分析结果表明,相比于 POM121 低表达,POM121 高表达患者术后存活时间更短,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。POM121 阳性表达与 HCC 患者预后之间存在关联。进一步,以患者生存预后作为因变量(1=死亡,0=生存),在对患者的性别和年龄进行校正的基础上,将肝硬化、远处转移以及 POM121 的表达情况作为自变量,开展 COX 比例风险模型的多因素分析。选择纳入标准为 $\alpha = 0.05$,剔除标准为 $\beta = 0.1$,结果发现 POM121 阳性表达是 HCC 患者术后不良预后的独立危险因素($P = 0.005$, $HR = 0.363$, $95\% CI : 0.180 \sim 0.731$),与肝硬化($P = 0.020$, $HR = 2.248$, $95\% CI : 1.138 \sim 4.442$)共同影响患者的术后存活时间。

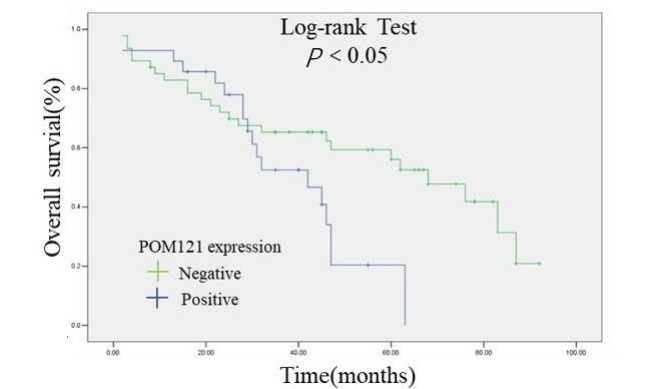


图 3 POM121 表达对肝癌患者术后总生存时间的影响

表 4 HCC 患者术后存活时间的多因素 COX 回归分析					
因素	<i>b</i>	Wald χ^2	<i>P</i>	HR	95% CI
年龄	-0.111	0.109	0.742	0.895	0.462~1.732
性别	0.208	0.189	0.664	1.231	0.482~3.144
POM121	-1.013	8.041	0.005	0.363	0.180~0.731
肝硬化	0.810	5.436	0.020	2.248	1.138~4.442
远处转移	0.618	3.245	0.072	1.855	0.947~3.635

2.5 POM121 通过公共数据库中在肝癌中的表达、预后影响 为了更全面地验证 POM121 在 HCC 中的临床相关性,本研究整合了 TCGA-LIHC 队列的数据(肝癌样本=374,正常肝组织=50)。利用 R 包“limma”差异表达分析发现:与正常肝组织相比,肝癌样本中 POM121 的表达水平显著上调($P < 0.001$),见图 4;进一步利用 survival(v3.8.3)和 survminer(v0.5.0)软件包进行生存分析显示,POM121 高表达的肝癌患者的术后总体生存时间(OS)显著降低,见图 5。

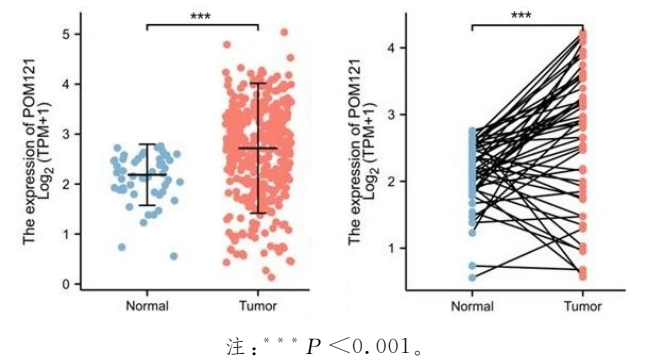


图 4 POM121 在 TCGA 数据库的独立样本(左)和匹配样本(右)中的表达差异

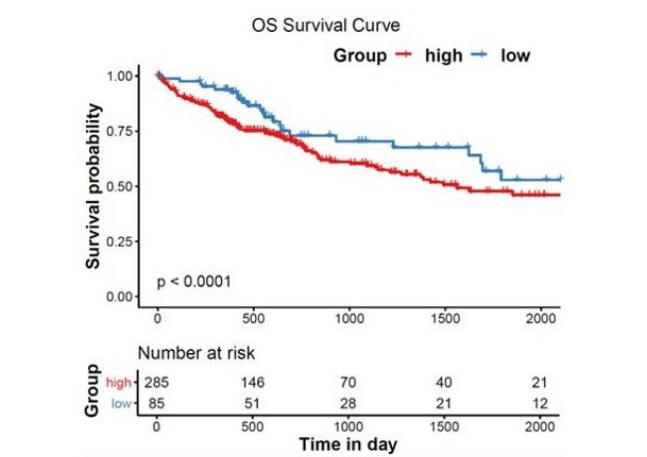
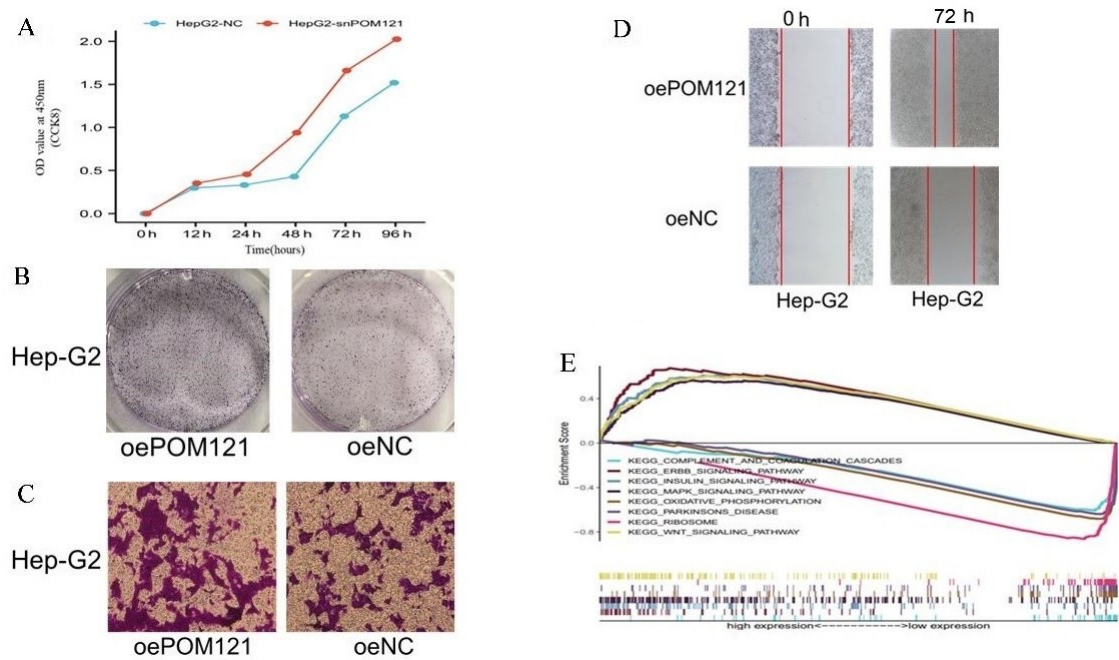


图 5 TCGA 数据库中 POM121 表达对肝癌患者术后总生存时间的影响

2.6 POM121 调控肝癌恶性进展及其通路分析 通过 CCK-8 实验,结果提示,在肝癌细胞 Hep-G2 中过表达 POM121 增殖能力明显增强,见图 6A。平板克隆实验进一步支持这一发现,证实 POM121 过表达可明显提升细胞的克隆形成能力,见图 6B。划痕实验结果显示,过表达 POM121 提高了肝癌细胞的迁移速度,见图 6C;Transwell 实验则表明该基因同时可增强了 Hep-G2 细胞的侵袭能力,见图 6D。通过基因集富集分析(GSEA),进一步探究了 POM121 调控的分子通路,见图 6E。分析发现,POM121 上调组在 ERBB 信号转导(ERBB signaling pathway)、胰岛素信号传递(insulin signaling pathway)、Wnt/ β -catenin 信号传导以及 MAPK 级联反应等通路显著富集;而 POM121 下调则与补体及凝血级联反应等通路相关。值得注意的是,这些差异通路中多个已被证实与肿瘤发生发展密切相关,提示 POM121 可能通过激活促癌信号网络驱动肝癌进展。



注:A 为 CCK-8 检测过表达 POM121 后 HCC 细胞的增殖能力;B 为平板克隆实验检测过表达 POM121 后 HCC 细胞集落形成能力;C 为 Transwell 实验检测过表达 POM121 后细胞侵袭实验;D 为过表达 POM121 后细胞划痕实验;E 为肝癌中与 POM121 相关的通路的富集情况。

图 6 肝癌中过表达 POM121 促进肝癌恶性进展

3 讨论

肝癌的发病机制呈现显著的多因素交互特征。分子流行病学研究证实,其发生发展涉及遗传易感性(如 TP53 突变)与环境暴露(如黄曲霉毒素 B1)的协同作用^[19],并表现出明显的种族差异性(亚洲人群发病率显著高于欧美)及家族聚集现象^[20]。其中,HBV/HCV 感染所致的慢性肝损伤包括肝硬化和肝纤维化被公认为是主要诱因^[21],但其具体机制尚未完全阐明。由于肝癌起病隐匿、进展迅速、复发转移率高且生存期短,其治疗一直是临床面临的重大挑战。本研究系统评估了 POM121 在 HCC 中的临床意义,揭示其表达水平与患者预后及病理特征的相关性。免疫组织化学分析显示,POM121 在肝癌组织中的表达强度较癌旁正常组织显著上调。值得注意的是,POM121 阳性表达与肝硬化和远处转移呈有关,这与肝癌的“病毒感染—肝硬化—癌变”经典致病模式高度一致,由于远处转移和肝硬化均是肝癌预后不良的重要指标^[22],这一发现提示 POM121 可能在肝癌的恶性进展中起关键调控作用,并有望成为评估肝癌发展的潜在分子标志物。

本研究通过 Kaplan-Meier 生存分析进一步证实,与 POM121 阴性患者相比,阳性组患者的生存时间显著减少。经多因素 COX 回归模型校正后,POM121 高表达状态与肝硬化被确认为影响患者预后的独立危险因素。体外功能实验(CCK-8、平板克隆、Transwell 侵

袭和划痕实验)结果表明,POM121 可促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,该发现与前列腺癌^[23]和肺癌^[24]中的研究结果一致。此外,多项临床研究证实,POM121 的表达水平在结直肠癌、喉癌以及非小细胞肺癌中高表达且与 TNM 分期显著相关^[17,25-26],证实了该基因在肿瘤发生发展中的重要作用。为进一步阐明 POM121 在肝癌发生发展中的分子机制,本研究采用基因集富集分析(GSEA)方法,系统分析了 POM121 调控的关键信号通路。POM121 作为核孔跨膜蛋白,POM121 通过与 importin/ β 结合^[27],介导 MYC、 β -catenin 等致癌因子入核,可能通过 MAPK、ERBB、氧化磷酸化等信号通路参与肝癌的恶性进展。这一发现与其他肿瘤中的研究结果相互印证。例如,在非小细胞肺癌中,H3K18 乳酸化通过激活 POM121 转录,促进 MYC 核转运及 PD-L1 表达,从而介导免疫逃逸^[28]。与非小细胞肺癌类似,肝癌的免疫逃逸可能同样受 H3K18 乳酸化调控。GSEA 显示 POM121 富集 Wnt/ β -catenin 通路,在肝癌发生发展中,异常的 Wnt/ β -catenin 信号通路会导致遗传改变和致癌作用,而 β -catenin 的核积累正是 AFP 高表达的核心驱动因素^[29]。同样的,GUAN L R 等^[26]研究发现,POM121 通过 TGF- β /SMAD 和 PI3K/AKT 通路在非小细胞肺癌中发挥致癌作用。在其他肿瘤中,POM121 可能通过调控 Hedgehog 通路和 p53 信号网络影响口腔鳞状细胞癌(OSCC)的进展,这一结论由 Haoran Ma 课

题组基于生物信息学方法得出^[30]。此外,通过 GSEA 分析,ZHAO R H 等^[25]揭示了 POM121 可能通过调控,代谢重编程中涉及的鞘脂代谢、溶酶体功能、脂肪酸代谢调控及 PPAR 信号途径,细胞器功能中溶酶体活性与核糖体生物合成,DNA 维护机制中的核苷酸切除修复系统来影响喉癌的进程。POM121 如何参与癌症的发生发展,目前研究仍不充分,未来需更深入的实验进行验证。

综上所述,本研究首次系统地证实了 POM121 在肝癌中的表达呈上调趋势,POM121 的上调与患者较差的生存预后相关且 POM121 阳性表达是肝癌预后不良的独立危险因素。POM121 与肝癌患者临床信息的综合分析以及细胞功能学实验表明 POM121 可促进肝癌细胞生长、分化和侵袭。然而,POM121 影响肝癌恶性进展的作用尚需体内外实验进一步阐明。此外,还需要进一步实验来证实 GSEA 对 POM121 功能机制初步研究的结论。未来,通过深入探讨 POM121 在肝癌恶性进展中的具体作用机制,不仅将深化对肝癌发生机制的理解,更可能为临床实践开辟新的途径,从早期筛查到精准治疗的多环节实现诊疗革新。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] ZHU Q Q, LI N, ZENG X Y, et al. Hepatocellular carcinoma in a large medical center of China over a 10-year period: evolving therapeutic option and improving survival [J]. Oncotarget, 2015, 6(6): 4440-4450.

[3] 周子寒, 李秋林, 余家华, 等. 2018 年广西恶性肿瘤流行情况及疾病负担分析[J]. 中国癌症防治杂志, 2023, 15(2): 181-189.

[4] COLAGRANDE S, INGHILESI A L, ABURAS S, et al. Challenges of advanced hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(34): 7645-7659.

[5] PIÑERO F, DIRCHWOLF M, PESSÔA M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment [J]. Cells, 2020, 9(6): 1370.

[6] LIN D H, STUWE T, SCHILBACH S, et al. Architecture of the symmetric core of the nuclear pore[J]. Science, 2016, 352(6283): aaf1015.

[7] KNOCKENHAUER K E, SCHWARTZ T U. The nuclear pore complex as a flexible and dynamic gate[J]. Cell, 2016, 164(6): 1162-1171.

[8] RODRIGUEZ-BRAVO V, MACIEJOWSKI J, CORONA J, et al. Nuclear pores protect genome integrity by assem-

bling a premitotic and Mad1-dependent anaphase inhibitor [J]. Cell, 2014, 156(5): 1017-1031.

[9] ROUGEMAILLE M, DIEPPOIS G, KISSELEVA-ROMANOVA E, et al. THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association[J]. Cell, 2008, 135(2): 308-321.

[10] TADDEI A, VAN HOUWE G, HEDIGER F, et al. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene[J]. Nature, 2006, 441(7094): 774-778.

[11] VAN DE VOSSE D W, WAN Y K, LAPETINA D L, et al. A role for the nucleoporin Nup170p in chromatin structure and gene silencing[J]. Cell, 2013, 152(5): 969-983.

[12] PASCUAL-GARCIA P, CAPELSON M. Nuclear pores as versatile platforms for gene regulation[J]. Curr Opin Genet Dev, 2014, 25: 110-117.

[13] VASU S K, FORBES D J. Nuclear pores and nuclear assembly[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(3): 363-375.

[14] YU Y X, FAROOQ M S, EBERHART MEESSEN S, et al. Nuclear pore protein POM121 regulates subcellular localization and transcriptional activity of PPAR γ [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(1): 7.

[15] MITCHELL J M, MANSFELD J, CAPITANIO J, et al. Pom121 links two essential sub complexes of the nuclear pore complex core to the membrane [J]. J Cell Biol, 2010, 191(3): 505-521.

[16] HALLBERG E, WOZNIAC R W, BLOBEL G. An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region [J]. J Cell Biol, 1993, 122(3): 513-521.

[17] WANG T Q, SUN H B, BAO Y, et al. POM121 overexpression is related to a poor prognosis in colorectal cancer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2020, 20(3): 345-353.

[18] WANG L, LI X P, ZHAO L, et al. Identification of DNA-repair-related five-gene signature to predict prognosis in patients with esophageal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2021, 27: 596899.

[19] FARAZI P A, DEPINHO R A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(9): 674-687.

[20] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.

[21] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.

[22] DESJONQUERES E, CAMPANI C, MARRA F, et al. Preneoplastic lesions in the liver: molecular insights and relevance for clinical practice[J]. Liver Int, 2022, 42(3): 492-506.

[23] RODRIGUEZ-BRAVO V, PIPPA R, SONG W M, et al.

Nuclear pores promote lethal prostate cancer by increasing POM121-driven E2F1, MYC, and AR nuclear import [J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1200-1215, e20.

[24] ZHANG S D, ZHENG C J, LI D, et al. Clinical significance of POM121 expression in lung cancer[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2020, 24(12): 819-824.

[25] ZHAO R H, TANG G X, WANG T Q, et al. POM121 is a novel marker for predicting the prognosis of laryngeal cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(11): 1285-1293.

[26] GUAN L R, ZHANG L L, WANG T Q, et al. POM121 promotes proliferation and metastasis in non-small-cell lung cancer through TGF- β /SMAD and PI3K/AKT pathways[J]. *Cancer Biomark*, 2021, 32(3): 293-302.

[27] RASALA B A, RAMOS C, HAREL A, et al. Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(9): 3982-3996.

[28] ZHANG C, ZHOU L J, ZHANG M Y, et al. H3K18 lactylation potentiates immune escape of non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(21): 3589-3601.

[29] XU C R, XU Z, ZHANG Y, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154515.

[30] MA H R, LI L J, JIA L Z, et al. POM121 is identified as a novel prognostic marker of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2019, 10(19): 4473-4480.

收稿日期: 2025-02-06; 修回日期: 2025-03-09
(本文编辑 覃洪含)

(上接第 199 页)

[16] MU M, ZUO S, WU R M, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation *via* inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4107-4115.

[17] ZHAO Y Q, DENG X W, XU G Q, et al. Mechanical homeostasis imbalance in hepatic stellate cells activation and hepatic fibrosis [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1183808.

[18] 赵卫华, 王燕红, 丛敏. TGF- β 1/Smads 信号通路在肝脏纤维化中的作用研究进展[J]. *肝脏*, 2016, 21(10): 877-879.

[19] 周林华, 陈晓. 栀子苷通过 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制肝纤维化和肝星状细胞活化[J]. *生理学报*, 2022, 8(2): 217-224.

[20] LI H G, YOU P T, XIA Y, et al. Yu Gan long ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/AKT, ras/ERK and JAK1/STAT3 signaling pathways in CCl₄-induced liver fibrosis rats[J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3): 539-547.

[21] 冯健愉, 朱玉山, 陈佳, 等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(8): 1477-1489.

[22] BADR G, SAYED E A, WALY H, et al. The therapeutic mechanisms of *Propolis* against CCl₄-mediated liver injury by mediating apoptosis of activated hepatic stellate cells and improving the hepatic architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF- β /Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(2): 301-322.

[23] 韩蕾, 林姗姗, 王帅, 等. 中药靶向干预 PI3K/Akt 通路治疗纤维化机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(3): 180-185.

收稿日期: 2025-01-03; 修回日期: 2025-02-15
(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:薛子晗,高佳丰,涂丽,等. EGFR 通过 AKT/c-Jun 途径上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 215-224.

【论著与临床报道】

EGFR 通过 AKT/c-Jun 途径上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性

薛子晗, 高佳丰, 涂丽, 刘洋, 于滢, 唐小龙
(安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001)

摘要:目的 探究表皮生长因子受体(EGFR)在肝癌细胞对索拉非尼(SFB)敏感性中的作用及其与程序性死亡配体-1(PD-L1)的关系。方法 采用 SFB 单独处理 Hep3B 细胞以及 SFB 与表皮生长因子(EGF)联合处理 Hep3B 细胞, 并通过 CCK-8、克隆形成实验、EdU 染色、JC-1 染色等方法分析 SFB 和 EGF 对 Hep3B 细胞增殖能力的影响。采用基因敲低技术敲低 EGFR 验证 EGFR 对 Hep3B 细胞增殖能力的调控作用。通过 WB、免疫荧光实验分析 EGFR 与 PD-L1 的关系。应用 MK2206(AKT 抑制剂)揭示 EGFR 上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对 SFB 敏感性的分子机制。结果 SFB 能够抑制 Hep3B 细胞增殖并促进其凋亡, 而 EGF 激活 EGFR 后, 能够降低 Hep3B 细胞对 SFB 敏感性, 具体表现为细胞活力增加、增殖能力增强、凋亡水平降低。相反, EGFR 敲低可提高细胞对 SFB 敏感性。EGFR 活化能上调 PD-L1 表达, EGFR 敲低则降低其表达。过表达 PD-L1 会降低 Hep3B 细胞对 SFB 敏感性, 下调 PD-L1 则提高敏感性。EGFR 可能位于 AKT 和 c-Jun 的上游, 通过调控 AKT 和 c-Jun 的磷酸化来上调 PD-L1 表达。结论 EGFR 通过 AKT/c-Jun 途径上调 PD-L1, 从而降低肝癌 Hep3B 细胞对 SFB 的敏感性。

关键词: 癌, 肝细胞; EGFR; AKT/c-Jun; 索拉非尼; 程序性死亡配体-1

中图分类号: R730.261

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0215-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.004

EGFR upregulates PD-L1 via the AKT/c-Jun pathway to reduce the sensitivity of Hep3B cells to Sorafenib

XUE Zihan, GAO Jiafeng, TU Li, LIU Yang, YU Ying, TANG Xiaolong

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of epidermal growth factor receptor (EGFR) in the sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cells to Sorafenib (SFB) and its relationship with programmed death ligand-1 (PD-L1). **Methods** Hep3B cells were treated with SFB alone or a combination of SFB and epidermal growth factor (EGF). The effects of SFB and EGF on the proliferation ability of Hep3B cells were analyzed by methods such as CCK-8 assay, colony formation assay, EdU staining, and JC-1 staining. Gene knockdown technology was employed to knock down EGFR and verify its regulatory role in the proliferation of Hep3B cells. The relationship between EGFR and PD-L1 was analyzed through Western Blot (WB) and immunofluorescence assays. MK2206 (an AKT inhibitor) was applied to reveal the molecular mechanism by which EGFR upregulates PD-L1 and reduces the sensitivity of Hep3B cells to SFB. **Results** SFB inhibited the proliferation of Hep3B cells and promoted their apoptosis. After activation of EGFR by EGF, the sensitivity of Hep3B cells to SFB was reduced, as evidenced by increased cell viability, enhanced proliferation capacity, and decreased apoptosis levels. Conversely, EGFR knockdown increased cell sensitivity to SFB. EGFR activation upregulated PD-L1 expression, while EGFR knockdown reduced its expression. Overexpression of PD-L1 decreased the

基金项目: 国家自然科学基金项目(82071862); 国家级大学生创新训练项目(202310361120)

第一作者: 薛子晗, 大学生, E-mail: xuezihan12122023@163.com

通讯作者: 唐小龙, 博士, 教授(三级), 博士研究生导师, 研究方向: 肿瘤学, E-mail: txljd2006@126.com

sensitivity of Hep3B cells to SFB, whereas downregulation of PD-L1 increased sensitivity. EGFR may be upstream of AKT and c-Jun, and may upregulate PD-L1 expression by regulating the phosphorylation of AKT and c-Jun. **Conclusion** EGFR upregulates PD-L1 via the AKT/c-Jun pathway, thereby reducing the sensitivity of HCC Hep3B cells to SFB.

Key words: carcinoma, hepatocellular; EGFR; AKT/c-Jun; Sorafenib; programmed death ligand-1

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌中的常见类型,在全球癌症相关死亡病因中位列第三,其具有较高的治疗失败率和不良预后风险,多数患者在确诊时已处于晚期,这使得治疗手段受到很大限制^[1-3]。索拉非尼(sorafenib, SFB)作为晚期 HCC 的一线治疗药物,主要通过抑制 RAF/MEK/ERK 信号通路直接抑制肿瘤生长,并且通过抑制血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)和血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)来阻碍肿瘤新生血管形成,间接抑制肿瘤细胞的生长^[4]。然而,在临床实践中, HCC 患者对索拉非尼耐药现象极为普遍,耐药产生后,药物疗效显著降低^[4-5]。因此,探索提高肝癌细胞对索拉非尼敏感性的途径成为当前肝癌研究领域的关键任务。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为一种跨膜糖蛋白,在多种恶性肿瘤中呈现过度表达的状态,其主要功能为促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,常被视为原癌基因^[6]。大量研究表明^[6], EGFR 过表达不仅与包括 HCC 在内的癌症发病风险升高相关,而且与肿瘤耐药性的产生密切相关。有的研究表明,免疫检查点分子程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)不仅在肿瘤免疫逃逸过程中发挥关键作用,还与肿瘤耐药性密切相关^[7]。PD-L1 可通过激活多种代偿性信号通路,削弱索拉非尼对关键信号传导(如 RAF/MEK/ERK 等)的抑制效果,从而降低肝癌细胞对索拉非尼的敏感性^[7-8]。尽管 EGFR、PD-L1 在肿瘤发生发展中的重要性已被证实,但它们与 HCC 对索拉非尼耐药之间的关系仍不明确。本研究旨在分析 EGFR 与 PD-L1 的相关性,深入探讨 EGFR 通过上调 PD-L1 降低肝癌细胞对索拉非尼敏感性的分子机制,进而寻找提高肝癌细胞索拉非尼敏感性的方法,为肝癌的治疗提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 Hep3B 肝癌细胞购自武汉赛维尔生物科技有限公司,使用含 10% 胎牛血清(杭州四季青生物有限公司)的 RPMI-1640 培养基(上海碧云天生物技术有限公司)进行培养,细胞培养条件设定为 37℃、5% CO₂ 的培养箱环境。

1.2 慢病毒转染 为敲低目标基因 EGFR(NM_005228.3),由上海生工生物技术有限公司构建并验证了 shEGFR 慢病毒载体,其中 shRNA1(3753):5'-CCGGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTCGAGTTATTGAACATCCTCTGGAGGTTTTTTTG-3'; shRNA2(3753):5'-CCGGGCTGGATGATAGACGCAGATACTCGAGTATCTGCGTCTATCATCCAGCTTTTTTG-3'; shRNA3(3755):5'-CCGGGCCACAAAGCAGTGAATTTATCTCGAGATAAATTCAGTGC TTTGTGGCTTTTTTTTG-3'; shNC 为阴性对照。由上海生工生物技术有限公司构建并验证了 shPD-L1 慢病毒载体的序列 shRNA1(3166):5'-CCGGCGAATTACTGTGAAAGTCAATCTCGAGATTGACTTTCACAGTAATTCGTTTTTTTG-3'; shRNA2(3167):5'-CCGGGCTGCACTAATTGTCTATTGGCTCGAGCCAATAGACAATTAGTGCAGCTTTTTTTTG-3'; shRNA3(3168):5'-CCGGGGATCCAGTCACCTCTGAACACTCGAGTGTTTCAGAGGTGACTGGATCTTTTTTTTG-3'; shNC 为阴性对照。将 Hep3B 细胞接种于 6 孔板内,根据细胞数量和病毒滴度计算所需的病毒液体积并进行细胞转染。转染 72 h 后,提取细胞蛋白质,通过 Western Blot 分别筛选出 EGFR 和 PD-L1 敲低效果最佳的细胞用于后续实验。

1.3 Western Blot 采用 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)从细胞中提取蛋白,将提取的蛋白与上样缓冲液按 4:1 的比例混合,于沸水中加热 20 min 制得蛋白样品。把定量后的样品加入 10% SDS-PAGE 凝胶的上样孔,进行电泳分离。分离后,将凝胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜,在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。将膜置于一抗[EGFR 抗体(#4267)、p-EGFR 抗体(#3777)、PD-L1 抗体(#13684)、cleaved caspase-3 抗体(#9664)、caspase-3 抗体(#9662)、cleaved caspase-9 抗体(#9509)、caspase-9 抗体(#9502)、p-AKT 抗体(#4060)、AKT 抗体(#9272)、p-c-Jun 抗体(#3270)、c-Jun 抗体(#9165)、β-actin 抗体(#4970)],以上抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司,4℃ 孵育过夜,次日将膜置于二抗中,室温孵育 1 h。最后,在 PVDF 膜上添加发光液,利用全自动凝胶成像分析系统检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件对蛋白条

带灰度值进行分析。

1.3.1 检测 EGFR 活化水平和 PD-L1 表达水平 将 Hep3B 细胞接种于培养皿内,待细胞铺满皿底后,在 EGF 组培养皿的培养液中加入浓度为 100 ng/mL 的 EGF(GMP 10605 HNAE,北京义翘神州科技股份有限公司),对照组不做处理,37 °C 继续培养 20 min 后,分别提取 EGF 组与对照组蛋白,进行蛋白质免疫印迹,检测 EGFR 活化水平和 PD-L1 表达水平。

1.3.2 检测 EGFR 低表达的 Hep3B 细胞的 PD-L1 表达水平 按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR),对这两组细胞分别采用 3.5 μM SFB 处理,提取蛋白后检测 PD-L1 表达水平。

1.3.3 检测细胞凋亡分子 按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞、PD-L1 过表达细胞(PD-L1-OE)、PD-L1 敲低细胞(shPD-L1),阴性对照组细胞分为 2 组,1 组不处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,PD-L1 过表达细胞采用 3.5 μM SFB 处理,分别提取蛋白后检测 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达水平。

1.3.4 检测细胞信号通路关键分子活化水平 将 Hep3B 细胞接种于培养皿内,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理后再使用 AKT 抑制剂(MK2206)处理,提取蛋白后检测 AKT、c-Jun 活化水平和 PD-L1 表达水平。按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR),阴性对照组细胞分成 2 组,1 组不做处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,EGFR 敲低组细胞采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,提取蛋白后检测 AKT、c-Jun 活化水平和 PD-L1 表达水平。

1.4 CCK-8 实验

1.4.1 检测细胞 IC₅₀ 将 Hep3B 细胞接种于 96 孔板,每孔约 4×10^3 个细胞,分为 5 组,每组分别采用 1 μM、2 μM、4 μM、8 μM、16 μM 的索拉非尼(Medchem Express 公司)进行处理。24 h 后,弃去孔内原培养基,每孔滴加 100 μL 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)。继续培养 2 h 后,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度值,并通过 GraphPad Prism 8.0 软件计算 IC₅₀ 值。

1.4.2 检测 EGF 活化后细胞活力 将 Hep3B 细胞接种于 96 孔板,每孔约 4×10^3 个细胞,分为 2 组,EGF 组在细胞培养液中加入浓度为 100 ng/mL 的 EGF,对照组不进行处理。24 h 后,弃去孔内原培养基,每孔添加 100 μL 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)。继续培养 2 h 后,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度值,分析细胞活力。

1.4.3 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞活力的比较

将阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)分别接种于 96 孔板,2 组同时采用 100 ng/mL 的 EGF 处理 24 h,其他步骤同 1.4.2。

1.4.4 索拉非尼处理后阴性对照组与 PD-L1 过表达组细胞活力的比较 将阴性对照组细胞(shNC)与 PD-L1 过表达组细胞(PD-L1-OE)分别接种于 96 孔板,将对照组细胞再分为 2 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理 24 h,同时 PD-L1 过表达组细胞采用 3.5 μM SFB 处理 24 h,其他步骤同 1.4.2。

1.5 EdU 增殖实验

1.5.1 分析 EGF 活化后细胞增殖能力 将 Hep3B 细胞接种于 24 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理,培养 24 h 后,更换为含 10 μM EdU(上海碧云天生物技术有限公司)的培养液。37 °C 孵育 2 h 后去除培养基,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,Triton X-100(安徽美仑生物科技有限公司)透化细胞 15 min。然后加入 Click 反应液孵育 30 min,用 DAPI 染液染核 10 min。最后在倒置荧光显微镜下检测。

1.5.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞增殖能力的比较 将 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)接种于 24 孔板,分为 2 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,其他步骤同 1.5.1。

1.6 克隆形成实验

1.6.1 分析 EGF 活化后细胞克隆形成能力 将 Hep3B 细胞以每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理。定期换液,2 周后去除培养液,先后用 4%多聚甲醛固定细胞 10 min 和 1%结晶紫染色 15 min,清洗后拍照记录克隆团数量。

1.6.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞克隆形成能力的比较 将阴性对照组细胞和 EGFR 敲低组细胞接种于 6 孔板,分别采用 3.5 μM SFB 处理,其他步骤同 1.6.1。

1.7 线粒体膜电位检测

1.7.1 分析 EGF 活化后细胞凋亡水平 将 Hep3B 细胞以每孔约 2×10^5 个细胞接种于 24 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理,24 h 后弃去药液,经 PBS 洗涤后,加入 JC-1 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)避光孵育 30 min。后用 DAPI 染液染核 10 min。最后,在荧光显微镜下检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件分析细胞荧光强

度。

1.7.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞凋亡水平的比较 将阴性对照组细胞和 EGFR 敲低组细胞接种于 24 孔板,分别采用 3.5 μM SFB 处理,其他步骤同 1.7.1。

1.8 间接免疫荧光 将 Hep3B 细胞、阴性对照组细胞(shNC)、EGFR 敲低组细胞(shEGFR)接种于含有盖玻片的 24 孔板,阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)分别用 100 ng/mL 的 EGF 处理 20 min,用 4%多聚甲醛固定 10 min。进行封闭处理后,加入一抗并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,添加荧光标记二抗并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。经 DAPI 复染细胞核后,在荧光显微镜下检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件分析细胞荧光强度。

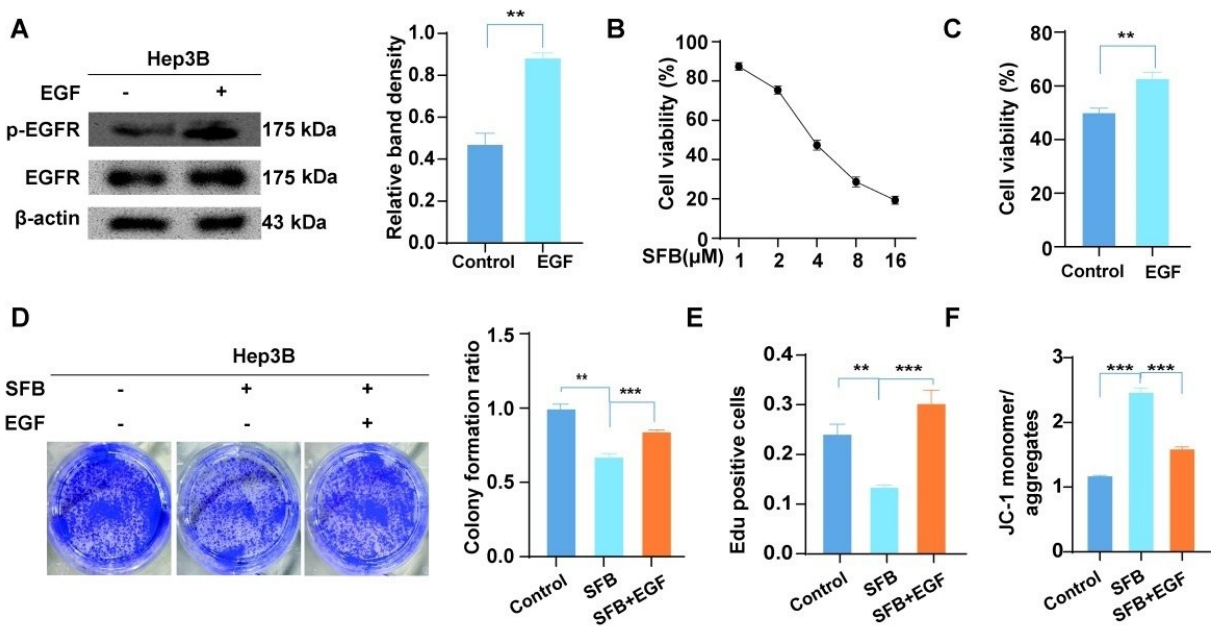
1.9 统计学方法 所有实验至少重复 3 次,数据以($\bar{x}\pm s$)的形式表示,并使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。两组数据间的差异通过 t 检验进行比较,而多组数据间的差异则通过单因素方差分析以及 Bonferroni 检验进行比较。 $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EGFR 活化降低 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

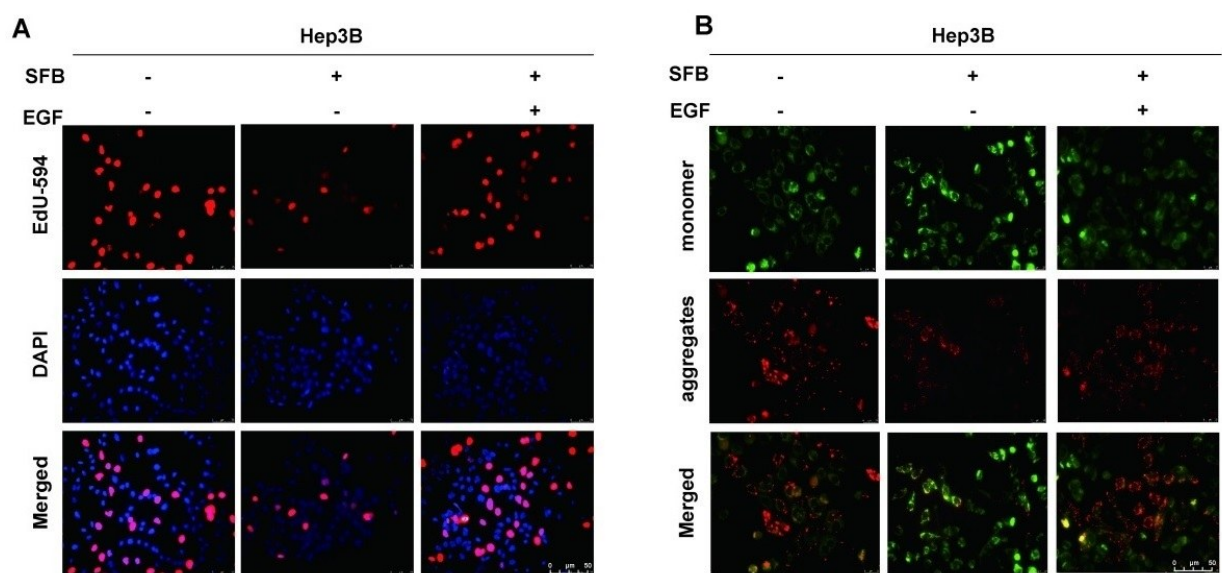
EGFR 与 EGF 结合后会形成二聚体并磷酸化,如图 1A 所示,用 EGF 处理 Hep3B 细胞,使 Hep3B 细胞中的 EGFR 显著活化为 p-EGFR。然后,使用不同浓度 SFB 处理 Hep3B 细胞,通过 CCK-8 实验检测细胞活

力,IC₅₀ 为 3.39 μM (见图 1B)。因此,本研究采用与 IC₅₀ 相近的 SFB 浓度来进行后续实验。用 3.5 μM SFB 分别处理 Hep3B 细胞(Control 组)和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞(EGF 组)24 h 后检测细胞活力。结果表明,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞活力更高, SFB 处理的 Hep3B 细胞活力具体数值为 50.62%, EGFR 活化的 Hep3B 细胞活力为 63.13%,差异具有统计学意义($P<0.01$)(见图 1C)。通过 EdU 和克隆形成实验分析 SFB 处理后 Hep3B 细胞和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞增殖能力差异。结果显示,与 Control 组 Hep3B 细胞相比,SFB 处理后 EdU 阳性细胞数量减少,克隆团数量减少($P<0.01$)。与 SFB 单独处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞 EdU 阳性细胞量增多,克隆团数量也增多($P<0.001$)(见图 1D、图 1E)。评估 SFB 诱导 Hep3B 细胞和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞的凋亡水平。检测细胞线粒体膜电位结果显示,与 Hep3B 细胞相比,SFB 处理后 Hep3B 细胞的绿色荧光/红色荧光比值增大。具体比值:Hep3B 细胞为 1.193,SFB 处理后为 2.473,差异具有统计学意义($P<0.001$)。与 SFB 单独处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞绿色荧光/红色荧光比值减小。EGF 联合 SFB 处理为 1.617,差异具有统计学意义($P<0.001$)(见图 1F)。EGFR 活化后细胞免疫荧光结果见图 2A、图 2B。



注:A 为 Western Blot 检测 EGFR 活化水平;B、C 为 CCK-8 实验检测细胞活力;D 为克隆形成实验分析细胞增殖能力;E 为 EdU-594 分析细胞增殖能力;F 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平。 $** P<0.01$, $*** P<0.001$ 。

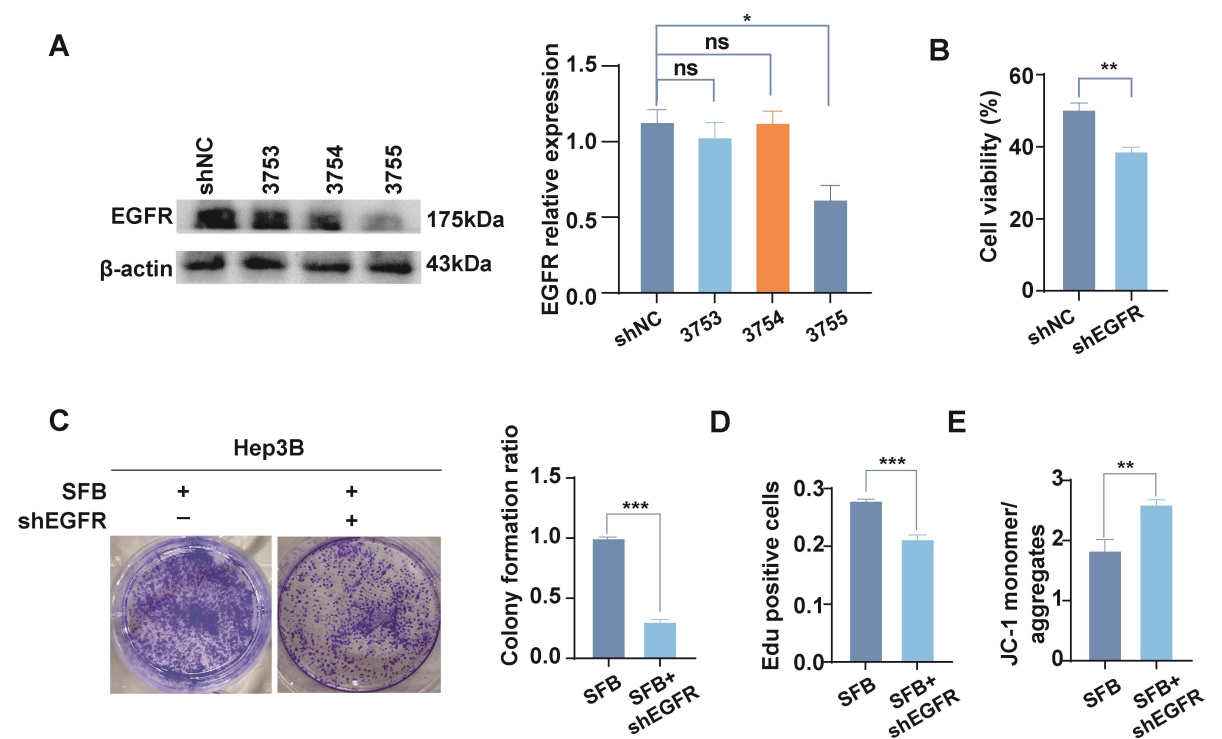
图 1 EGFR 活化降低 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性



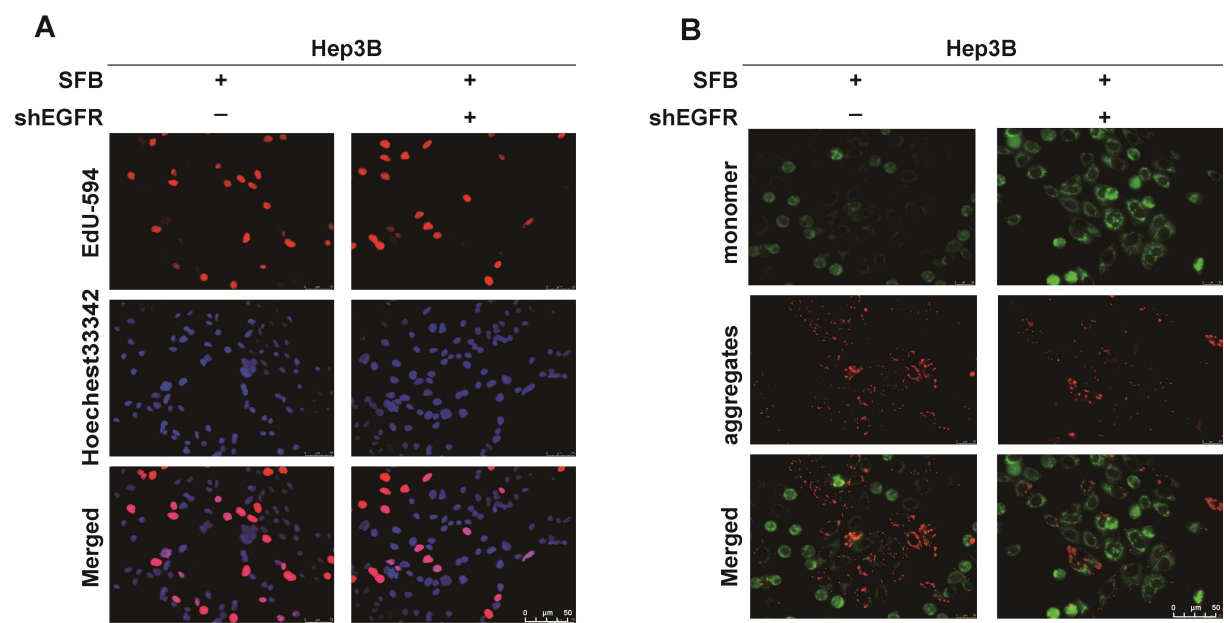
注：A 为 EdU-594 分析细胞增殖能力的免疫荧光；B 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平的免疫荧光。
图 2 EGFR 活化后细胞免疫荧光结果

2.2 EGFR 敲低提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

通过 Western Blot 检测显示 shRNA3 成功敲低肝癌细胞中 EGFR，建立 EGFR 低表达的 Hep3B 细胞 (Hep3BEGFR⁻)，见图 3A。CCK-8 实验检测索拉非尼对 EGF 处理的 Hep3B 细胞活力的影响，结果表明 EGFR 敲低后 Hep3B 细胞 (shEGFR) 的活力降低 ($P < 0.01$)，见图 3B；克隆形成实验结果 (见图 3C) 与 EdU-594 分析细胞增殖能力 (见图 3D) 均显示 EGFR 敲低后细胞增殖能力下降 ($P < 0.001$)。JC-1 染色评估 SFB 诱导肝癌细胞凋亡水平 (见图 3E)，表明 EGFR 敲低后 SFB 诱导肝癌细胞凋亡水平增加 ($P < 0.01$)。EGFR 敲低后细胞免疫荧光结果见图 4A、图 4B。



注：A 为 Western Blot 检测 EGFR 表达水平；B 为 CCK-8 实验检测细胞活力；C 为克隆形成实验分析细胞增殖能力；D 为 EdU-594 分析细胞增殖能力；E 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平。 $* P < 0.05$ ， $** P < 0.01$ ， $*** P < 0.001$ 。
图 3 EGFR 敲低提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性



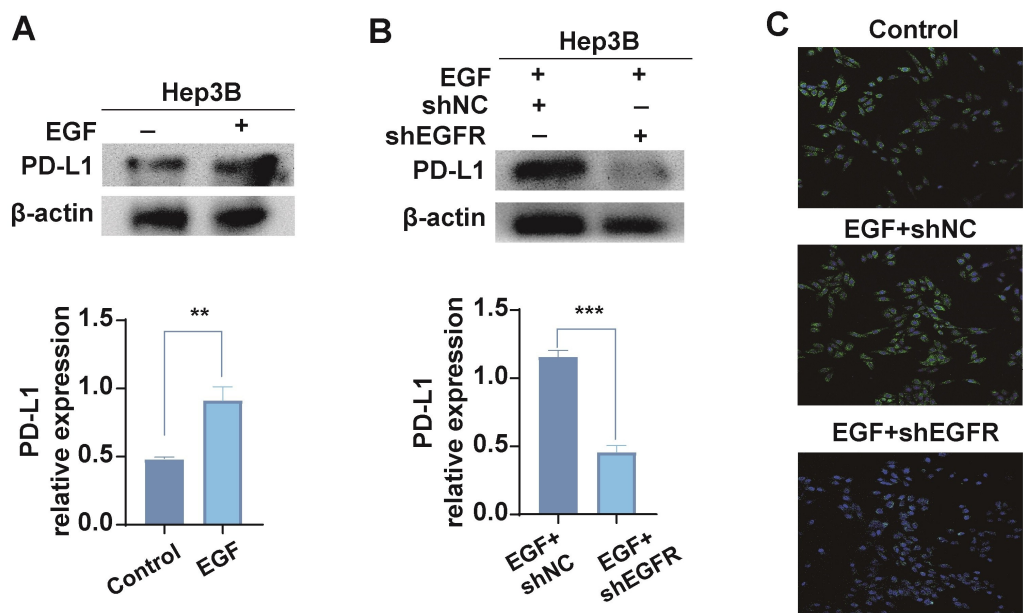
注:A 为 EdU-594 分析细胞增殖能力的免疫荧光;B 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平免疫荧光。

图 4 EGFR 敲低后细胞的免疫荧光结果

2.3 经 EGF 活化的 EGFR 使 PD-L1 表达上调

Western Blot 结果显示, 未经 EGF 处理的 Hep3B 细胞中 PD-L1 的相对表达量为 0.585, 而 EGF 处理后增至 0.932, EGF 处理后 Hep3B 细胞中 PD-L1 的表达水平显著上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 5A), 表明 EGF 处理后 Hep3B 细胞中 PD-L1 的表达水平显著上调; Hep3B EGFR 敲低后 Hep3B 细胞的

PD-L1 表达水平相对于未经 EGF 处理的 Hep3B 细胞显著下降 ($P < 0.001$) (见图 5B)。间接免疫荧光实验结果显示, 与 EGF 未处理组相比, EGF 处理的 Hep3B 细胞中 PD-L1 表达水平显著上调; 而 EGF 处理的 Hep3B EGFR-细胞中 PD-L1 显著低于 EGF 未处理的和 EGF 处理的 Hep3B 细胞, 见图 5C。



注:A、B 为 Western Blot 检测 PD-L1 表达水平;C 为免疫荧光检测 PD-L1 表达水平。

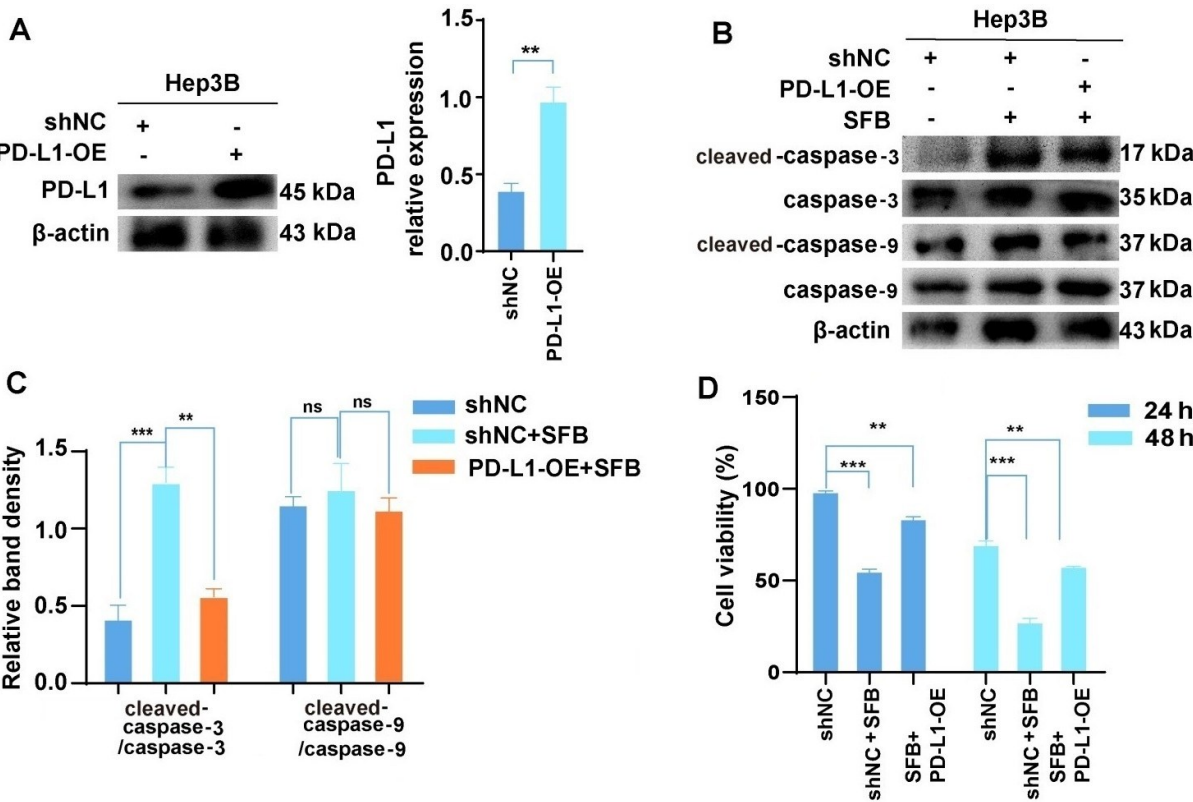
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 EGFR 活化上调 PD-L1

2.4 PD-L1 负调控 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

为探究 PD-L1 对 Hep3B 细胞索拉非尼敏感性的影响,向 Hep3B 细胞中转染了 PD-L1 过表达慢病毒(上海生工生物技术有限公司),得到了稳定过表达 PD-L1 的 Hep3B 细胞(见图 6A)。为进一步分析 PD-L1 对 SFB 介导细胞凋亡水平的影响,通过 Western Blot 检测 SFB 处理后各组 Hep3B 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3, cleaved-caspase-9/caspase-9 的表达水平。结果显示,与未经 SFB 处理的 Hep3B 细胞相比,SFB 处理的 Hep3B 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 显

著升高 ($P < 0.001$);而与 SFB 处理的 Hep3B 细胞相比,SFB 处理的 Hep3B PD-L1 + 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 显著下降 ($P < 0.01$),且与未经 SFB 处理的 Hep3B 细胞无明显差异;3 组细胞中的 cleaved-caspase-9/caspase-9 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(见图 6B、图 6C)。通过 CCK-8 实验检测未处理的 Hep3B 细胞、SFB 处理的 Hep3B 细胞以及 SFB 处理的 PD-L1 过表达 Hep3B 细胞活力值,PD-L1 负调控 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性,见图 6D。



注:A 为 Western Blot 检测 PD-L1 表达水平;B、C 为 Western Blot 检测凋亡蛋白活化水平;
D 为 CCK-8 实验检测细胞活力。 $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。

图 6 过表达 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性

2.5 下调 PD-L1 提高 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性

为进一步验证 PD-L1 与 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性之间的关系,需要从相反的方向进行实验,使用 PD-L1 敲低的 shRNA 慢病毒下调 PD-L1,观察肝癌细胞对索拉非尼敏感性的变化。首先通过 shRNA (3168)慢病毒转染构建了低表达 PD-L1 的 Hep3B 细胞(Hep3B PD-L1-)(见图 7A)。Western Blot 结果显示,SFB 处理的阴性对照组细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 水平显著高于 shNC 组细胞 ($P < 0.05$);SFB 处理的 PD-L1 低表达的细胞(shPD-L1)中 cleaved-caspase-3/caspase-3 水平显著高于 SFB 处理的阴性对照组 ($P < 0.001$)(见图 7B);而 cleaved-caspase-9/caspase-9 的结果与此相反(见图 7B)。

2.6 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达水平

与 Hep3B 细胞相比,经 EGF 处理的 Hep3B 细胞 p-AKT ($P < 0.001$)和 p-c-Jun ($P < 0.05$)的水平显著升高,同时 PD-L1 的表达也明显上调 ($P < 0.001$);当采用 AKT 抑制剂(MK2206)与 EGF 联合处理时,相较于仅用 EGF 处理的 Hep3B 细胞,Hep3B 细胞中的 p-AKT ($P < 0.001$)和 p-c-Jun ($P < 0.05$)水平显著下降,见图 8A。为进一步验证 EGFR 与 AKT、c-Jun 及 PD-L1 之间的关系,与 EGF 处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 处理的 Hep3B EGFR-细胞中的 p-AKT ($P < 0.01$)以及 p-c-Jun ($P < 0.05$)水平均显著下调,PD-L1 表达水平也下调 ($P < 0.001$),见图 8B。

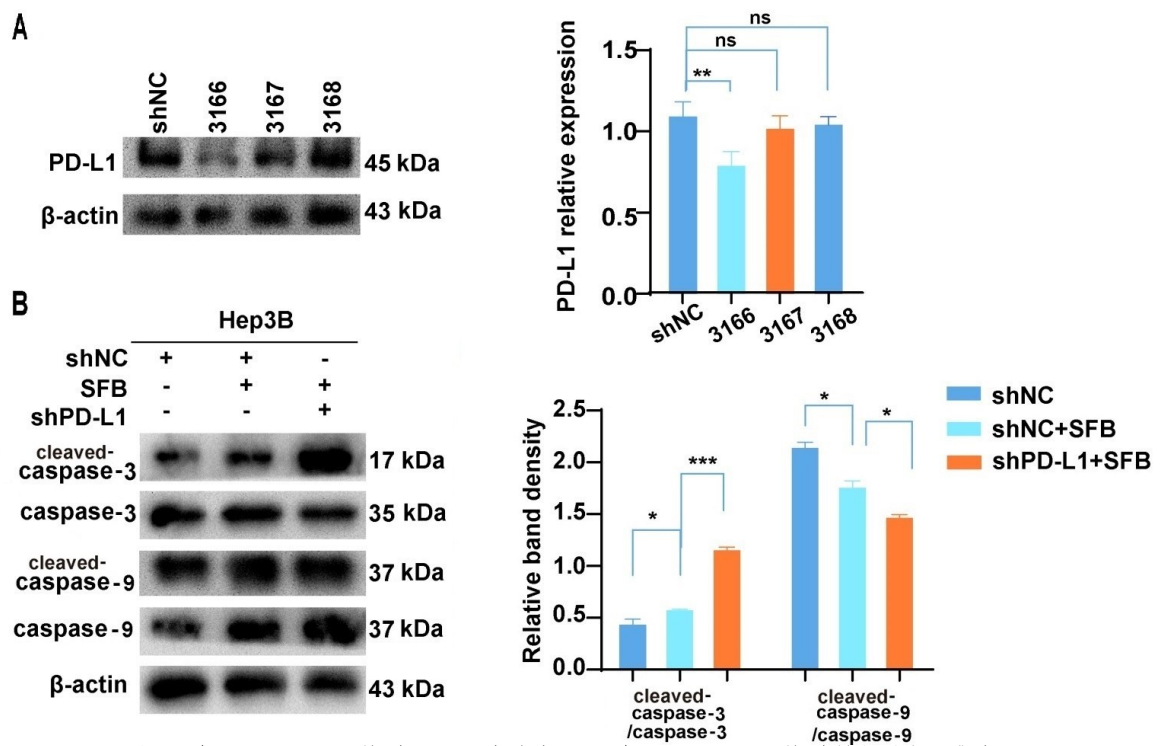


图 7 下调 PD-L1 提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

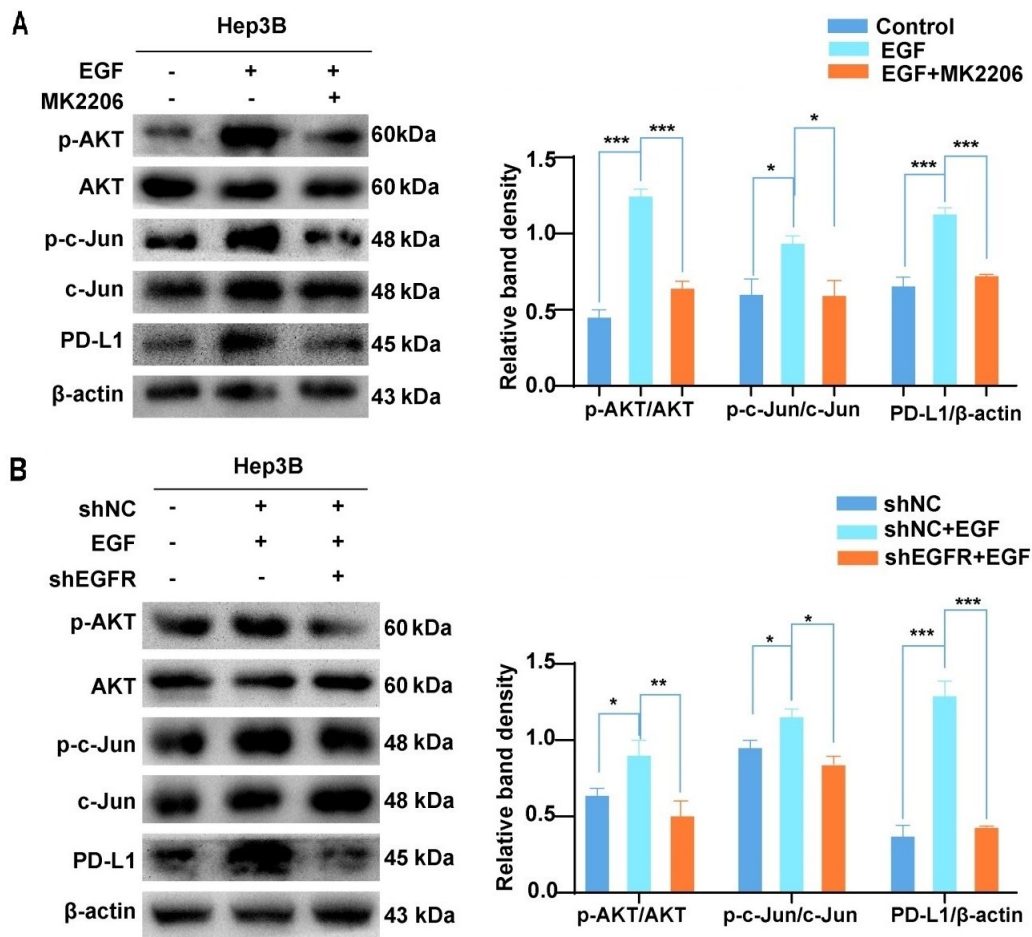


图 8 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达水平

3 讨论

自 2007 年 SHARP 研究公布 SFB 可有效延长晚期 HCC 患者生存期以来, SFB 已成为晚期 HCC 患者的一线标准治疗药物^[9-10]。然而, SFB 的耐药性是临床治疗中的一个关键问题。本研究旨在探讨 EGFR 在肝癌细胞对 SFB 敏感性中的作用及其与 PD-L1 的调控关系。EGFR 是一种跨膜蛋白, 在多种生理过程中发挥重要作用, 在肝癌中其高表达与肿瘤细胞的增殖和侵袭性密切相关^[11]。已有研究表明, SFB 对 EGFR 高表达的肝细胞癌(HCC)细胞的抑制效能显著减弱^[12], 本研究结果进一步证实了这一现象。通过多种实验手段系统地研究了 EGFR 活化对 Hep3B 细胞 SFB 敏感性的影响。结果显示 EGFR 活化后, 细胞对 SFB 的敏感性降低, 表现为细胞活力增加、增殖能力增强以及凋亡水平降低。

PD-L1 可通过激活多种代偿性信号通路, 削弱 SFB 对关键信号传导(如 RAF/MEK/ERK 等)的抑制效果, 从而降低肝癌细胞对 SFB 的敏感性^[13-14]。鉴于细胞内信号通路广泛联系, 且已有研究表明 PD-L1 受多种信号通路调控, 并在细胞增殖、凋亡中有重要作用^[15], 因此本研究着重探讨了 EGFR 与 PD-L1 的关系, 以深入探究 EGFR 在肝癌细胞中的作用机制。先前已有研究发现 EGFR 与 PD-L1 的相关性, 例如在非小细胞癌和卵巢癌中, EGFR 与其他的协同因子共同调控 PD-L1 的表达^[16-18]。本研究与先前的发现有相似之处, 但也存在差异。本研究中通过 Western Blot 和免疫荧光实验均证实了 EGFR 活化可上调 PD-L1 表达水平, 而 EGFR 敲低则降低 PD-L1 表达, 明确了在 Hep3B 细胞中 EGFR 通过 AKT/c-Jun 通路来调控 PD-L1。

随后, 本研究通过过表达和下调 PD-L1, 发现 PD-L1 对 Hep3B 细胞的 SFB 敏感性有重要影响。过表达 PD-L1 降低了细胞对 SFB 的敏感性, 这一结果与先前在其他肿瘤细胞中的研究发现具有相似性。例如, 在其他肿瘤系的研究中发现, 过表达 PD-L1 会激活某些抗凋亡信号通路, 从而降低细胞对化疗药物的敏感性^[19]。在 Hep3B 细胞中, 过表达 PD-L1 可能也是通过类似的机制干扰 SFB 的作用。SFB 主要通过抑制肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡来发挥抗癌作用, PD-L1 过表达或许会影响 SFB 作用的相关靶点或者信号通路, 如王威等^[20]研究中提到的 Raf/MEK/ERK 信号通路, 从而使得 SFB 难以发挥抑制细胞增殖、诱导凋亡等作用。而下调 PD-L1 则提高了 SFB 敏感性, 这与其他研究结果部分一致^[21-22]。本研究进一步明确了 Hep3B 细胞中 EGFR 对 PD-L1 的调控关系。在 Hep3B 细胞中, PD-L1 对 SFB 敏感性的影响可能具有

其独特的细胞内分子机制。其中特定的转录因子或者信号分子可能与 PD-L1 协同作用, 影响 SFB 的药效。

在明确了 PD-L1 对 Hep3B 细胞 SFB 敏感性影响的基础上, 需要探究 EGFR 与 PD-L1 表达相关的分子机制及其与 SFB 敏感性之间的潜在联系。本研究结果表明, EGF 处理后 AKT 和 c-Jun 活化水平上调, 同时 PD-L1 表达上调, 表明 EGF 对 AKT、c-Jun 的活化以及 PD-L1 的表达具有促进作用; 而抑制 AKT 通路后, Hep3B 细胞中的 p-AKT 和 p-c-Jun 水平显著下降, 同时 PD-L1 表达下调, 这一现象提示 AKT 在 EGF 诱导的 p-c-Jun 和 PD-L1 上调进程中具有重要意义, EGFR 可能通过调控 p-AKT 和 p-c-Jun 的水平来上调 PD-L1 的表达, 即 p-AKT 和 p-c-Jun 可能是 EGFR 调控 PD-L1 表达的中间环节分子。并且, EGFR 敲低后, p-AKT, p-c-Jun 水平均显著下调, PD-L1 表达水平也下调, 明确表明了 EGFR 对 AKT、c-Jun 的磷酸化以及 PD-L1 的表达具有正向调控作用, EGFR 可能位于 AKT 和 c-Jun 的上游, 通过调控 AKT 和 c-Jun 的磷酸化来影响下游 PD-L1 的表达。

本研究虽然揭示了 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对 SFB 敏感性这一机制, 但细胞内的信号传导网络是极其复杂的, 这一机制可能并非是完全独立的。在许多研究^[23-25]中发现, 细胞内不同信号通路之间存在着广泛的交叉对话(Crosstalk)。因此, 在本研究中, 很可能存在其他信号通路与 AKT/c-Jun 通路相互作用来调节 PD-L1 的表达以及 SFB 的敏感性。这种相互作用可能会增强或削弱 AKT/c-Jun 通路对 PD-L1 表达的调控, 进而影响细胞对 SFB 的敏感性。这些潜在的相互作用需要进一步深入研究, 以全面理解在 Hep3B 细胞中 PD-L1 表达调控以及 SFB 敏感性的复杂机制。

4 结论

本研究表明, EGFR 活化水平与 PD-L1 表达水平有关, EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达, 从而降低 Hep3B 细胞对 SFB 的敏感性。本研究为深入理解 SFB 耐药机制以及肝癌治疗策略提供了新的理论依据。然而, 仍需要进一步的研究来完善相关机制, 并探索其潜在的临床应用价值。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CAA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. GLOBAL cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] LLOVET J M, CASTET F, HEIKENWALDER M, et al.

Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Clin Oncol,2022,19(3):151-172.

[4] XU Z H,DANG Y,DONG Y,et al. Anti-hepatocellular carcinoma activity of *Sorbaria sorbifolia* by regulating VEGFR and c-Met/apoptotic pathway[J]. J Ethnopharmacol,2024,324:117758.

[5] 王伟,贾胜楠,樊孙甫,等. 二氢丹参酮通过抑制 Akt 信号通路激活来增强索拉非尼对肝细胞癌的抗癌作用(英文)[J]. 生物化学与生物物理进展,2024,51(6):1445-1457.

[6] GAO J F,HUO Z,SONG X Y,et al. EGFR mediates epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway to promote liver cancer proliferation and migration[J]. Oncol Lett,2024,27(2):59.

[7] 徐永康,吴建兵. 仑伐替尼在肝细胞癌中的耐药机制和对策研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版),2024,64(2):81-87.

[8] 江博文,舒畅,赵向阳,等. 外周血中性粒细胞-淋巴细胞比值、血小板-淋巴细胞比值对不可切除肝细胞癌经导管动脉化疗栓塞和靶向免疫治疗疗效及预后的预测价值[J]. 中华普通外科学文献(电子版),2024,18(2):99-105.

[9] ÖCAL O,KIMM M A,HOANG T P T,et al. Predictive value of platelet-to-lymphocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratio in HCC treated with sorafenib and radioembolization[J]. JHEP Rep,2024,6(4):100995.

[10] 刘云朋,高源,张红梅,等. 肿瘤微环境介导肝细胞癌索拉非尼耐药的研究进展[J]. 药物生物技术,2024,31(2):206-210.

[11] 柴森. 甲胎蛋白联合甲胎蛋白-L3、碱性磷酸酶和酸性水解酶检测在肝细胞癌诊断中的应用[J]. 临床研究,2024,32(7):122-124.

[12] 王学耀. 索拉非尼与敲低 STAT3 联合治疗抗 HCC 效果评价及机制研究[D]. 济南:山东大学,2022.

[13] 柳扬,范伟,丁洁. lncRNA SNHG16 通过调控 miR-570 对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究[J]. 中国比较医学杂志,2023,33(11):63-70.

[14] 何华星,刘璐琳,刘颖茵,等. 丁酸钠与索拉非尼可能通过 YAP 诱导铁死亡协同抑制肝癌细胞增殖[J]. 南方医科大学学报,2024,44(7):1425-1430.

[15] 罗丹霞,李玥滢,张慧. PD-1/PD-L1 抑制剂治疗小细胞肺癌的药物经济学系统评价[J/OL]. 中国医院药学杂志,1-8[2024-11-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20241106.1857.008.html>.

[16] SHEN X,JIN X L,FANG S,et al. EFEMP2 upregulates PD-L1 expression via EGFR/ERK1/2/c-Jun signaling to promote the invasion of ovarian cancer cells[J]. Cell Mol Biol Lett,2023,28(1):53.

[17] HSU P C,JABLONS D M,YANG C T,et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, yes-associated protein (YAP) and the regulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Int J Mol Sci,2019,20(15):3821.

[18] XIE Y L,DING J W,GAO J K,et al. Triptolide reduces PD-L1 through the EGFR and IFN- γ /IRF1 dual signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 109993.

[19] XU R Y,LIU X K,LI A M,et al. C-Met up-regulates the expression of PD-L1 through MAPK/NF- κ Bp65 pathway [J]. J Mol Med (Berl),2022,100(4):585-598.

[20] 王威,徐波,闫素英. 新型抗肝癌化合物 CBI-5725 对 RAF/MEK/ERK 通路及癌细胞凋亡的影响[J]. 实用药物与临床,2019,22(4):342-348.

[21] XU G L,NI C F,LIANG H S,et al. Upregulation of PD-L1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells[J]. Gastroenterol Rep (Oxf),2020,8(5):390-398.

[22] SHRESTHA R,PRITHVIRAJ P,BRIDLE K R,et al. Combined inhibition of TGF- β 1-induced EMT and PD-L1 silencing re-sensitizes hepatocellular carcinoma to sorafenib treatment[J]. J Clin Med,2021,10(9):1889.

[23] ADAO D M T,CHING C,FISH E J,et al. Endothelial cell-cardiomyocyte cross-talk: understanding bidirectional paracrine signaling in cardiovascular homeostasis and disease[J]. Clin Sci(Lond),2024,138(21):1395-1419.

[24] PARK S H,TSUZUKI S,CONTINO K F,et al. Crosstalk between bone metastatic cancer cells and sensory nerves in bone metastatic progression[J]. Life Sci Alliance,2024,7(12):e202302041.

[25] HONG Z J,XIE W,ZHUO H Q,et al. Crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts mediated by TGF- β 1-IGFBP7 signaling promotes the progression of infiltrative gastric Cancer [J]. Cancers (Basel),2023,15(15):3965.

收稿日期:2024-11-22;修回日期:2024-12-29

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:杨远清,郑璐萍,周文婷,等.铬、锌、铝相互作用及对糖尿病小鼠血糖影响的研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):225-230.

【论著与临床报道】

铬、锌、铝相互作用及对糖尿病小鼠血糖影响的研究

杨远清,郑璐萍,周文婷,罗家镗,黄衍强

(右江民族医学院基础医学院,广西高校耐药微生物
感染防治研究重点实验室,广西 百色 533000)

摘要:目的 探索铬、锌、铝相互作用及对糖尿病小鼠血糖的影响。方法 通过 EDTA 络合反应及细胞培养实验检测铬、铝、锌的相互作用。链脲佐菌素构建糖尿病模型小鼠 30 只,分 5 组,每组 6 只,检测单金属及混合金属相互作用对血糖的影响。结果 MTT 实验:铬(2.7~13.3 μg)和锌(0.07~0.34 μg)拮抗铝(53.3 μg);铬(159.9~266.5 μg)拮抗锌(13.4 μg);锌(0.36~2.73 μg)拮抗铬(53.3 μg)。动物实验:铬(100.8~604.2 μg)显著降血糖;锌(151.8~455 μg)降血糖效果随剂量增加减弱;铝(5.6~30.2 μg)使血糖上升。铬(100.8~604.2 μg)拮抗铝(16.6 μg)升血糖效应;锌(182~455 μg)与铝(16.6 μg)协同升血糖;锌铬比值 2 : 1(0.82 μg : 0.41 μg)协同降血糖。结论 铬、锌、铝在特定浓度下存在拮抗作用,但铬和锌在一定比例下可协同降低糖尿病小鼠血糖。

关键词:金属离子;糖尿病;拮抗;协同

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0225-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.005

Research on the interaction among chromium, zinc, and aluminum and their effects on blood glucose in diabetic

YANG Yuanqing, ZHENG Luping, ZHOU Wenting, LUO Jiazi, HUANG Yanqiang

(Guangxi Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Resistant Microbial
Infections in Universities, School of Basic Medical Sciences, Youjiang Medical
University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the interaction among chromium, zinc and aluminum and their effects on blood glucose in diabetic mice. **Methods** The interaction of chromium, aluminum, and zinc was detected through EDTA complexation reactions and cell culture experiments. A total of 30 diabetic mouse models were constructed using streptozotocin and divided into 5 groups, with 6 mice in each group, to examine the effects of single metal and mixed metal interactions on blood glucose. **Results** MTT assay: Chromium (2.7 to 13.3 μg) and zinc (0.07 to 0.34 μg) antagonized aluminum (53.3 μg); chromium (159.9 to 266.5 μg) antagonized zinc (13.4 μg); zinc (0.36 to 2.73 μg) antagonized chromium (53.3 μg). Animal experiments: Chromium (100.8 to 604.2 μg) significantly reduced blood glucose levels; the hypoglycemic effect of zinc (151.8 to 455 μg) weakened with increasing dose; aluminum (5.6 to 30.2 μg) increased blood glucose levels. Chromium (100.8 to 604.2 μg) antagonized the hyperglycemic effect of aluminum (16.6 μg); zinc (182 to 455 μg) synergized with aluminum (16.6 μg) to increase blood glucose levels; a zinc-to-chromium ratio of 2 : 1 (0.82 μg : 0.41 μg) synergistically reduced blood glucose levels. **Conclusion** Chromium, zinc, and aluminum exhibit antagonistic effects at specific concentrations, but chromium and zinc can synergistically reduce blood glucose

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32360035)

第一作者:杨远清,在读硕士研究生,研究方向:耐药卫生生物防治研究,E-mail:3493208862@qq.com

通讯作者:黄衍强,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:耐药微生物感染的防治研究,E-mail:hyq77615@163.com

levels in diabetic mice at certain ratios.

Key words: metal ions; diabetes; antagonism; synergy

目前,我国糖尿病的患病人数位居全球首位,已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大非传染性疾病,对公共卫生构成了重大挑战^[1]。糖尿病的发病机制复杂,涉及遗传、环境和生活方式等多种因素,并常伴有多种并发症,如糖尿病肾病和视网膜病变等^[2]。在糖尿病的发病机制和治疗中,某些金属元素如铝、锌和铬等发挥着重要作用^[3]。铬是人体必需的微量元素之一,主要以三价铬的形式参与生理功能。其在糖尿病中的作用机制主要包括:作为葡萄糖耐量因子的主要活性成分,铬能够增强胰岛素与靶向受体的结合率,提高细胞表面胰岛素受体水平,从而提升胰岛素敏感性;此外,铬还可促进糖代谢,通过提升糖原合成酶活性,增加糖原合成量,减少糖异生作用;同时,铬还能调节血脂,抑制胆固醇和脂肪酸的合成,降低血液中的甘油三酯和胆固醇水平^[4-5]。而锌作为多种糖代谢酶的辅助因子,对酶的活性具有双向调节作用,能够促进细胞对葡萄糖的摄取和利用。在糖尿病中的作用主要体现在调节酶活性、抗氧化作用以及稳定胰岛素分泌^[6]。对酶的活性具有双向调节作用,能够促进细胞对葡萄糖的摄取和利用^[7]。此外,锌还有助于稳定胰岛素的储存和分泌,改善血糖水平^[8]。相比之下,铝对糖尿病的影响则相对复杂且多为负面。研究表明,铝暴露可能增加糖尿病的发病风险,其机制可能与铝诱导的氧化应激和胰岛 β 细胞损伤有关^[9]。此外,铝还可能通过干扰胰岛素信号通路,加剧胰岛素抵抗^[10]。本研究旨在探索铬、锌、铝在什么浓度范围内是拮抗或协同作用以及什么情况下可以改善糖尿病小鼠的血糖,为糖尿病相关研究提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备 GES-1 胃上皮细胞(广州生物技术有限公司);1640 培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司);10%胎牛血清(赛业生物科技有限公司);胰酶消化液(兰杰柯科技有限公司);MTT(德国 Bio-FROXX 公司);三氯化铬、氯化锌、氯化铝(上海麦克林生化科技股份有限公司);二甲基亚砷(上海麦克林生化科技股份有限公司);细胞培养箱(赛默飞世尔科技);多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司)。

1.2 动物模型的构建 30 只 C57BL/6J 小鼠(8 周龄,雄性,18~20 g),来自广东维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证为 SCXK(粤)2022-0063,伦理审批号为 2024110102。所有动物饲养于右江民族医学院实验动物中心,所有小鼠自由进食饮水,12 h

明暗交替光照饲养。小鼠正常培养 3 d 各方面无异常后开始腹腔注射链脲佐菌素(STZ)构建糖尿病小鼠模型,溶剂为柠檬酸钠缓冲液(pH 4.2~4.5)。根据文献^[11]改进调整链脲佐菌素配制浓度为 5 mg/mL,给药方法为禁食 12 h 之后进行腹腔注射,小鼠给药剂量为 0.15 mL/10 g,所有小鼠连续造模 3 d,第 9 天开始测空腹血糖,血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L 持续 3 d 以上视为成模。

1.3 细胞培养 从-80℃超低温冰箱中取出 GES-1 胃上皮细胞的冻存管,并迅速将其置于 37℃恒温水浴中进行融化处理。融化后将冻存管中的细胞悬液迅速转移至预冷的离心管中,以 1 000 r/min 的转速进行离心,离心时间为 5 min。离心结束后,轻轻移除上清液,注意避免吸走细胞沉淀。随后,向离心管中加入添加了 10%胎牛血清(FBS)的 1640 培养基,然后使用移液管轻轻吹打细胞沉淀,使其充分混匀并形成均匀的细胞悬液。将混匀后的细胞悬液转移至细胞培养瓶中,确保细胞均匀分布于培养瓶底部。随后,将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养直至细胞充分贴壁生长。

1.4 锌、铬、铝两两金属混合溶液与 EDTA 的化学络合反应实验 ①溶液制备:首先,配制 10 mM 的 EDTA 溶液,并通过调节盐酸(HCl)浓度将其 pH 值精确调整至 2~3。根据文献^[12]摸索调整成不同金属浓度梯度,分别配制 4 种金属组合(Cr-Al、Zn-Al、Zn-Cr、Cr-Zn)的混合溶液,每种组合设置 5 个不同浓度梯度(见表 1、表 2)。将配制好的金属混合溶液转移至无菌离心管中,并使用涡旋振荡器振荡 30 s,以确保溶液的均匀性。②加样设计:在 96 孔板中,每孔依次加入 50 μ L 金属混合溶液和 100 μ L 10 mM EDTA 溶液(pH 2~3),使每孔的总体积达到 150 μ L。为确保实验结果的可靠性,每组实验设置 3 个复孔,并尽量避免边缘效应的干扰。将加样后的 96 孔板置于振荡摇床中,设置温度为 25℃、转速为 200 r/min,孵育 30 min,以促进金属与 EDTA 之间的络合反应达到平衡。③吸光度测定:使用酶标仪(SpectraMax M5)在 254 nm 波长下测定各孔的吸光度(OD 值)。在测定前,提前 30 min 预热仪器,并通过空白对照孔对基线进行校准,确保吸光度值的准确性。在测量过程中,自动校正光程为 1 cm,以减少因光程差异导致的测量误差。④数据采集与分析:记录每孔的吸光度值,并对数据进行初步筛选,剔除因气泡或其他干扰因素导致的异常值。

表 1 锌、铬、铝两两金属拮抗含量组合浓度 单位:μg							
铬铝组合		锌铝组合		锌铬组合		铬锌组合	
Cr	Al	Zn	Al	Zn	Cr	Cr	Zn
1.7	26.7	0.1	26.7	0.2	26.6	26.6	0.7
3.3	26.7	0.3	26.7	0.3	26.6	53.3	0.7
6.7	26.7	0.4	26.7	0.7	26.6	79.9	0.7
13.3	26.7	0.5	26.7	1.4	26.6	106.6	0.7
26.6	26.7	0.7	26.7	2.0	26.6	133.2	0.7

表 2 铬和锌化学络合反应含量组合 单位:μg	
铬	锌
100	50
100	100
100	150
100	200

1.5 MTT 实验 首先将贴壁的 GES-1 胃上皮细胞细胞经胰酶消化处理,获得单个细胞的悬浮液。调整细胞浓度至每毫升 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞后将细胞悬浮液接种到 96 孔板中,每孔加入 100 μL 细胞悬浮液,使细胞均匀分布于孔底。接着,将 96 孔板置于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,维持细胞在适宜的生长环境中。培养 24 h 后,细胞贴壁生长良好。随后,根据文献^[12]摸索调整成不同金属浓度梯度如表 3,向每孔中加入相应浓度的金属溶液,继续培养 24 h。药物处理 24 h 后,轻轻吸取孔中的培养液,避免对细胞造成机械损伤。最后,每孔加入 10 μL MTT 溶液(浓度为 5 mg/mL),继续培养 3~4 h。MTT 反应结束后,吸去孔中的培养液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),以溶解紫色结晶甲臌。将 96 孔板置于低速振荡器上振荡 10 min,确保结晶完全溶解后使用酶标仪在 490 nm 波长处测量各孔的吸光度值(OD 值)。计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)= 加药组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

表 3 锌、铬、铝两两金属拮抗含量组合 单位:μg							
铬铝组合		锌铝组合		锌铬组合		铬锌组合	
Cr	Al	Zn	Al	Zn	Cr	Cr	Zn
2.7	53.3	0.07	53.3	0.34	53.3	53.3	13.36
5.3	53.3	0.14	53.3	0.68	53.3	106.6	13.36
8.0	53.3	0.20	53.3	1.36	53.3	159.9	13.36
10.7	53.3	0.27	53.3	2.04	53.3	213.2	13.36
13.3	53.3	0.34	53.3	2.73	53.3	266.5	13.36

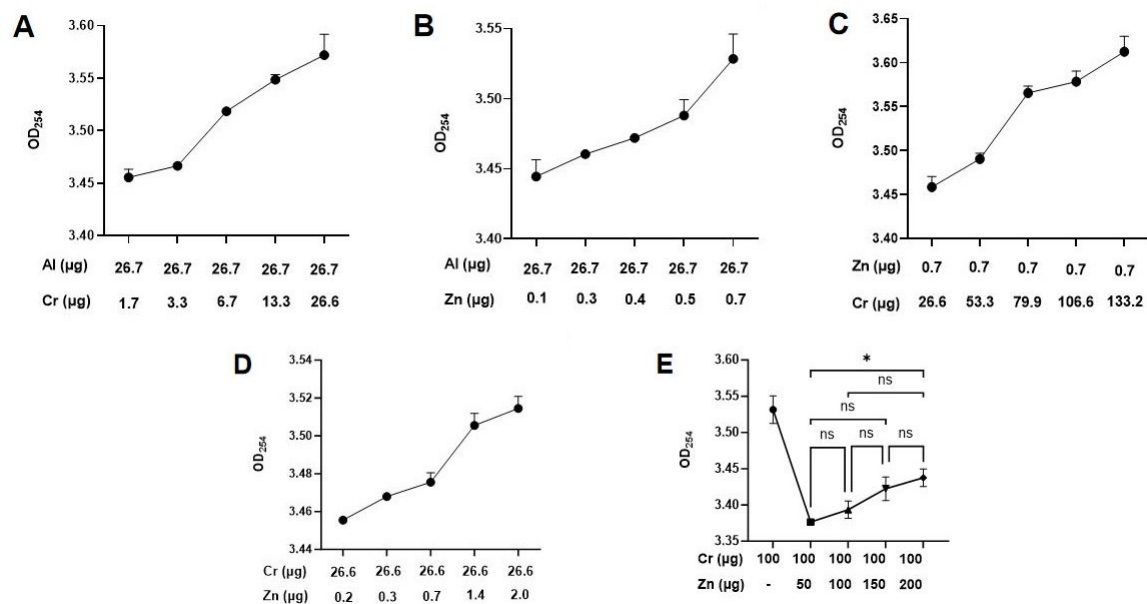
1.6 小鼠灌胃给药与血糖动态监测 实验选用 30 只糖尿病小鼠,随机分为 5 组,每组 6 只。根据文献^[13]摸索调整配制所需的金属溶液,溶剂为超纯水(UP 水)。实验分成 6 d 完成,每天用不同的金属溶液(Cr、Zn、Al、混合 1、混合 2、混合 3)灌胃,每组小鼠对应不同浓度的金属溶液(如表 4),其中,混合 1 金属溶液中的 Zn 和 Cr 比例分别是 3:1(1.23 μg:0.41 μg)、2:1(0.82 μg:0.41 μg)、1:1(0.41 μg:0.41 μg)、1:2(0.41 μg:0.82 μg)、1:3(0.41 μg:1.23 μg)。血糖测量时间点为灌胃后 0 h(灌胃前)、1 h、2 h、3 h、4 h,采血方法为刺破尾尖,用血糖仪测量血糖值。实验期间小鼠禁食,记录各时间点血糖值,并计算 0 h 与 1 h、2 h、3 h、4 h 血糖的差值。

表 4 单个金属以及混合金属浓度 单位:μg								
单金属			混合 1		混合 2		混合 3	
Cr	Zn	Al	Zn	Cr	Cr	Al	Zn	Al
75.6	151.6	4.2	1.23	0.41	75.6	16.6	151.6	16.6
100.8	182.0	5.6	0.82	0.41	100.8	16.6	182.0	16.6
151.0	227.6	8.3	0.41	0.41	151.0	16.6	227.6	16.6
302.0	303.4	16.6	0.41	0.82	302.0	16.6	303.4	16.6
604.2	455.0	30.2	0.41	1.23	604.2	16.6	455.0	16.6

1.7 统计学方法 使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件对各组数据处理,多组金属溶液络合反应实验测得 OD 值之间以及 MTT 实验细胞存活率之间比较均采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EDTA 反应检测金属的相互作用 铬拮抗铝组:随着混合金属溶液体系中铬(1.7~26.7 μg)的升高,OD₂₅₄ 值显著上升,铬与 EDTA 的结合能力增强(见图 1A);锌拮抗铝组:随着混合金属溶液体系中锌(0.1~0.7 μg)的升高,OD₂₅₄ 值亦呈现上升趋势,锌与 EDTA 的结合量增加(见图 1B);铬拮抗锌组:随着混合金属溶液体系中铬(26.6~133.2 μg)的升高,OD₂₅₄ 值同样上升,铬与 EDTA 的结合增强(见图 1C);锌拮抗铬组:随着混合金属溶液体系中锌(0.2~2.0 μg)的升高,OD₂₅₄ 值显著上升,锌与 EDTA 的结合量增加(见图 1D),锌对铬的拮抗作用明显增强;锌拮抗铬组:随着锌(50~200 μg)的升高,OD₂₅₄ 值变化程度不大,说明锌在这个范围内对铬拮抗效果不明显(见图 1E)。

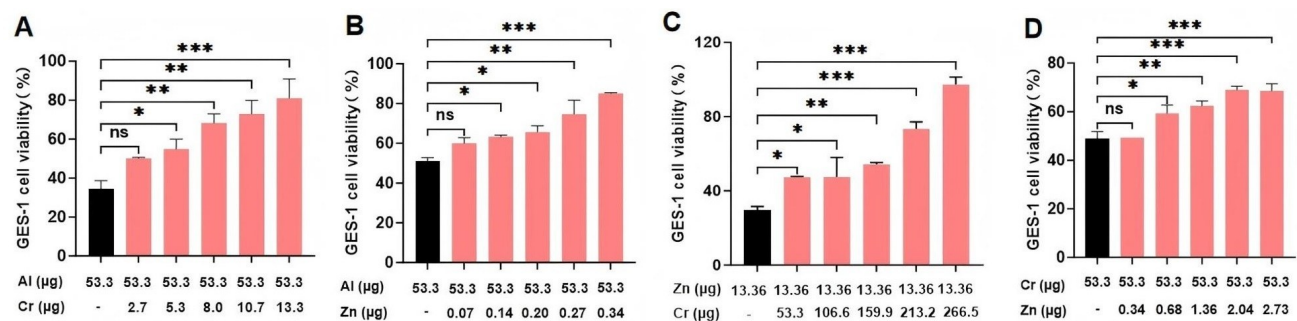


注:A. 铬含量增加,铬与 EDTA 结合能力增强,拮抗铝的效果增强;B. 锌含量增加,锌与 EDTA 结合能力增强,拮抗铝的效果增强;C. 铬含量增加,铬与 EDTA 结合能力增强,拮抗锌的效果增强;D. 锌含量增加,锌与 EDTA 结合能力增强,拮抗铬的效果增强;E. 锌含量增加,锌与 EDTA 结合能力增强不明显,拮抗铬的效果不明显。与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 EDTA 反应检测金属的相互作用

2.2 MTT 实验检测金属的相互作用 铬拮抗铝组:随着混合金属溶液体系中铬(5.3~13.3 μg)的增加,细胞的平均存活率提升,显著高于铝单独组(53.3 μg),且 $P < 0.05$ (见图 2A)。锌拮抗铝组:随着混合金属溶液体系中锌(0.14~0.34 μg)的升高,细胞的平均存活率提升,显著高于铝单独组(53.3 μg),且 $P <$

0.05(见图 2B)。铬拮抗锌组:随着混合金属溶液体系中铬(53.5~266.5 μg)的升高细胞的平均存活率提升,显著高于锌单独组(13.36 μg),且 $P < 0.05$ (见图 2C)。锌拮抗铬组:随着混合金属溶液体系中锌(0.68~2.73 μg)的升高,细胞的平均存活率提升,显著高于铬单独组(53.3 μg),且 $P < 0.05$ (见图 2D)。



注:A. 铬增加,细胞存活率提升,显著高于铝单独组;B. 锌增加,细胞存活率提升,显著高于铝单独组;C. 铬增加,细胞存活率提升,显著高于锌单独组;D. 锌增加,细胞存活率提升,显著高于铬单独组。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

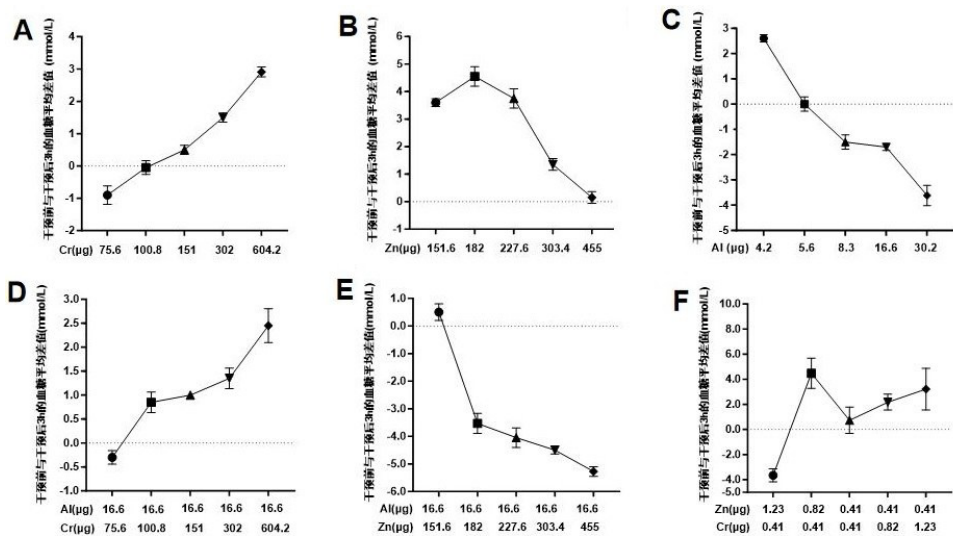
图 2 MTT 实验检测金属的相互作用

2.3 金属溶液对糖尿病小鼠血糖的影响 实验结果显示,对小鼠分别进行单金属溶液灌胃后,铬在 75.6~100.8 μg 时升血糖,而在 100.8~604.2 μg 时降血糖,随着铬质量的增加,降血糖效果越好(见图 3A);相比之下,锌的作用则表现出一定的复杂性,锌在 182 μg 时降血糖效果最好,在 182~455 μg 时降血糖效果逐

渐变差(见图 3B);对于铝,其在 4.2~5.6 μg 时降血糖,而在 5.6~30.2 μg 时血糖回升(见图 3C)。对小鼠灌胃铬和铝的混合溶液后,铝固定为 16.6 μg 时,铬在 75.6~82.1 μg 升血糖,其后,随着铬质量(82.1~604.2 μg)的增加,降血糖效果越好,表明铬的升高显著增强了混合溶液的降血糖效果(见图 3D),铬在混合

溶液中发挥了主导作用,能够有效抑制铝的负面效应。对小鼠灌胃锌和铝的混合溶液后,铝固定为 16.6 μg 时,锌在 151.6~154.1 μg 时降血糖,在 154.1~455 μg 时血糖逐渐上升,表明锌可能在一定程度上与铝产生协同作用,加剧了铝对血糖的负面影响(见图 3E);

对小鼠灌胃铬和锌的混合溶液后,在铬锌比值为 2 : 1 (0.82 μg : 0.41 μg) 时,表现为协同效应,小鼠血糖降低,而在铬锌比值为 1 : 1 (0.41 μg : 0.41 μg) 时,小鼠血糖降低的效果变差,加大铬质量后降血糖效果好转(见图 3F)。



注: A. 铬对小鼠血糖的影响;B. 锌对小鼠血糖的影响;C. 铝对小鼠血糖的影响;D. 铬锌混合对小鼠血糖的影响;E. 铬铝混合对小鼠血糖的影响;F. 锌铝混合对小鼠血糖的影响。

图 3 金属溶液对糖尿病小鼠血糖的影响

3 讨论

近年来,越来越多的研究关注到微量元素在血糖调节中的潜在作用,尤其是锌、铝和铬这 3 种元素。锌和铬作为重要的微量元素,在血糖调节中发挥着积极的作用^[3]。糖尿病的发病机制与胰岛素相关信号转导通路密切相关,这些通路主要包含腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)信号通路等,这些通路导致胰岛素无法与正常激活的受体相结合,从而引起血糖变化^[14]。有研究表明糖代谢异常的发生多与胰岛素信号转导阻碍相关^[15-16],而铬可以通过调节胰岛素信号转导以及调节糖代谢相关的酶如琥珀酸脱氢酶来降低血糖水平,改善糖代谢异常^[17]。锌则在血糖调节中的作用可能具有浓度阈值,且其机制可能涉及多种生理途径的相互作用,其可以通过调节胰岛素功能和改善胰岛素敏感性^[18]影响血糖的变化。研究表明,糖尿病患者尿锌增加证实补锌对糖尿病的治疗有一定价值^[19]。而铝则会诱导的相关氧化应激,氧化应激能够损伤胰岛 β 细胞,抑制胰岛素的正常分泌和功能,从而导致血糖升高^[9]。本实验结果与上述研究结果具有一致性,即铬和锌在一定质量范围内对小鼠血糖具有调节作用,其中铬表现出显著的降血糖效果,提示铬可能通过增强胰岛素敏感性或其他代谢途径,促进血糖的利用和储存,从而发挥降

血糖作用。相反,铝浓度的增加则导致小鼠血糖水平上升,显示出与铬和锌相反的作用趋势。

为进一步探讨了铬、锌和铝 3 种金属元素混合灌胃对小鼠血糖水平的影响,揭示它们在血糖调节中的协同或拮抗作用。在铬与锌的混合溶液中,当锌在 182~455 μg 范围内时,即锌铬比值为 2 : 1 (0.82 μg : 0.41 μg) 时,锌与铝为协同作用,可显著加剧血糖升高效应。然而,当锌铬比值为 1 : 1 (0.41 μg : 0.41 μg) 时,锌与铬之间则呈现拮抗作用,导致降血糖效果显著减弱,增大铬的比例,降血糖的效果又变好。在铬与铝的混合溶液中,铬的增加显著增强了降血糖能力,表明铬能够有效抑制铝的负面作用;而在锌与铝的混合溶液中,锌的增加未能抵消铝对血糖的负面影响,反而进一步削弱了混合溶液的降血糖能力。这些结果提示,在血糖调节中,铬、锌和铝之间存在复杂的相互作用,铬具有显著的降血糖潜力,而锌和铝的作用则相对复杂且可能受到多种因素的影响,但在人体中是否也是按此浓度趋势升降血糖还需要进一步的探索。研究发现,少量的金属元素如锌、铬对人体无太大的损伤作用^[17,20],在 MTT 实验中,随着锌或铬的升高,胃上皮细胞的平均存活率显著提升,表明锌对铬、铬对锌以及铬和锌对铝均具有显著的拮抗作用。此外,络合反应实验进一步证实了揭示了锌、铬和铝之间的相互拮抗

机制。总的来说,在糖尿病的治疗和血糖管理中,合理补充铬和锌可能具有潜在的益处,而铝的潜在危害提示在环境和饮食中需注意减少铝的暴露可能有助于避免血糖升高。未来的研究应进一步探索锌和铬在血糖调节中的具体分子机制,并评估其在不同人群中的临床应用效果。鉴于铬对胰岛素功能的促进作用,可以进一步研究开发含铬的膳食补充剂或功能性食品,用于辅助控制血糖,预防和改善糖尿病症状;将锌水平检测纳入糖尿病风险评估体系,对于锌缺乏的人群,通过合理补充锌来降低糖尿病的发病风险;同时,针对铝的负面作用,需要更多的研究来明确其对糖尿病的长期影响,并制定相应的预防措施,为糖尿病机制研究提供新的实验基础。

参考文献:

[1] 郝津津,楼大钧. 锌在糖尿病及其慢性并发症中的治疗作用及机制研究进展[J]. 浙江医学,2022,44(11):1225-1230.

[2] EVA H, AKTER Q S, ALAM M K. Relationship between glycemic status and serum chromium level with type 2 diabetes mellitus[J]. Mymensingh Med J,2020,29(1):183-186.

[3] ZHOU Y, ZHANG L, ZHENG T, et al. Metals link to diabetes: Insights from a national cross-sectional investigation[J]. J Environ Sci,2025,155:720-729.

[4] TAI F D, SYN W K, ALAZAWI W. Practical approach to non-alcoholic fatty liver disease in patients with diabetes[J]. Diabet Med,2015,32(9):1121-1133.

[5] HERZIG S. Liver: a target of late diabetic complications[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2012, 120(4): 202-204.

[6] 张孟辉,王新颖,王树松,等. 锌稳态在糖尿病及并发症中的作用[J]. 临床荟萃,2024,39(8):758-762.

[7] MAMMADOVA-BACH E, BRAUN A. Zinc homeostasis in platelet-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21):5258.

[8] NAZEM M R, ASADI M, JABBARI N, et al. Effects of zinc supplementation on superoxide dismutase activity and gene expression, and metabolic parameters in overweight type 2 diabetes patients: a randomized, double-blind, controlled trial[J]. Clin Biochem,2019,69:15-20.

[9] 李文静,袁春满,高婷,等. 血糖升高在职业铝暴露致工人认知障碍中的中介作用[J]. 环境与职业医学,2021,38

(3):217-222.

[10] 谢秉言,梁典胤,许放,等. 过量锰、铁、铝暴露对胰岛细胞及糖尿病影响的研究[J]. 现代预防医学,2019,46(6):988-991,1003.

[11] 李想,吕琴,吴秋月,等. 高脂高糖饮食联合 STZ 诱导 C57Bl/6J 品系小鼠构建糖尿病肾病模型的研究[J]. 重庆医学,2022,51(1):16-19.

[12] LIN Y H, YUAN Y, OUYANG Y, et al. Metabolome-wide association study of multiple plasma metals with serum metabolomic profile among middle-to-older-aged chinese adults[J]. Environ Sci Technol,2022,56(22):16001-16011.

[13] YANG A M, LIU S M, CHENG N, et al. Multiple metals exposure, elevated blood glucose and dysglycemia among Chinese occupational workers[J]. J Diabetes Complicat, 2017,31(1):101-107.

[14] 史丽伟. 新消渴方调控 AMPK 信号通路改善 2 型糖尿病肝脏胰岛素抵抗的机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2019.

[15] QIU N, WEI X M, ZHANG Z J, et al. Asymmetrical dimethylarginine induces dysfunction of insulin signal transduction via endoplasmic reticulum stress in the liver of diabetic rats[J]. Life Sci,2020,260:118373.

[16] BLAZQUEZ E, HURTADO-CARNEIRO V, LEBAUT-AYUSO Y, et al. Significance of brain glucose hypometabolism, altered insulin signal transduction, and insulin resistance in several neurological diseases[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2022,13:873301.

[17] 李倩,袁勇敢,张燕青,等. 铬(Ⅲ)参与调控机体糖脂代谢的作用机制研究进展[J]. 食品工业科技,2024,45(22):397-405.

[18] SUN Z D, SHAO Y Z, YAN K H, et al. The link between trace metal elements and glucose metabolism: evidence from zinc, copper, iron, and manganese-mediated metabolic regulation[J]. Metabolites, 2023, 13(10):1048.

[19] BARMAN S, SRINIVASAN K. Diabetes and zinc dyshomeostasis: Can zinc supplementation mitigate diabetic complications? [J]. Crit Rev Food Sci Nutr,2022,62(4):1046-1061.

[20] AKHTAR S. Zinc status in south Asian populations: an update[J]. J Health Popul Nutr,2013,31(2):139-149.

收稿日期:2025-01-17;修回日期:2025-02-17

(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:刘大川,梅恬恬,王影.紫草素去氧糖苷的合成及其抗肿瘤细胞增殖活性评估[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):231-236.

【论著与临床报道】

紫草素去氧糖苷的合成及其抗肿瘤细胞增殖活性评估

刘大川¹, 梅恬恬¹, 王影²

(1. 蚌埠医科大学药学院, 安徽 蚌埠 233030;

2. 蚌埠医科大学公共基础学院, 安徽 蚌埠 233030)

摘要:目的 本研究通过用脱氧葡萄糖胺修饰紫草素来提高其细胞毒性和抗肿瘤活性。方法 以 1,3,4,6-四乙酰-2-氨基-2-脱氧葡萄糖盐酸盐和丁二酸酐和紫草素为原料合成目标化合物 Z-1-2。将不同浓度的 Z-1-2 对体外培养的乳腺癌细胞系进行干预。用 MTT 法筛选目标产物对 MCF-7、MDA-MB-231、4T1 以及 HUVEC 的抑制作用,采用细胞划痕实验评估目标产物处理对细胞迁移能力的影响,流式细胞术检测对细胞凋亡的影响。结果 目标化合物 Z-1-2 的产率为 27%。Z-1-2 对所选细胞系均有抗增殖作用,其中对 MDA-MB-231 的抗增殖活性最优,MDA-MB-231 细胞迁移能力下降,细胞凋亡率显著增加,差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 本研究所设计合成的 2-脱氧-2-氨基糖苷紫草素衍生物(Z-1-2)对乳腺癌细胞系中三阴性乳腺癌,具有明显的抑制作用,对进一步研究具有重要意义。

关键词:三阴性乳腺癌;2-脱氧-2-氨基糖苷紫草素衍生物;抗肿瘤

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0231-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.006

Synthesis of shikonin deoxyglycoside and evaluation of its antitumor cell proliferation activity

LIU Dachuan¹, MEI Tiantian¹, WANG Ying²

(1. School of Pharmacy, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, Anhui, China;

2. School of Public Basics, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To improve the cytotoxicity and antitumor activity of shikonin by modifying it with deoxyglucosamine. **Methods** The target compound Z-1-2 was synthesized using 1,3,4,6-tetraacetyl-2-amino-2-deoxyglucose hydrochloride, succinic anhydride, and shikonin as raw materials. Different concentrations of Z-1-2 were used to interfere with breast cancer cell lines in vitro. The MTT method was used to screen the inhibitory effect of the target product on MCF-7, MDA-MB-231, 4T1 and HUVEC cells. The scratch assay was used to assess the effect of target product treatment on cell migration ability, and flow cytometry was used to detect the effects on cell apoptosis. **Results** The yield of the target compound Z-1-2 was 27%. Z-1-2 had an antiproliferative effect on all the selected cell lines, and it showed the best antiproliferative activity against MDA-MB-231. The migration ability of MDA-MB-231 cells decreased, and the cell apoptosis rate increased significantly, with statistically significant differences ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** The 2-deoxy-2-aminoglycoside shikonin derivative (Z-1-2) designed and synthesized in this study has a significant inhibitory effect on triple-negative breast cancer in breast cancer cell lines, which is of great significance for further research.

Key words: triple-negative breast cancer; 2-deoxy-2-aminoglycoside shikonin derivative; antitumor

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2021A0707、2023AH051975);安徽省大学生创新创业训练计划项目(S202310367094)

第一作者:刘大川,博士,副教授,研究方向:小分子化合物的设计合成与抗肿瘤及抗癫痫活性研究,E-mail:dcliu1226@fox-mail.com

乳腺癌(breast cancer, BC)是全球女性发病率、致残率和死亡率的主要原因^[1], 占癌症相关死亡的 15.5%^[2]。尽管乳腺癌有多种治疗方法, 但治疗失败和癌症复发的比率仍然很高。研究表明, 侵袭和转移是导致高达 90% 乳腺癌死亡的原因^[3]。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌的一种亚型, 其特点为雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(HER2 或 EGFR)均缺失。由于 TNBC 具有侵袭性, 其在所有乳腺癌亚型中的转移率最高, 总生存率最低^[4-5]。由于缺乏治疗靶点, TNBC 易于转移和对化疗产生耐药性, 导致治疗难度大且预后不良^[6]。研究表明^[7], 与激素受体阳性乳腺癌相比, TNBC 在年轻和肥胖女性中更为普遍, 且术后 3~5 年复发率和死亡率较高。在分子层面上, TNBC 的高度异质性导致了不同的治疗反应。由于受体阴性, 晚期化疗仍是系统治疗的基石; 然而, 约有 30% 的患者在 5 年内死亡^[8]。因此, 确定潜在的治疗靶点并选择合适的药物治疗对于改善 TNBC 患者的疾病结局和预后至关重要。

紫草素(Shikonin, SK)是一种源自传统中药紫草根部的主要生物活性萘醌类化合物^[9]。可通过诱导凋亡、导致细胞周期阻滞、抑制转移等多种方式而表现出强大的抗癌作用^[10-11]。然而, 紫草素的应用具有多靶点作用、不稳定性等局限性, 通常情况下常采用化学修饰来扩展其应用范围。目前, 紫草素的半合成化合物主要包括含环丙烷基衍生物^[12]、紫草素葡萄糖苷衍生物^[13]和苯并呋喃衍生物^[14], 这些衍生物对常见恶性肿瘤均表现出显著的抑制作用。化合物的糖基化是提高溶解度和降低毒性的有效方法。2-脱氧-2-葡萄糖胺是葡萄糖的一种天然化合物, 由于其结构特点使其在信息传递方面发挥作用, 且作为糖化合物具有多种生理活性。研究表明, 2-脱氧-2-氨基葡萄糖可通过诱导白细胞凋亡来抑制慢性粒细胞增殖, 或通过细胞膜相互作用的药物结合来增强抗癌活性^[15]。此外, 2-氨基-2-脱氧葡萄糖可促进葡萄糖分解为丙酮酸, 间接调节糖酵解途径。

紫草素是一种具有抗肿瘤特性的传统化合物, 2-氨基-2-脱氧葡萄糖对肿瘤也具有抑制作用。本研究以紫草素为核心结构, 在其侧链上的活性羟基引入 2-氨基-2-脱氧葡萄糖基团, 从而获得具有更强抗肿瘤活性的紫草素脱氧葡萄糖胺衍生物。同时还将对该化合物的初步抗肿瘤作用进行体外研究。

1 材料与方法

1.1 试剂材料 试剂包括紫草素、1,3,4,6-四乙酰-2-氨基-2-脱氧葡萄糖盐酸盐、琥珀酸酐、二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)和三乙胺。除

紫草素购自上海源叶生物技术有限公司(分子式为 $C_{16}H_{16}O_5$, 分子量为 288.299, 纯度: HPLC $\geq 98\%$, CAS 号为 517-89-5)外, 其余试剂均购自毕得医药科技有限公司和麦克林公司。溶剂购自泰坦试剂探索平台。柱色谱使用硅胶(200-300 目)进行, 以乙酸乙酯、二氯甲烷和石油醚(沸点 30~60 $^{\circ}C$)为洗脱剂。薄层色谱(TLC)在玻璃底硅胶板(GF254)上进行, 并在紫外光(λ 254 nm)下可视化。所有化合物均溶于二甲基亚砜(DMSO)中制备成 10 mM 的储备液, 然后再用培养基稀释至所需浓度以供使用。

1.1.1 Z-1-2 的合成过程 将 1,3,4,6-四乙酰-2-氨基-2-脱氧葡萄糖盐酸盐(1 mol)和琥珀酸酐(1 mol)置于 50 mL 双颈烧瓶中, 溶于 DMSO 和无水丙酮中, 搅拌至清澈, 并加入适量的三乙胺催化反应。反应体系在室温下搅拌 16 h, 并通过薄层色谱(TLC)监测反应进程。反应完成后, 通过过滤和重结晶得到纯的中间体 Z-1-1。产物为白色粉末, 产率为 25%。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 6.48 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.33 (dd, *J* = 10.7, 9.3 Hz, 1H), 5.10 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.45-4.23 (m, 2H), 4.16 (dd, *J* = 12.5, 2.3 Hz, 1H), 3.95 (m, *J* = 10.0, 4.7, 2.3 Hz, 1H), 2.76 - 2.65 (m, 1H), 2.47-2.37 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 5H)。¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 175.91(s), 172.13(s), 171.58(s), 170.70(s), 169.85 (s), 169.44(s), 92.53(s), 72.62(s), 72.55(s), 68.41 (s), 61.80(s), 52.76(s), 31.05(s), 29.33(s), 20.87 (s), 20.68(s), 20.57(s)。HRESIMS [*M*+Na]⁺ *m/z* 470.1269 (Calcd for $C_{18}H_{25}NO_{12}$ 447.3930)。

将化合物 Z-1-1(0.2 mmol)在室温下溶于无水二氯甲烷(20 mL)中。然后, 加入 0.4 mmol 的二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.05 mmol 的 4-二甲氨基吡啶(DMAP), 搅拌 0.5 h。接着, 加入 0.2 mmol 的紫草素, 并在冰浴中搅拌 0.5 h。之后, 缓慢将混合物恢复至室温并反应 6 h。通过旋转蒸发去除溶剂, 制备薄层板以分离和纯化产物(乙酸乙酯: 石油醚=1:1), 从而获得目标化合物(方案 1)。产物为红色粉末, 产率为 27%。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.81 (s, 1H), 12.68 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.43 (s, 2H), 6.23 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.37 (m, *J* = 9.4 Hz, 3H), 4.50 (dt, *J* = 11.8, 6.4 Hz, 2H), 4.35 (dd, *J* = 12.5, 2.2 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.96 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.77 (m, *J* = 29.6, 14.9, 8.0 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.81

(s,2H)。 ^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform- d) δ 176.29 (s), 171.63 (s), 171.28 (s), 170.71 (s), 169.56 (s), 169.25 (s), 167.88 (s), 147.75 (s), 136.23 (s), 133.13 (s), 132.78 (s), 131.63 (s), 117.53 (s), 92.45 (s), 72.93 (s), 72.30 (s), 67.70 (s), 61.65 (s), 53.18 (s), 32.87 (s), 28.95 (s), 25.78 (s), 20.86 (s), 20.74 (s), 20.59 (s), 17.96 (s)。HRESIMS [$M+H$] $^{+}$ m/z 718.2341 (Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{NO}_{16}$ 717.2269)。

1.2 细胞培养 实验中使用了人乳腺癌细胞系 MCF-7、三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、小鼠乳腺癌细胞系 4T1 以及正常人脐静脉内皮细胞 HUVEC。所有细胞系均来自中国上海细胞库,存于安徽省生化药物工程技术研究中心。其中, MCF-7 和 MDA-MB-231 培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM/高糖培养基中,而 4T1 细胞系和 HUVEC 细胞系则培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI1640 培养基中。所有细胞均在 37℃、含 5% CO_2 的湿润环境中孵育。

1.3 MTT 检测 将处于对数生长期细胞置于 96 孔板中,每孔接种细胞大约 5×10^3 个,孵育 24 h,并设置了空白对照孔(只加培养基没有加细胞)。设置药物浓度梯度为 0 μM 、2 μM 、4 μM 、6 μM 、8 μM 、10 μM 、12 μM ,给药后培养 24 h,加入 5 mg/mL MTT 每孔 10 μL 。孵育 4 h 后,移去上清,每孔加入 100 μL DMSO,将 96 孔板置于 37℃ 孵育 30 min。使用酶标仪在 490 nm 处对细胞进行检测。

1.4 划痕实验 将 MDA-MB-231 细胞以 5×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板中,培养过夜。当细胞密度达到 90% 以上时,用微管尖端刮擦单层细胞形成划痕。然后,用 PBS 洗涤细胞 3 次,以 2% 血清培养基稀释 Z-1-2,设置药物浓度梯度为 0 μM 、2 μM 、4 μM 、8 μM ,给药后培养细胞 24 h。用光学显微镜观察创面愈合情况,并于 0 h、24 h 拍摄划痕。然后使用 ImageJ 图像分析软件圈定创面区域进行分析,使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析。

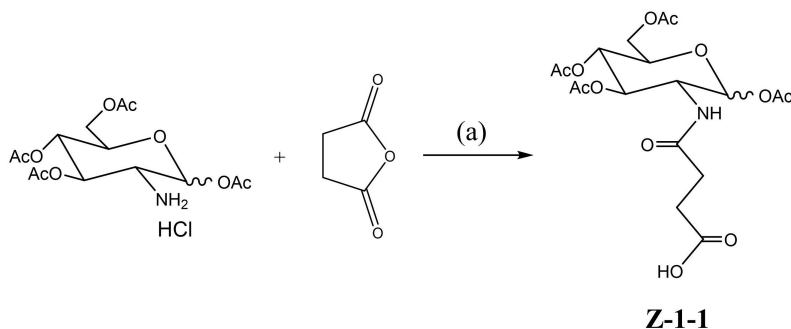
1.5 凋亡实验 将 MDA-MB-231 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养过夜,然后设置给药浓度梯度为 0 μM 、2 μM 、4 μM 、6 μM 、8 μM 、10 μM ,给药后培养细胞 24 h,进行剂量依赖性试验,以观察不同给药浓度对细胞凋亡情况的影响。分组收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,然后在结合缓冲液中用 Annexin V-FITC (5 μL) 和 PI (5 μL) 染色 15~20 min,室温避光。最后,采用 CytoFLEX 流式细胞仪(贝克曼,中国)检测凋亡细胞。采用 Flowjo 7.6 软件进行数据分析。

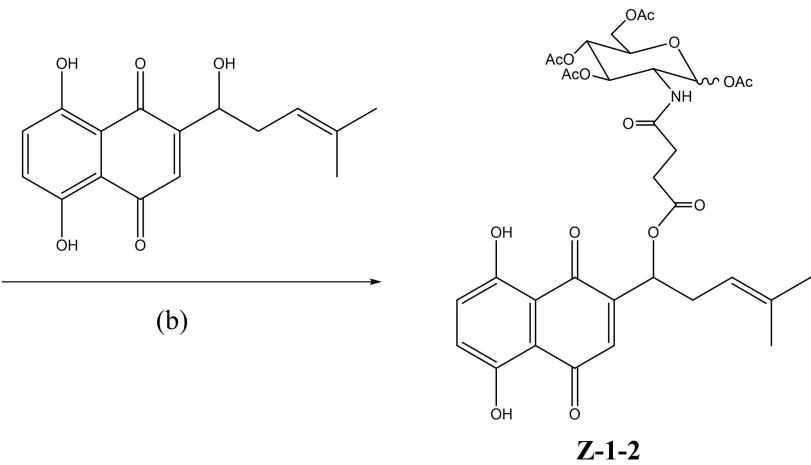
1.6 统计学方法 计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示,使用 t 检验进行组内差异性分析和组间比较。分析使用 SPSS 27.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化学合成 如图 1 所示,采用两步法有效合成了脱氧吡喃糖二胺葡萄糖紫草素衍生物。中间体是通过在二甲亚砜和丙酮的混合溶剂中,以三乙胺为偶联剂,使用琥珀酸酐对乙酰基保护的 2-氨基-2-脱氧葡萄糖胺盐酸盐进行酰化反应而合成的。随后,中间体在 DCC/DMAP 的催化下与紫草素发生反应。目标产物通过制备薄层色谱和制备液相色谱进行分离和纯化,并通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 进行表征。

2.2 Z-1-2 抑制癌细胞增殖 如表 1 所示,其中细胞抑制水平的 IC_{50} 代表其抗增殖活性。测试化合物展现出不同的抗增殖活性。该化合物对 4T1 的抑制作用最强($\text{IC}_{50} = 3.12 \pm 0.14 \mu\text{M}$),其次是 MDA-MB-231 ($\text{IC}_{50} = 4.05 \pm 0.17 \mu\text{M}$),对 MCF-7 的抑制作用最弱($\text{IC}_{50} = 7.90 \pm 0.76 \mu\text{M}$)。其中,该化合物对 MDA-MB-231 的抑制作用优于紫草素(SK, $\text{IC}_{50} = 5.01 \pm 0.23 \mu\text{M}$),细胞抑制率差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 2。与 SK 相比,Z-1-2 对正常人脐静脉内皮细胞系 HUVEC 的 IC_{50} 值($\text{IC}_{50} = 3.00 \pm 0.23 \mu\text{M}$)与 SK($\text{IC}_{50} = 2.78 \pm 0.23 \mu\text{M}$)无差别,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



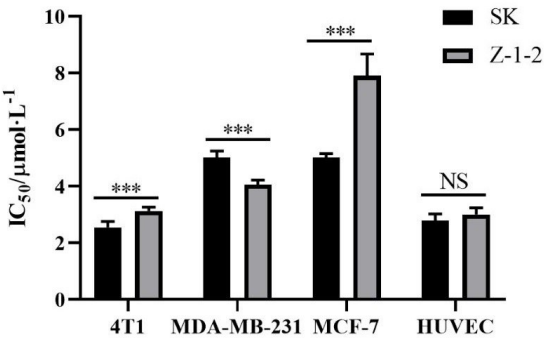


注:a. 三乙胺,二甲亚砜(DMSO)和无水丙酮,室温;b. 二环己基碳二亚胺(DCC),4-二甲氨基吡啶(DMAP),二氯甲烷,冰浴。

图 1 化合物 Z-1-2 的合成路线

表 1 Z-1-2 和 SK 对 3 种人癌细胞系(4T1、MDA-MB-231、MCF-7)和 1 种人正常脐静脉内皮细胞(HUVEC)的 IC₅₀

化合物	4T1	MDA-MB-231	MCF-7	HUVEC
Z-1-2	3.12±0.14	4.05±0.17	7.90±0.76	3.00±0.23
SK	2.54±0.21	5.01±0.23	5.01±0.13	2.78±0.23

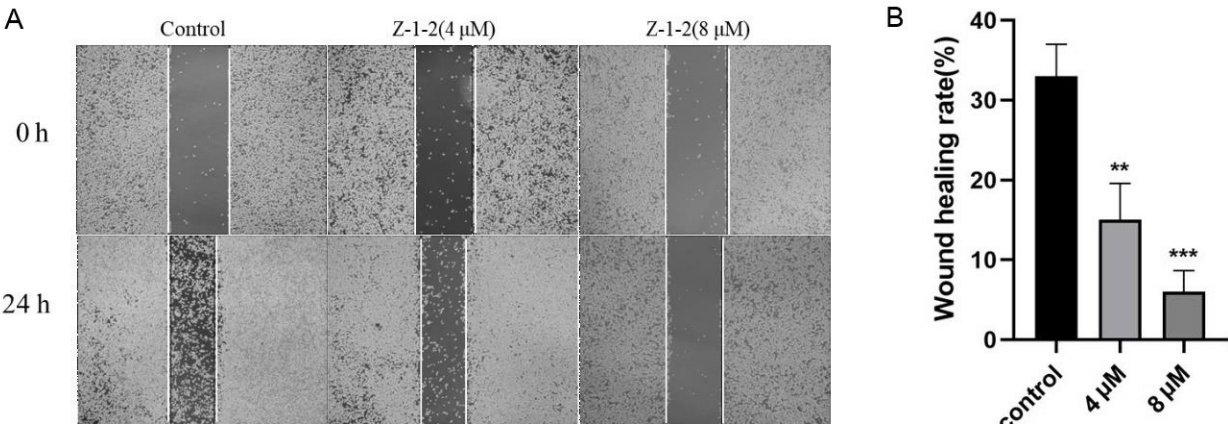


注:Z-1-2 与 SK 比较,*** $P<0.001$,
NS: $P>0.05$,每组 $n=6$ 。

图 2 Z-1-2 与 SK 对 3 种人癌细胞系(4T1、MDA-MB-231、MCF-7)及 1 种人正常脐静脉内皮细胞(HUVEC)抗增殖作用的比较结果

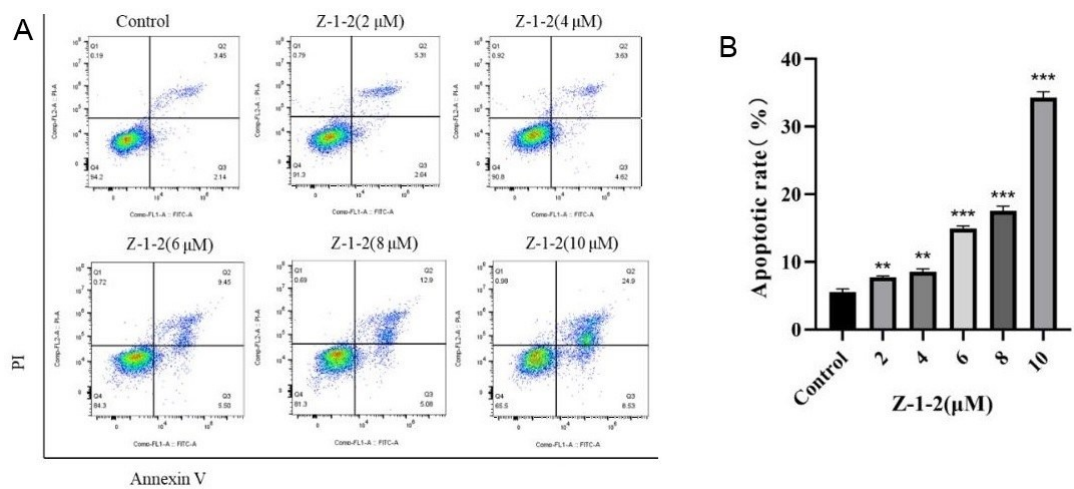
2.3 Z-1-2 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移 如图 3 所示,随着时间的推移,对照组细胞逐渐占据通道内的无细胞空间,24 h 后细胞通道发生明显愈合。而 Z-1-2 处理后,细胞划痕愈合明显减慢,且呈剂量依赖性,与正常对照组比较,划痕愈合率差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。

2.4 Z-1-2 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡 将 MDA-MB-231 细胞用不同剂量的 Z-1-2($0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $2\text{ }\mu\text{M}$ 、 $4\text{ }\mu\text{M}$ 、 $8\text{ }\mu\text{M}$)预处理 24 h,然后用带凋亡标志物的流式细胞仪分析细胞在体外的变化。如图 4 所示,Z-1-2 处理组的凋亡细胞百分比呈剂量依赖性增加,与正常对照组比较,凋亡率差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。



注:A 为通过伤口划痕试验检测细胞迁移。伤口刮伤模型中 0 h 和 24 h 细胞迁移的代表性图像;
B 为伤口刮伤试验的统计分析。与正常对照组(Control)比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,每组 $n=3$ 。

图 3 Z-1-2 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响



注:A 为流式细胞术检测 Z-1-2 对细胞凋亡的影响;B 为流式细胞术检测 Z-1-2 对细胞凋亡的统计分析。与正常对照组(Control)比较, * $P<0.01$, * * $P<0.001$, 每组 $n=3$ 。

图 4 Z-1-2 可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡

3 讨论

紫草素作为传统中草药紫草的重要成分,可通过靶向特定蛋白质或信号通路(包括微管蛋白和 PI3K/Akt/mTOR 通路)、诱导凋亡、抑制转移等多种方式发挥抗肿瘤作用。但其对正常细胞的毒性及水溶性不高,等缺陷限制了其临床上的应用。有报道表明,紫草素是一种潜在的抗肿瘤先导化合物和 PKM2 的特异性抑制剂,能够通过调节糖酵解途径来抑制肿瘤的增殖。因此本研究选择可通过间接参与糖酵解途径中葡萄糖分解为丙酮酸过程的 2-氨基-2-脱氧葡萄糖对紫草素常见修饰位点侧链羟基进行结构改造,结果得到一种 2-脱氧-2-氨基葡萄糖苷紫草素衍生物(Z-1-2),并采用 MTT 法对其进行初步抗肿瘤活性筛选,结果显示,Z-1-2 作用于 3 类乳腺癌细胞系(MCF-7、MDA-MB-231、4T1)后,IC₅₀ 值分别为 7.90 μM、4.05 μM、3.12 μM,特别是作用于 MDA-MB-231 细胞系时发现其抗肿瘤作用略微强于紫草素本身(SK,IC₅₀=5.01±0.23 μM)。之后进行了划痕实验,可明显看出随着药物浓度的增加,细胞的迁移速度明显下降,划痕愈合率逐渐降低,可见 Z-1-2 显著影响了 MDA-MB-231 的迁移能力。而在凋亡实验中,也可看出凋亡率随着浓度的增加逐步上升。以上结果表明,新型 2-氨基-2-脱氧葡萄糖苷紫草素衍生物 Z-1-2 在抑制 TNBC MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和促进细胞凋亡方面具有潜在的应用价值。

由于 TNBC 的侵袭性,需要努力优化治疗组合,而 TNBC 的生物异质性证明精准医疗治疗方法可以实现这一目标^[16]。对 TNBC 代谢重编程的研究表明,与其他乳腺癌亚型相比,该亚型更依赖于糖酵解。向糖酵解表型的转变促进了 ATP 的快速生成,并产生了足够的糖酵解中间产物以满足过度增殖的合成需

求^[17-18]。因此,抑制 TNBC 中的糖酵解是一种有前景的治疗策略。有研究表明紫草素与 2-氨基-2-脱氧葡萄糖都可影响糖酵解进程^[19-20],并且紫草素具有特异性抑制剂糖酵解途径中 PKM2 的作用,因此本研究猜测在二者的协同作用下 Z-1-2 可能通过影响糖酵解进程而表现出抗增殖、迁移和促进细胞凋亡的作用,这将为后续研究方向进一步研究。

在本研究中,合成并证实了 2-脱氧-2-氨基葡萄糖苷紫草素衍生物 Z-1-2 对 TNBC 具有显著的抗增殖、迁移和促进细胞凋亡作用,然而,本项研究的局限性以及未来值得关注的研究方向:一是本研究仅初步证实了 Z-1-2 对 TNBC 细胞系的抗肿瘤活性,未对其机制进行进一步的探究。二是本研究仅限于体外实验证实 Z-1-2 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响,而无法判断 Z-1-2 在体内经过转化后是否依旧具有优异的抗 TNBC 效应,需要通过体内实验加以验证。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.

[2] TRAPANI D, GINSBURG O, FADELU T, et al. Global challenges and policy solutions in breast cancer control [J]. Cancer Treat Rev, 2022, 104:102339.

[3] DAS V, BHATTACHARYA S, CHIKKAPUTTAIAH C, et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): a study from a structure, dynamics, and functional perspective [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (9): 14535-14555.

[4] BIANCHINI G, BALKO JM, MAYER IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a

- heterogeneous disease[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11):674-690.
- [5] GLUZ O, LIEDTKE C, GOTTSCHALK N, et al. Triple-negative breast cancer-current status and future directions[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(12):1913-1927.
- [6] YIN L, DUAN J J, BIAN X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1):61.
- [7] CAO L, NIU Y. Triple negative breast cancer; special histological types and emerging therapeutic methods[J]. *Cancer Biology Medicine*, 2020, 17:293-306.
- [8] COLLIGNON J, LOUSBERG L, SCHROEDER H, et al. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions[J]. *Breast Cancer* (Dove Med Press), 2016, 8:93-107.
- [9] KE L N, KONG L Q, XU H H, et al. Research progress on structure and anti-gynecological malignant tumor of shikonin[J]. *Front. Chem*, 2022, 10:935894.
- [10] NIE Y K, ZHU L S, YU H M. Shikonin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human HepG2 cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(12):1138-1146.
- [11] PAPAGEORGIOU V P, ASSIMOPOULOU A N, COULADOUROU E A, et al. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1999, 38(3):270-301.
- [12] KRETSCHMER N, HUFNER A, DURCHSCHEIN C, et al. Synthesis and pharmacological in vitro investigations of novel shikonin derivatives with a special focus on cyclopropane bearing derivatives[J]. *Int Mol Sci*, 2021, 22(5):2774.
- [13] HE H, BAI L P, JIANG Z H. Synthesis and human telomeric G-quadruplex DNA- binding activity of glucosaminosides of shikonin/alkannin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(4):1582-1586.
- [14] SHAO Y Y, YIN Y, LIAN B P, et al. Synthesis and biological evaluation of novel shikonin-benzo[b]furan derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 190:112105.
- [15] ALI M B, HAHN E J, PAEK K Y. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures[J]. *Molecules*, 2007, 12(3):607-621.
- [16] GONG Y, JI P, YANG Y S, et al. Metabolic-pathway-Based subtyping of triple-negative breast cancer reveals potential therapeutic targets[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(1):51-64, e9.
- [17] LUNT SY, VANDER HEIDEN MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27:441-464.
- [18] KROEMER G, POUYSSEGUR J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6):472-482.
- [19] DAI Y T, LIU Y P, LI J Y, et al. Shikonin inhibited glycolysis and sensitized cisplatin treatment in non-small cell lung cancer cells via the exosomal pyruvate kinase M2 pathway[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5):13906-13918.
- [20] 王升, 李丕武, 刘佃磊, 等. 利用发酵法生产氨基葡萄糖的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2014, 30(1):68-74.

收稿日期:2024-12-19;修回日期:2025-01-18

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:周莹,刘中,余定玥,等. HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展[J]. 右江民族医学院学报,2025,47(2):237-241.

【论著与临床报道】

HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗抑制 雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展

周莹,刘中,余定玥,于佳琪,张梓萌,李多杰

(蚌埠医科大学第一附属医院肿瘤放疗科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 探索组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂亚酰苯胺羟酸(SAHA)联合放疗抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展。方法 CCK-8 实验检测在雌激素受体阳性乳腺癌细胞(MCF-7)中 HDAC 抑制剂 SAHA 和最佳放疗剂量。随后细胞克隆实验检测各组的细胞活性情况。Western Blot 实验检测各组中蛋白 γ H2AX、Rad51 和 DNA-PK 的表达情况。彗星实验和 ER 标签检测各组是否发生 DNA 损伤修复。免疫荧光实验检测各组 γ H2AX 蛋白表达情况。结果 在加入不同剂量的 SAHA 后,其中 IC_{50} 为 $4.173 \mu\text{mol/mL}$,而最佳放疗剂量为 8 GY。CCK-8 和细胞克隆实验结果显示,相较于 NC 组,SAHA、IR 和 SAHA+IR 组中的细胞增殖率均下降($P < 0.05$);相较于 SAHA 和 IR 组,SAHA+IR 组中的细胞增殖率最低($P < 0.05$)。WB 结果提示,相较于 NC 组,SAHA 和 SAHA+IR 组中的 γ H2AX 表达上升,而 DNA-PK 和 Rad51 表达下降($P < 0.05$)。IR 组与 NC 组无差异($P > 0.05$)。随后彗星实验和 ER 标记实验显示,相较于 NC 组,SAHA、IR 和 SAHA+IR 组中的 DNA 损伤上升,而 SAHA+IR 组最明显($P < 0.05$)。免疫荧光实验进一步验证了 SAHA+IR 组中 γ H2AX 的表达最高($P < 0.05$)。结论 HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗加强了抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞恶性生物学进展。

关键词:亚酰苯胺羟酸;乳腺肿瘤;放疗;DNA 损伤修复

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0237-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.007

HDAC inhibitor SAHA combined with radiotherapy inhibits the progression of estrogen receptor-positive breast cancer cells

ZHOU Ying, LIU Zhong, YU Dingyue, YU Jiaqi, ZHANG Zimeng, LI DuoJie

(Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu
Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with radiotherapy on the progression of estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Methods** The CCK-8 assay was used to detect the HDAC inhibitor SAHA and the optimal radiotherapy dose in estrogen receptor-positive breast cancer cells (MCF-7). Subsequently, a colony formation assay was performed to assess cell viability in each group. The Western Blot assay was used to detect the expression levels of proteins γ H2AX, Rad51, and DNA-PK in each group. The comet assay and ER labeling were used to detect whether DNA damage repair occurred in each group. The immunofluorescence assay was used to detect the expression of γ H2AX protein in each group. **Results** After the addition of different doses of SAHA, the IC_{50} was found to be $4.173 \mu\text{mol/mL}$, and the optimal radiotherapy dose was 8 GY. The results of the CCK-8 and cell cloning experiments indicated that, compared to the NC group, the cell proliferation

基金项目:蚌埠医学院科技项目自然科学类(2020byzd094)

第一作者:周莹,住院医师,研究方向:肿瘤放疗,E-mail:15395272182@163.com

通讯作者:李多杰,博士,主任医师,研究方向:颈部肿瘤、食管癌、肺癌、乳腺癌等疾病的治疗,E-mail:liduojie@163.com

tion rates in the SAHA, IR, and SAHA+IR groups decreased ($P < 0.05$); compared to the SAHA and IR groups, the cell proliferation rate in the SAHA+IR group was the lowest ($P < 0.05$). Western Blot results suggested that, compared to the NC group, the expression of γ H2AX increased in the SAHA and SAHA+IR groups, while the expression of DNA-PK and Rad51 decreased ($P < 0.05$). There was no difference between the IR group and the NC group ($P > 0.05$). Subsequently, the comet assay and ER labeling experiment showed that, compared to the NC group, DNA damage increased in the SAHA, IR, and SAHA+IR groups, with the most significant increase observed in the SAHA+IR group ($P < 0.05$). Immunofluorescence experiments further confirmed that the expression of γ H2AX was the highest in the SAHA+IR group ($P < 0.05$).

Conclusion The combination of the HDAC inhibitor SAHA with radiotherapy enhances the inhibition of malignant biological progression in estrogen receptor-positive breast cancer cells.

Key words: suberoylanilide hydroxamic acid; breast neoplasms; radiotherapy; DNA damage repair

乳腺癌是危害女性健康的杀手之一。有研究表明,乙酰化修饰参与乳腺癌进展^[1],而组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)在结肠癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症中过度表达,使 HDAC 成为一个有吸引力的抗癌靶点^[2-4]。先前的研究已经证明 HDAC 抑制剂逆转异常表观遗传变化与各种癌症^[5],其中之一 HDAC 抑制剂亚酰苯胺羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid,SAHA)已被美国食品和药物管理局批准用于既往治疗失败的皮肤 T 细胞淋巴瘤患者^[6]。临床试验数据表明,SAHA 具有良好的耐受性和有限的毒性,停药后可迅速逆转药物导致的不良反应。SAHA 已被证明能抑制 HDAC 活性并增强多种细胞系的放射敏感性^[6]。最近,有报道称 SAHA 抑制三阴性乳腺模型的脑转移定植诱导 DNA 双链断裂(DS-Bs)^[7]。然而,SAHA 联合放疗对抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展的作用尚不明确,因此本研究拟探索 SAHA 通过抑制 DNA 损伤修复过程从而增强了雌激素受体阳性乳腺癌细胞对放疗敏感性,基于此,为乳腺癌治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 胎牛血清(货号:80230-6412,杭州四季青生物工程材料有限公司)、青一链霉素(货号:15140148,Gibco 公司,美国)、Cell Counting Kit-8(货号:C0038,上海碧云天生物科技股份有限公司)、RIPA 裂解缓冲液(货号:20-188,默克公司,德国)、BCA 蛋白检测试剂盒(货号:P0010,上海碧云天生物科技股份有限公司)、化学发光液 ECL 试剂(货号:SQ101,Epizyme 公司,美国)、 γ H2AX 一抗(货号:10856-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、Rad51 一抗(货号:14961-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、DNA-PK 一抗(货号:19983-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、GAPDH(货号:60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、CometSlide™(货号:4250-004-03,Trevigen 公司,美

国)、低熔点琼脂糖 CometAssay® LMAgarose(货号:4250-050-02,Trevigen 公司,美国)、CometAssay® Electrophoresis System(货号:4250-050-ES,Trevigen 公司,美国)、彗星实验试剂盒(货号:4250-050-k,Trevigen 公司,美国)、ER Tracker Blue-White DPX(货号:40761ES50,上海翊圣生物科技有限公司)、免疫荧光染色试剂盒(货号:P0186,上海碧云天生物科技股份有限公司)。

1.2 实验分组及细胞培养 根据实验需要,分为 NC 组(无任何处理的 MCF7 细胞)、SAHA 组(加入 4.173 μ mol/mL 浓度的 SAHA)、IR 组(以放疗剂量 8 GY 辐照)和 SAHA+IR 组(加入 4.173 μ mol/mL 浓度的 SAHA+放疗剂量 8 GY 辐照)。细胞 MCF7 细胞购自上海中科院细胞所,利用 DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素培养。辐照方式为待细胞培养至 70%~80%时,放入到 X 射线放射仪上,以不同剂量(2 GY、4 GY、6 GY、8 GY、10 GY)辐照细胞,所有细胞辐照后,继续培养 48 h 后进行细胞活性培养。同时,各组添加 0 μ mol/mL、1 μ mol/mL、3 μ mol/mL、5 μ mol/mL、7 μ mol/mL、9 μ mol/mL、11 μ mol/mL、13 μ mol/mL 的 SAHA,进行 IC₅₀验证。

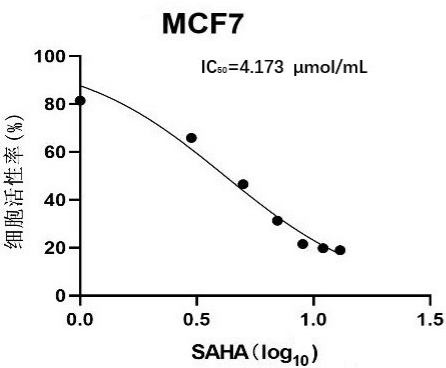
1.3 CCK-8 实验及细胞克隆实验 将处理好的各组细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 5 000 个细胞/孔,培养过夜。分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后,取出后避光每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,放入 37.5 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 2 h 后,在吸光度值 OD₄₅₀ 波段的酶标仪检测 OD 值。细胞存活率计算:存活率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times$ 100%。取各组细胞离心后,以 1 000 个/孔的密度种植于 6 孔板中,加入含 10%的培养基,随后培养 14 d。去上清后,加入 4%的多聚甲醛固定 30 min 后,加入 1:8 稀释后的结晶紫染液,染色 30 min 后 PBS 冲洗 3~4 遍,拍照计数。

1.4 彗星实验 细胞处理后收集用 0.2 mL 含 0.5%

低熔点 PBS 重悬琼脂糖。随后将混合物加入冷裂解液,按彗星实验试剂盒说明书操作,随后在电泳条件 300 mA, 25 V 下电泳 20 min。随后用 Tris-HCl 缓冲液清洗 2 遍,然后用溴化乙啶染色。用荧光显微镜观察。在 100 个细胞中评估了 DNA 损伤尾力矩(尾长乘以 DNA 的比例),使用 Image-Pro Plus 进行量化。

1.5 ER Tracker Blue-White DPX 染色 细胞用不同的处理方法处理 24 h。ERTracker Blue-White DPX (Molecular Probes, Eugene, OR)探针加入细胞中,在相同的生长条件下孵育 30 min。除去上样液,用 PBS 洗涤细胞。采用荧光显微镜采集显微图像。

1.6 Western Blot 实验 用含 EDTA 的 RIPA 裂解液裂解细胞,随后于 4 ℃低温离心机,以 12 000 r/min 转速离心 30 min 上清部分。BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。待定量后,高温煮沸 5 min,并在-20 ℃冰箱里冰冻 30 min。制作分离胶和浓缩胶,随后每个样品以 30 μg 的浓度加入到浓缩胶泳道内,以电压 200 V 电泳 30 min 左右,然后取出分离胶,并以“三明治”结构将分离胶和聚偏二氟乙烯膜(PDVF)膜夹入到转膜槽中。以 400 mA 电流强度转膜 1 h,然后用 5%脱脂牛奶包常温孵化 1 h,PVDF 膜与一抗 4 ℃孵育过夜。然后与二抗在室温下孵育 1 h,然后用增强型化学发光试剂进行检测。



注:ns: $P > 0.05$;与 0 GY 比较, $* P < 0.05$ 。
图 1 SAHA 的最适 IC₅₀ 和 GY 的最适疗程

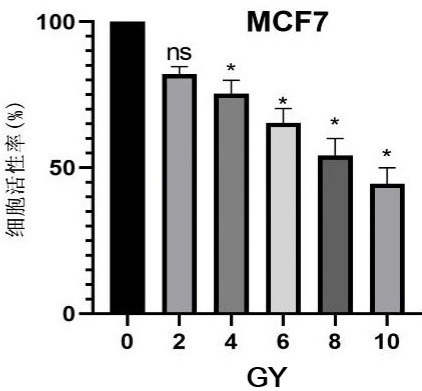
2.2 SAHA 可以增加放疗(IR)对于 MCF7 细胞增殖抑制效率 CCK-8 实验显示,相较于 NC 组,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组中 24 h、48 h 和 72 h 的增殖效率均下降($P < 0.05$),见图 2A。且相较于 SAHA 组和 IR 组,SAHA+IR 组中 24 h、48 h 和 72 h 的增殖效率下降较明显($P < 0.05$),见图 2A,而 SAHA 组和 IR 组无统计学差异($P > 0.05$)。通过细胞克隆实验检测发现,相较于 NC 组,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组中的细胞克隆数目均下降($P < 0.05$),见图 2B。且相较于 SAHA 组和 IR 组,SAHA+IR 组中细胞克

1.7 免疫荧光 在细胞培养板中加入圆形载玻片,随后将细胞种植于细胞培养板中,用 4%多聚甲醛固定,随后用 0.5% TritonX-100 通透 20 min,随后 PBS 冲洗 3 遍,用吸水纸吸干 PBS 后,在载玻片上滴上 5%的牛血清白蛋白(BSA),室温封闭 30 min。然后进行一抗孵育在 4 ℃冰箱过夜。PBST 洗涤 3 次后,应用荧光二抗孵化 2 h 后,荧光显微镜下拍照。

1.8 统计学方法 实验数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的,采用($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异用独立 t 检验进行分析。多组间比较采用单因素方差分析,组间比较利用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

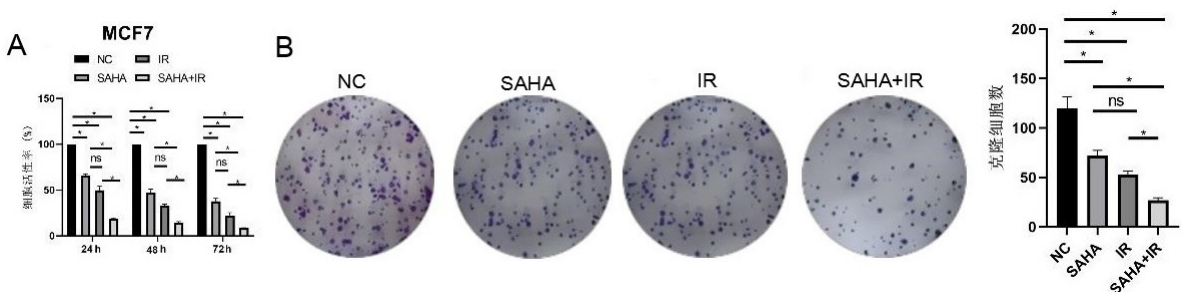
2.1 验证 SAHA 的最适效率和最佳放疗剂量 为选择最佳的药物浓度,本研究通过 CCK-8 实验寻找 SAHA 的最适 IC₅₀,以不同剂量(2 GY, 4 GY, 6 GY, 8 GY, 10 GY)辐照细胞,结果显示,最佳辐照剂量为 8 GY,见图 1。同时,各组添加 0 μmol/mL、1 μmol/mL、3 μmol/mL、5 μmol/mL、7 μmol/mL、9 μmol/mL、11 μmol/mL、13 μmol/mL 的 SAHA,进行 IC₅₀ 验证,实验结果显示,SAHA 的最适 IC₅₀ 为 4.173 μmol/mL,见图 1。



降数目下降($P < 0.05$),见图 2B,而 SAHA 组和 IR 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

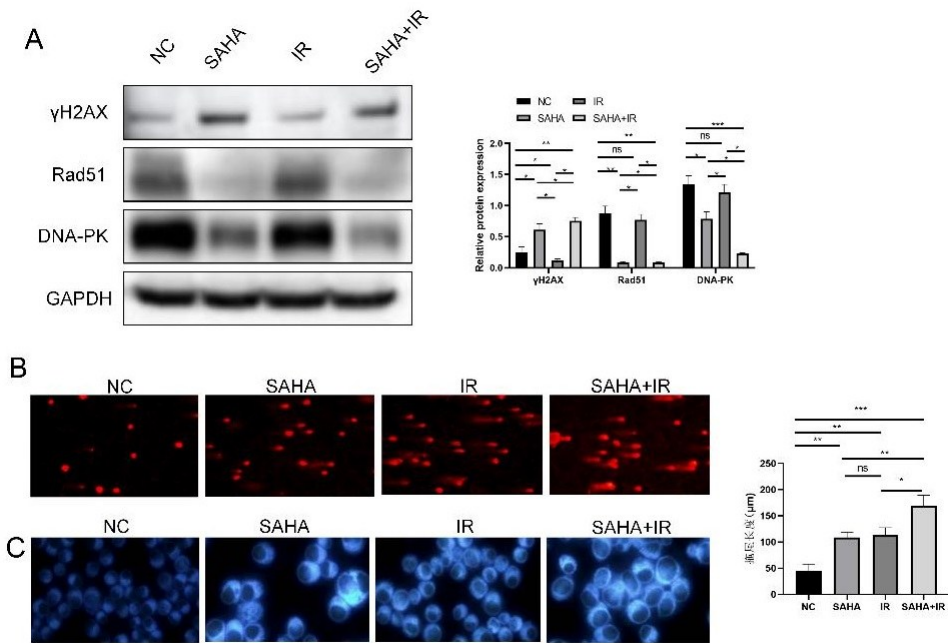
2.3 SAHA 和 IR 联合可以促进乳腺癌细胞中 DNA 损伤 结果显示,相较于 NC 组,SAHA 组和 SAHA+IR 组中 DNA 损伤标志物 γH2AX 表达升高,而 DNA 修复标志物 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低($P < 0.05$),见图 3A。彗星实验结果表明,与 NC 组相比,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组的拖尾长度均增加($P < 0.05$),而相较于 SAHA 和 IR 组,SAHA+IR 组的拖尾长度增加最明显($P < 0.05$),见图 3B。最后

通过免疫荧光检测 ER 标签对应的免疫荧光强度,与 NC 组相比,SAHA 组的免疫荧光强度较高,DNA 损伤程度较高。与 IR 组相比,SAHA+IR 组的免疫荧光强度较高,DNA 损伤程度较高,见图 3C。



注:A 为 CCK-8 实验计算各组的细胞增殖率;B 为细胞克隆实验验证各组的克隆细胞数。ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$ 。

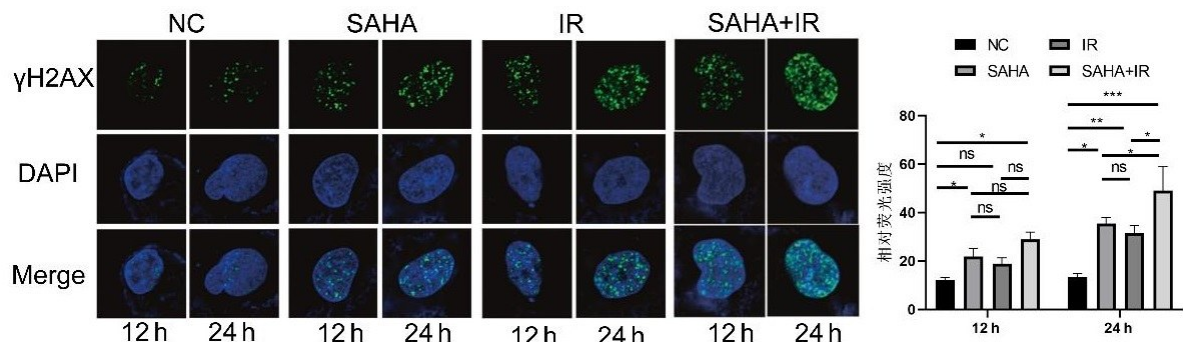
图 2 SAHA 可以增加 IR 对于 MCF7 细胞增殖抑制效率



注:A 为 WB 检测各组中 DNA 损伤相关蛋白表达;B 为彗星实验验证各组中拖尾现象;C 为 ER 标签显示各组中的内质网标记情况。ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 SAHA 和 IR 联合可以促进 DNA 损伤过程

2.4 SAHA 和 IR 联合可以促进 γ H2AX 的表达 结果显示,相较于 NC 组,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组中 γ H2AX 表达均上升,而 SAHA+IR 组上升最明显 ($P < 0.05$),见图 4。



注: ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 免疫荧光检测各组中 γ H2AX 的表达

3 讨论

组蛋白乙酰化作为一种常见的组蛋白翻译后修饰,通过调节染色质构象来刺激基因转录,与癌症的发生和发展密切相关^[8]。研究表明,HDAC 抑制剂能够显著地抑制 TNBC 细胞株的增殖并促进细胞凋亡^[9]。HDAC 抑制剂在 TNBC 中的抗肿瘤作用机制包括:诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调节免疫反应、抑制肿瘤细胞侵袭和转移以及诱导 DNA 损伤^[10-11]。本研究通过 HDAC 抑制剂 SAHA 可以阻断 DNA 双链断裂修复,去提升雌激素受体阳性乳腺癌的放疗敏感性,进而抑制肿瘤的增殖。

本研究通过寻找 SAHA 药物的最佳实验浓度和最佳放疗剂量,为后续的细胞实验奠定了实验基础。放疗是乳腺癌综合治疗方案中不可或缺的一部分,它在术前和术后都发挥着重要作用^[12]。因此,如何提高放疗的治疗效果和预防肿瘤复发都是重中之重。HDAC 抑制剂可以通过增加组蛋白乙酰化水平,影响染色质结构,从而调节 DNA 损伤,增加放疗的敏感性^[13]。在本研究中,SAHA 可以抑制乳腺癌细胞的增殖效率,同时,在放疗中,加入 SAHA 后,放疗抑制乳腺癌细胞的增殖效率明显升高,说明 SAHA 可以增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性。为进一步证明 SAHA 增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性的分子机制,WB 实验证明,加入 SAHA 后,修复相关的蛋白 γ H2AX、Rad51 和 DNA-PK,与 NC 组相比具有差异性表达,且 DNA 双链损伤标志 γ H2AX 的表达量增加,与修复相关蛋白 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低。同时检测在放疗情况下,加入 SAHA 后,DNA 双链损伤标志 γ H2AX 的表达量增加,与修复相关蛋白 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低。因此,本研究推测 SAHA 可以诱导乳腺癌细胞 DNA 损伤,并增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性。此外,本研究还通过彗星实验和免疫荧光实验对上述结果进行验证,实验结果与上述结果一致,更加证明了本研究的推测 HDAC 抑制剂 SAHA 通过阻断 DNA 双链断裂修复提升雌激素受体阳性乳腺癌的放疗敏感性。

本研究通过体外细胞实验证明,HDAC 抑制剂 SAHA 可以抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖,同时证明了 SAHA 可以诱导 DNA 的损伤,阻断 DNA 双链断裂修复提升雌激素受体阳性乳腺癌细胞的放疗敏感性。为临床上增加放射治疗三阴性乳腺癌敏感性的药物治疗,提供了理论基础。

参考文献:

[1] CHENG B B,PAN W,XIAO Y,et al. HDAC-targeting epigenetic modulators for cancer immunotherapy[J]. Eur

J Med Chem,2024,265:116129.
[2] KARATI D,MUKHERJEE S,ROY S. Emerging therapeutic strategies in cancer therapy by HDAC inhibition as the chemotherapeutic potent and epigenetic regulator[J]. Med Oncol,2024,41(4):84.
[3] GUADAGNI A,BARONE S,ALFANO A I,et al. Tackling triple negative breast cancer with HDAC inhibitors:6 is the isoform! [J]. Eur J Med Chem,2024,279:116884.
[4] TANG C,DU Y,LIANG Q,et al. Development of a novel histone deacetylase-targeted near-infrared probe for hepatocellular carcinoma imaging and fluorescence image-guided surgery[J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22 (3): 476-485.
[5] PANG Y H,SHI R Z,CHAN L J,et al. The combination of the HDAC1 inhibitor SAHA and doxorubicin has synergic efficacy in triple negative breast cancer in vivo[J]. Pharmacol Res,2023,196:106926.
[6] MANN B S,JOHNSON J R,HE K,et al. Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res,2007, 13(8):2318-2322.
[7] ZHU Z H,WU M R,SUN J,et al. Redox-sensitive iodinated polymersomes carrying histone deacetylase inhibitor as a dual-functional nano-radiosensitizer for enhanced radiotherapy of breast cancer[J]. Drug Deliv, 2021, 28 (1): 2301-2309.
[8] XIAO Y F,HALE S,AWASTHEE N,et al. HDAC3 and HDAC8 PROTAC dual degrader reveals roles of histone acetylation in gene regulation[J]. Cell Chem Biol,2023,30 (11):1421-1435. e12.
[9] ZHAO C,ZHANG Y,ZHANG J,et al. Discovery of novel fedratinib-based HDAC/JAK/BRD4 triple inhibitors with remarkable antitumor activity against triple negative breast cancer[J]. J Med Chem, 2023, 66 (20): 14150-14174.
[10] LU D H,QU L L,WANG C,et al. Harmine-based dual inhibitors targeting histone deacetylase (HDAC) and DNA as a promising strategy for cancer therapy[J]. Bioorg Chem,2022,120:105604.
[11] DENG Y,CHENG Q,HE J. HDAC inhibitors; Promising agents for leukemia treatment[J]. Biochem Biophys Res Commun,2023,680:61-72.
[12] ZHANG Z,LU M L,CHEN C L,et al. Holo-lactoferrin: the link between ferroptosis and radiotherapy in triple-negative breast cancer[J]. Theranostics, 2021, 11 (7): 3167-3182.
[13] CARLSSON M J,FAHRER J. Analyzing the effects of HDAC inhibitors on DNA damage and associated cytotoxicity in primary hepatocytes[J]. Methods Mol Biol, 2023,2589:241-252.

收稿日期:2024-12-02;修回日期:2025-02-03

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:陈丽羽,唐礼.不同尺寸钛颗粒对巨噬细胞 M1 极化的影响和机制探讨[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):242-248,256.

【论著与临床报道】

不同尺寸钛颗粒对巨噬细胞 M1 极化的影响和机制探讨

陈丽羽,唐礼

(广西医科大学口腔医学院/附属口腔医院,广西 南宁 530021)

摘要:目的 本研究旨在探讨纳米级和微米级的钛(Ti)颗粒对巨噬细胞 M1 极化的影响及其潜在机制。方法 分别采用 Ti 纳米颗粒(TiNPs)和 Ti 微米颗粒(TiMPs)处理 RAW264.7 巨噬细胞。利用 CCK-8 法检测细胞增殖情况;通过细胞形态学观察、RT-qPCR、ELISA、流式细胞术、Western Blot 研究 TiNPs 和 TiMPs 在促进巨噬细胞 M1 极化中的作用和机制。结果 与空白组(NC 组)比较,浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TiNPs 组和 TiMPs 组中 M1 型巨噬细胞标志物 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 的 mRNA 表达水平及 $IL-1\beta$ 的蛋白分泌量显著增加($P < 0.05$);其中,TiNPs 组的上述指标的表达水平显著高于 TiMPs 组($P < 0.05$)。此外,与 NC 组相比较,TiNPs 组中 p-p65 和 p-I κ B- α 的表达显著上调($P < 0.05$),且 M1 巨噬细胞标志物 CD86 表达上调($P < 0.05$)。结论 TiNPs 促进巨噬细胞向 M1 型极化,可能通过激活 NF- κ B 信号通路来实现。

关键词:巨噬细胞;钛颗粒;纳米颗粒;微米颗粒;种植体周炎;M1 极化

中图分类号:R329.24

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0242-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.008

Effects and mechanisms of titanium particles of different sizes on M1 polarization of macrophages

CHEN Liyu, TANG Li

(College & Hospital of stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of nanoscale and microscale titanium (Ti) particles on M1 polarization of macrophages and their underlying mechanisms. **Methods** RAW264.7 macrophages were treated with titanium nanoparticles (TiNPs) and titanium micron particles (TiMPs), respectively. Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay. The effects and mechanisms of TiNPs and TiMPs in promoting M1 polarization of macrophages were investigated through cell morphology observation, RT-qPCR, ELISA, flow cytometry and Western Blot. **Results** Compared with the normal control (NC) group, the mRNA expression levels of M1 macrophage markers $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, and $IL-6$, as well as the protein secretion of $IL-1\beta$, were significantly increased in the 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiNPs and TiMPs groups ($P < 0.05$). Among them, the expression levels of the aforementioned markers in the TiNPs group were significantly higher than those in the TiMPs group ($P < 0.05$). Additionally, compared with the NC group, the expressions of p-p65 and p-I κ B- α were significantly upregulated in the TiNPs group ($P < 0.05$), and the expression of the M1 macrophage marker CD86 was upregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** TiNPs promote macrophage polarization to the M1 phenotype, possibly through activation of the NF- κ B signaling pathway.

Key words: macrophages; titanium particles; nanoparticles; micron particles; peri-implantitis; M1 polarization

第一作者:陈丽羽,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:口腔种植和修复的研究,E-mail:chenly168@qq.com

通讯作者:唐礼,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:口腔种植临床研究和基础研究,E-mail:gxtangli@foxmail.com

口腔种植修复因美观、耐用以及较高的成功率,逐渐取代传统修复方式,成为牙列缺损和缺失患者的首选治疗方案^[1]。然而,种植修复广泛应用的同时也伴随着种植体周炎(perio-implantitis, PI)的发生。这是一种波及种植体周围软硬组织的炎症性疾病,最终导致种植体松动,是种植修复失败的主要原因^[2]。PI 的发病率在患者水平约为 20%,种植体水平约为 11.5%^[2]。目前学术界普遍认为,PI 是以微生物感染为主导,多种危险因素共同作用的慢性炎症反应,但其具体致病机制尚未明确^[3]。而深入探讨 PI 的病因学机制不仅有助于阐明其病理生理过程,更为该疾病的早期预防和有效治疗提供重要理论依据。

钛(titanium, Ti)及其合金是种植修复应用最广泛的生物材料,主要因为 Ti 表面可快速形成一层致密的二氧化钛,赋予材料优异的耐腐蚀性、机械性能,以及生物相容性^[1]。然而,在口腔的长期负载下,种植体表面发生机械磨损和电化学腐蚀,导致二氧化钛层被破坏并释放 Ti 颗粒(Ti particles, TPs)^[4]。这些微小的颗粒会被免疫细胞识别和诱发慢性炎症反应,进而导致 PI^[5]。研究表明^[6],这种异物反应主要由先天免疫系统介导,而巨噬细胞在其中起关键作用。巨噬细胞不需要抗原暴露即可直接吞噬磨损颗粒,且极化为促炎 M1 或抗炎 M2 两种主要的表型,产生细胞因子调节局部免疫微环境^[7]。病理学研究显示,在 PI 患者组织检测到的 TPs 浓度较健康种植体的高^[8],还发现明显的巨噬细胞极化现象,其中 M1 型巨噬细胞占主导地位^[9]。此外,免疫学研究表明 TPs 可通过调节淋巴细胞和巨噬细胞的极化使破骨细胞分化,导致骨整合失败^[1]。还有研究表示,纳米级金属颗粒与微粒相比,在炎症反应和细胞摄取等方面表现出更强的生物活性^[10],然目前关于 Ti 微米颗粒和纳米颗粒在巨噬细胞 M1 型极化中的作用及其差异性的研究仍较为有限。

基于上述研究背景,本研究拟从颗粒粒径这一关键因素出发,探讨 Ti 纳米颗粒(Titanium nano-particles, TiNPs)和 Ti 微米颗粒(Titanium micron particles, TiMPs)对巨噬细胞 M1 极化的影响及其潜在机制,以期为阐明 PI 的发病机制提供新的实验依据,并为临床防治策略的制定提供一些理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料 TiNPs(粒径 ≤ 60 nm,上海麦克林生化科技股份有限公司); TiMPs[纯度 $\geq 93\%$,粒径 < 20 μm ,阿法埃莎(中国)化学有限公司];小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞(上海酶研生物科技有限公司);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、内毒素检测试剂盒、彩色预染蛋白 marker(上海碧云天生物技术股份有限公司);逆转

录试剂盒、染料法 qPCR 预混液(北京康润诚业生物科技有限公司);小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司);胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基(赛默飞世尔科技有限公司);大肠杆菌脂多糖(LPS)、ECL 显色剂(广州硕谱生物科技有限公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、无蛋白封闭液、抗体稀释液(上海雅酶生物医药科技有限公司);兔抗鼠 β -actin、I κ B- α 、磷酸化 I κ B- α (p-I κ B- α)、p65、磷酸化 p65(p-p65)一抗、HRP 标记羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司)。抗小鼠 CD16/32、APC 标记抗小鼠 CD86、PE 标记抗小鼠 CD206 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 TPs 的处理 使用千分之一电子天平称量 TiNPs、TiMPs 颗粒各 3 次,取平均值。置于 75%乙醇溶液中浸泡 48 h,随后灭菌超纯水清洗、离心,180 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 24 h。冷却后加入无菌 PBS 溶液配制成 1 mg/mL 的母液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。取部分悬液采用鲎试剂法检测内毒素水平,结果显示内毒素含量均低于 0.5 EU/mL,排除对实验结果的干扰。实验前,将母液用完全培养基稀释,超声处理(40 kHz, 10 min)以获得均匀的颗粒混悬液。

1.2.2 细胞培养与分组 RAW264.7 巨噬细胞在含 10% FBS、1%青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱内培养。实验设 TiNPs 组、TiMPs 组、NC 组(空白组,仅含培养基)、LPS 组(阳性对照组,加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖)。

1.2.3 CCK-8 分析 TiNPs/TiMPs 对巨噬细胞增殖的影响 RAW264.7 细胞以 5×10^3 个细胞/孔均匀接种在 96 孔板内,培养 24 h 观察细胞贴壁后,分别加入 TiNPs、TiMPs 混悬液。根据预实验结果,浓度设为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度设 3 个复孔,并培养 24 h、72 h。避光条件下加入 CCK-8 试剂,孵育 1 h,使用酶标仪在波长 450 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.4 TiNPs/TiMPs 处理后巨噬细胞形态学分析 根据 CCK-8 实验结果,选择 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为实验浓度。RAW264.7 细胞以 5×10^4 个细胞/毫升均匀接种在 24 孔板内。24 h 细胞贴壁后,分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TiNPs、TiMPs 混悬液以及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 进行干预。继续培养 72 h 后,弃去原培养基,用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 4%多聚甲醛,倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.5 RT-qPCR 检测 M1、M2 型巨噬细胞标志物的 mRNA 表达 按 1.2.4 干预细胞 24 h 和 72 h 后收集细胞。采用 Trizol 试剂提取各组细胞的总 RNA,逆转

录合成 cDNA,使用 SYBR Green 染料法在荧光定量 PCR 仪上扩增。以 *GAPDH* 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 M1 型巨噬细胞标志物(*IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6*)和 M2 型巨噬细胞标志物(*IL-10*)的 mRNA 相对表达水平。所有引物由捷尼斯生物科技有限公司设计并合成(见表 1)。

表 1 引物序列

Gene	Orientation	Primer Sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	正向引物	GGCATTGTGGAAGGGCTCAT
	反向引物	ATGTCATCATACTTGGCAGGTT
<i>TNF-α</i>	正向引物	ATGTCCTCAGCCTCTTCTCATTC
	反向引物	GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA
<i>IL-1β</i>	正向引物	TTGAAGTTGACGGACCCCAA
	反向引物	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
<i>IL-6</i>	正向引物	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
	反向引物	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>IL-10</i>	正向引物	TTCTTTCAAACAAAGGACCAGC
	反向引物	GCAACCCAAGTAACCCCTTAAAG

1.2.6 ELISA 检测 M1 型巨噬细胞因子 *IL-1β*、*TNF-α* 的表达 按 1.2.4 干预细胞 24 h 和 72 h 后收集细胞上清液,每组取相同体积样本,使用小鼠 *IL-1β*、*TNF-α* 的 ELISA 试剂盒进行检测。最后使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值。根据标准曲线计算细胞因子浓度。

1.2.7 流式细胞术检测巨噬细胞 M1、M2 型标志物的表达 按 1.2.4 干预细胞 24 h 和 72 h 后收集细胞,经 200 目筛网过滤并调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/毫升。每组取 100 μL,加入 1 μL CD16/32 抗体,冰上避光孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次。加入 0.5 μL Fixable Viability Dye,4 ℃避光孵育 30 min 以区分活/死细胞,PBS 洗涤 3 次。加入 5 μL CD86 抗体,4℃避光孵育 30 min。PBS 洗涤后,加入 100 μL IC Fixation Buffer,4 ℃避光孵育 45 min。加入 1 mL 1 : 9(v/v) PBS 稀释的 Permeabilization Buffer,离心后 PBS 洗涤 3 次。加入 5 μL CD206 抗体,4 ℃避光孵育 45 min,PBS 洗涤 3 次。300 μL PBS 重悬,加入多聚甲醛至浓度 2% 进行固定。使用流式细胞仪检测,FlowJo 软件分析数据。

1.2.8 Western Blot 检测 *IκB-α*、p-*IκB-α*、p65 和 p-p65 蛋白表达水平 按 1.2.4 干预细胞 72 h 后收集细胞。使用含 1 mM PMSF 和 1×磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上裂解 25 min,离心(4 ℃,12 000 g,25 min)收集上清液。BCA 法检测各组蛋白浓度,并调至相同浓度。加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液,70 ℃变性 10 min。各组取 10 μg 蛋白,SDS-PAGE 胶 200 V、35 min 电泳分离,湿转法将蛋白移至 PVDF 膜上,封闭 15 min,TBST 洗涤 3 次。分别加入 1 : 1000 (v/v)稀释的一抗(抗 *IκB-α*、p-*IκB-α*、p65、p-p65 和 β-

actin 抗体),4 ℃孵育过夜。TBST 洗 3 次,加入 1 : 5000(v/v)稀释 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h。使用 ECL 显影,化学发光成像仪上采集图像。β-actin 为内参,使用 ImageJ 软件进行分析。

1.3 统计学方法 所有实验独立重复 3 次,结果以 ($\bar{x}\pm s$)表示,GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析和图表绘制。分析前使用 Shapiro-Wilk 检验评估数据的正态性,Bartlett 检验验证方差齐性。若数据符合正态且方差齐,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;对于不符合正态分布或方差不齐的数据,采用非参数秩和检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

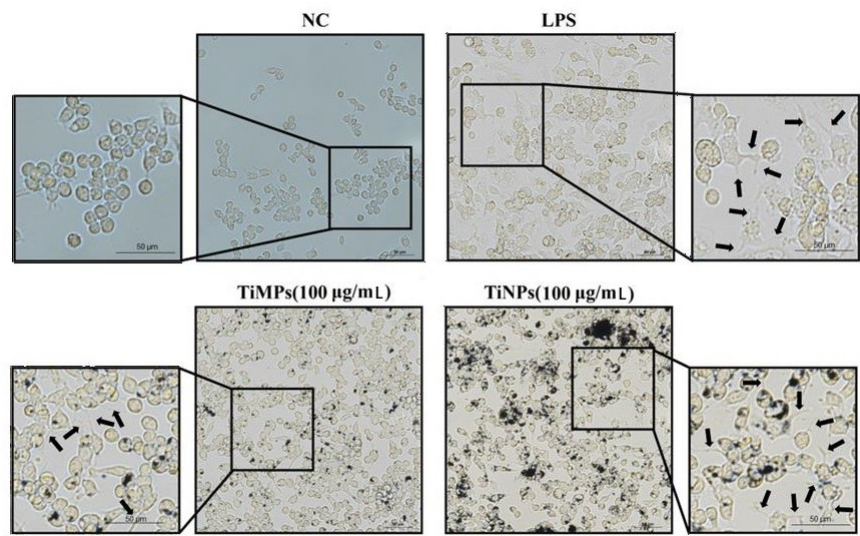
2 结果

2.1 TiNPs/TiMPs 处理后细胞形态分析 巨噬细胞具有可塑性和异质性,其形态学特征可作为评估表型极化的参考指标之一^[11]。各组处理后如图 1 所示,NC 组主要表现为未极化的 M0 型巨噬细胞特征,细胞呈圆形或椭圆形,胞体较小,可见少量短小突起,细胞核相对较小。LPS 组中,大部分呈现典型的 M1 型巨噬细胞形态,细胞体积增大,形态不规则,在多个方向伸出细长的伪足。TiMPs 组和 TiNPs 组中,均观察到明显的颗粒吞噬现象,胞质内可见大量黑色 Ti 颗粒沉积。此外,一部分细胞表现出与 M1 型巨噬细胞相似的形态学特征,包括细胞体积增大和伪足延伸等。这些观察结果初步表明,两种尺寸的 TPs 可能诱导巨噬细胞向 M1 型极化。

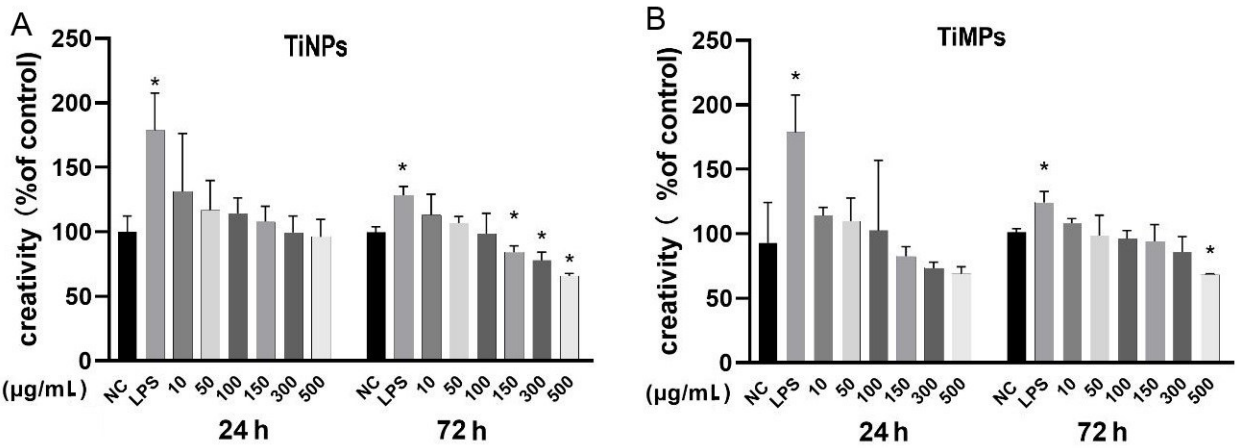
2.2 各浓度 TiNPs/TiMPs 对巨噬细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法检测不同浓度 TiNPs/TiMPs 对 RAW264.7 细胞活力和增殖的影响。如图 2 所示,干预 24 h 后,TiNPs 和 TiMPs 处理组与 NC 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。图 2A 示干预 72 h 后,TiNPs 在浓度 150 μg/mL、300 μg/mL、500 μg/mL 对细胞增殖产生抑制作用($P<0.05$)。图 2B 示干预 72 h 后 500 μg/mL TiMPs 对细胞增殖有抑制作用($P<0.05$)。基于以上结果,选择 100 μg/mL 作为后续的实验浓度。

2.3 TiNPs/TiMPs 对 M1、M2 型巨噬细胞标志物 mRNA 表达的影响 RT-qPCR 检测结果如图 3 所示,TiNPs 刺激巨噬细胞 24 h 和 72 h 后,与 NC 组相比,M1 型巨噬细胞标志物 *IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6* 的 mRNA 表达水平均显著升高,且呈现时间依赖性,并且显著高于 TiMPs 组($P<0.05$);而 M2 标志物 *IL-10* 的表达与 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。TiMPs 刺激巨噬细胞 24 h 和 72 h 后,与 NC 组相比,*TNF-α*、*IL-6* 的表达逐渐升高($P<0.05$);在 72 h 时 *IL-1β* 的表达也升高($P<0.05$);*IL-10* 的表达与 NC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

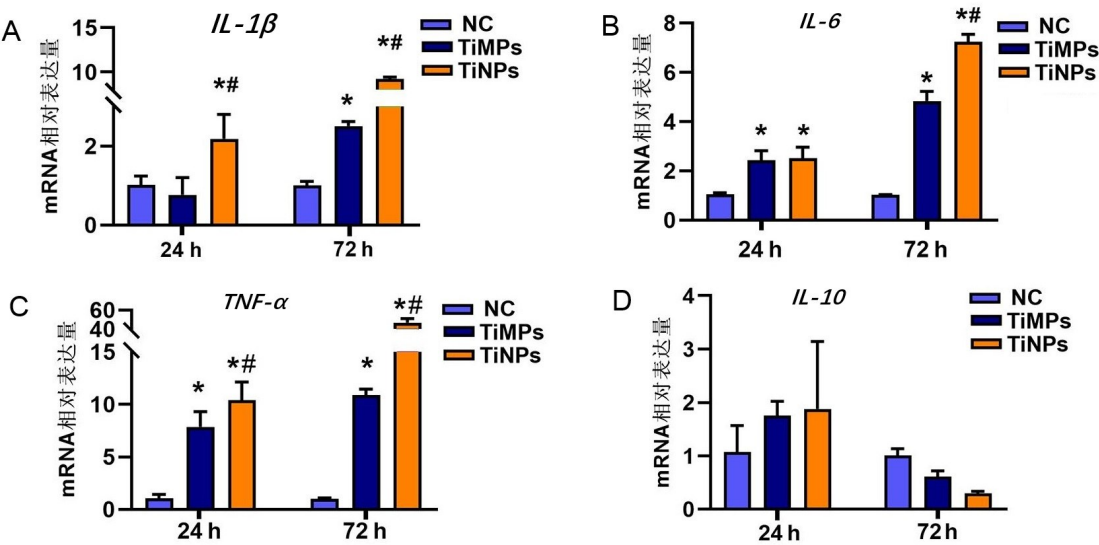


注：黑色箭头指示巨噬细胞伪足(比例尺=50 µm)。
图 1 不同处理组 RAW264.7 细胞的形态学观察(×40)



注：A 为 TiNPs 干预 24 h、72 h 后的细胞活力；B 为 TiMPs 干预 24h、72h 后的细胞活力。
与 NC 组比较，* $P < 0.05$ 。

图 2 TiNPs/TiMPs 对 RAW264.7 细胞增殖的影响

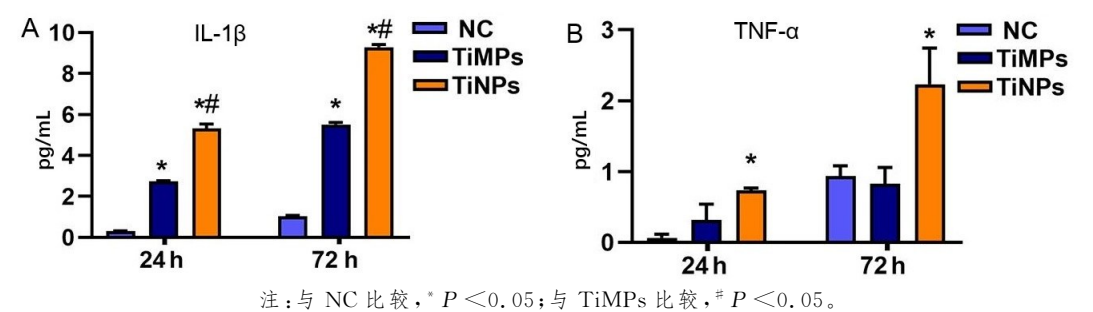


注：与 NC 比较，* $P < 0.05$ ；与 TiMPs 比较，# $P < 0.05$ 。

图 3 TiNPs/TiMPs 对巨噬细胞极化标志物 mRNA 表达的影响

2.4 TiNPs/TiMPs 对促炎细胞因子表达的影响
ELISA 检测结果如图 4 所示,与 NC 组相比,TiNPs 处理促进了促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌,在 24 h 和 72 h,TiNPs 组的 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平均显著上

调($P < 0.05$),且显著强于 TiMPs 处理组($P < 0.05$)。TiMPs 在 24 h 和 72 h 后仅诱导 IL-1 β 分泌的显著增加($P < 0.05$),对 TNF- α 的表达无显著影响($P > 0.05$)。

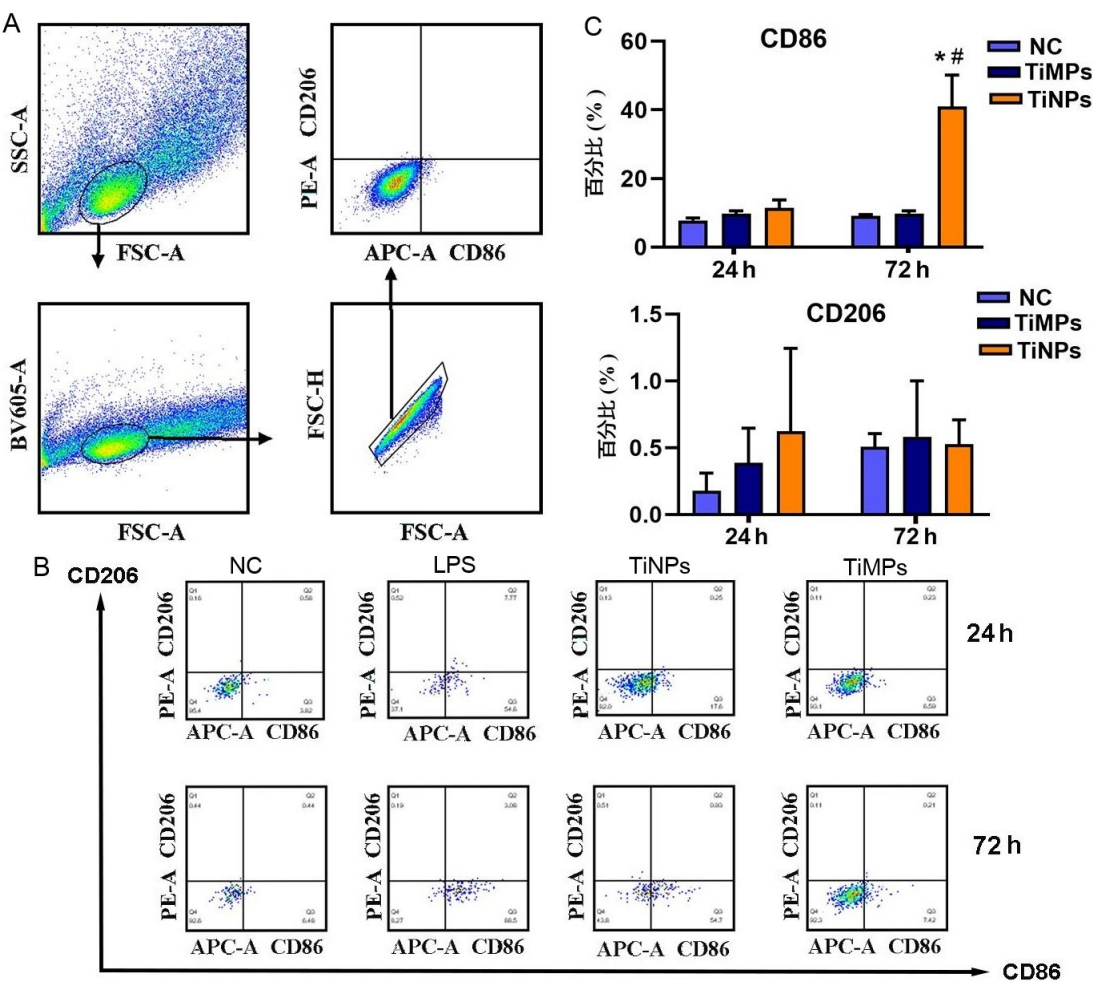


注:与 NC 比较,* $P < 0.05$;与 TiMPs 比较,# $P < 0.05$ 。

图 4 TiNPs/TiMPs 对细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 分泌的影响

2.5 TiNPs/TiMPs 对 M1、M2 型巨噬细胞标志物表达的影响
与 NC 组比较,TiNPs 处理 72 h 后显著上调了 M1 型巨噬细胞标志物 CD86 的表达水平($P < 0.05$),而 TiMPs 处理组的 CD86 表达与 NC 组相比差

异无统计学意义($P > 0.05$)。另外各组间 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达水平与 NC 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 5。

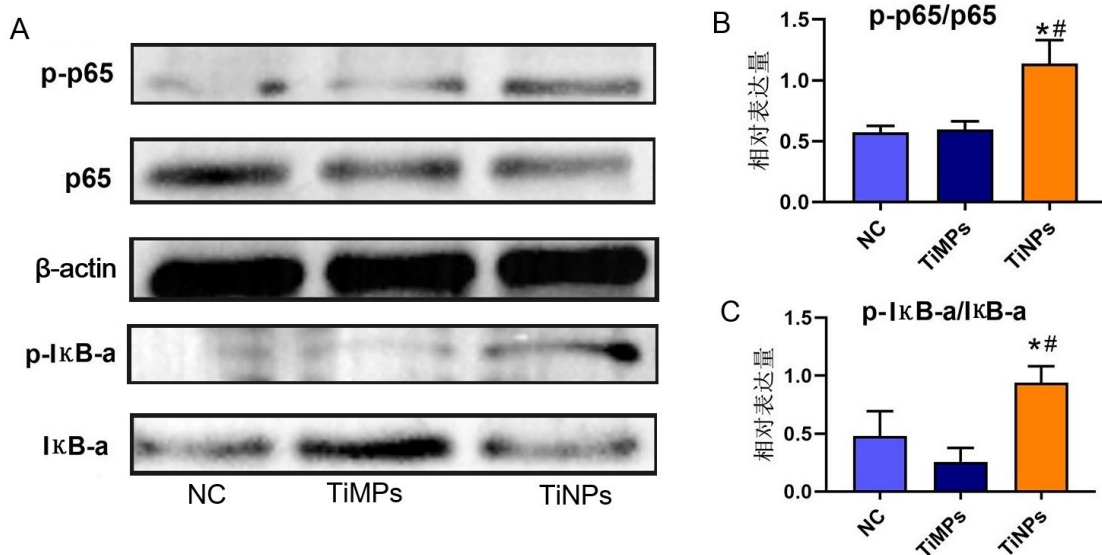


注:A.流式细胞术圈门过程图;B.各组 24 h、72 h 的流式细胞术结果图;C.各组 24 h、72 h 流式细胞术 M1、M2 巨噬细胞标志物 CD86、CD206 的统计图。与 NC 比较,* $P < 0.05$;与 TiMPs 比较,# $P < 0.05$ 。

图 5 流式细胞术分析 TiNPs/TiMPs 对巨噬细胞极化的影响

2.6 TiNPs/TiMPs 对巨噬细胞 I κ B- α 、p-I κ B- α 、p65 和 p-p65 蛋白表达的影响 Western Blot 分析结果如图 6 所示,与 NC 组相比 TiNPs 处理显著提高了 p-

p65/p65 和 p-I κ B- α /I κ B- α 的相对表达水平 ($P < 0.05$)。而 TiMPs 处理组与 NC 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:在静息时 p50/p65 二聚体与 I κ B 结合在胞质内,当 NF- κ B 信号通路被激活后,I κ B 磷酸化并降解,使二聚体移至核内,因此 p-p65 和 p-I κ B- α 可指示 NF- κ B 通路的激活状态^[12]。A 为 p-I κ B- α 、I κ B- α 、p65 和 p-p65 的 Western Blot 图像;B 为 p65/p-p65 的统计分析图;C 为 p-I κ B- α /I κ B- α 的统计分析图。与 NC 比较,* $P < 0.05$;与 TiMPs 比较,# $P < 0.05$ 。

图 6 各组 I κ B- α 、p-I κ B- α 、p65 和 p-p65 的蛋白表达和分析

3 讨论

成功的骨整合目前被认为是植入物与宿主免疫之间的动态平衡状态,即在植入物周围形成骨组织,使其与机体相隔离^[3]。若该平衡被打破,骨吸收速率将超过骨形成速率,种植体周围的骨质会逐渐流失,最终发展为 PI^[3]。这一病理过程主要受到免疫系统调控,其中巨噬细胞作为先天免疫系统的重要组成部分,通过调节其极化状态来影响种植体周围骨组织的稳态^[7]。M1 型巨噬细胞具有强大的吞噬功能,通过分泌促炎因子、活性氧等物质,不仅激活炎症信号通路和募集其他免疫细胞,还能促进破骨细胞的分化和活化^[13]。长期处于 M1 极化状态可能导致慢性骨吸收。而 M2 巨噬细胞产生的抗炎因子(如 IL-4、TGF- β 和 IL-10)可抑制破骨细胞活性,促进组织的修复和再生^[14]。

在 PI 患者病变组织的活检中显示,TPs 是主要的异物成分^[1]。大部分 TPs 的粒径在十几纳米到数百微米不等^[6,15]。研究表明^[16],颗粒尺寸与免疫反应强度密切相关,当 TPs 从种植体表面脱落后,其生物惰性将发生改变,表现出一定的免疫原性。尤其粒径 $< 20 \mu\text{m}$ 时,能促进多种炎症介质的分泌,包括髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)和核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)等^[17]。其中亚微米级和纳米级($< 1 \mu\text{m}$)颗粒因具有更大的表

面积与体积比,表现出更强的生物反应性,比如引发炎症和异物反应^[14]。本研究结果显示,TiNPs 促进巨噬细胞向 M1 型极化,促炎作用明显强于 TiMPs,这与先前的研究结果一致,提示 TPs 在诱发 PI 的反应过程中,TiNPs 可能是主要的效应介质。

对于微粒和纳米颗粒,巨噬细胞的处理机制存在差异,将影响其极化状态。较大的微粒($10 \sim 100 \mu\text{m}$)单个巨噬细胞无法吞噬时,多个巨噬细胞会形成异物巨细胞将其包裹后处理^[13]。该过程复杂,涉及由多种细胞分泌的细胞因子,如 IL-4 和 IL-13 作用下巨噬细胞的趋化、融合和内化等^[18-19],但本研究仅采用单一细胞系进行实验,缺乏其他细胞的协同作用,可能是 TiMPs 组中未能观察到明显极化现象的重要原因。此外,与微粒相比,只有纳米级 TPs 能够进入细胞核,引起 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰等表观遗传改变,从而影响炎症、细胞增殖等生物进程^[6]。同时,TiNPs 还引起异物反应,促使多种介质,如促炎因子、趋化因子的表达^[7]。以上步骤可激活下游的 NF- κ B、MAPK 等多个极化相关的信号通路^[20]。NF- κ B 信号通路作为炎症与免疫应答的重要通路,在本研究中可能是 TiNPs 调控巨噬细胞极化的关键靶点。实验结果显示 TiNPs 通过上调 p65 和 I κ B- α 的磷酸化,促使 NF- κ B 二聚体的核转位,从而激活该通路并诱导巨噬

细胞向促炎 M1 表型极化。伴随促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)及 CD86 的表达升高,但 CD206 的表达与 NC 组相比未见显著差异。CD206 作为 M2 型巨噬细胞特异性甘露糖受体,其表达受 NF- κ B 通路负向调控,抑制此通路可促使巨噬细胞向 M2 型极化并上调 CD206^[21-22]。而 NF- κ B 通路上调了 CD86 的表达,CD86 是 M1 型巨噬细胞表面的共刺激分子,可激活 T 细胞和增强免疫应答^[23]。NF- κ B 通路通过调控 M1/M2 的极化,影响局部组织的免疫应答^[22]。由于 M1 型巨噬细胞会分泌多种细胞因子,通过旁分泌加剧周围组织的损伤,还可通过自分泌维持其 M1 表型^[20-24]。若种植体周围微环境中长期保持 M1 极化的状态,可能引起局部慢性骨吸收,最终发展为 PI^[7]。虽然其具体机制仍需深入研究,但 TiNPs 通过激活 NF- κ B 信号通路引起 M1/M2 平衡失调,进而引起异物反应和骨吸收,可能是未来 PI 治疗的一个潜在靶点。

本研究仍存在局限之处。首先,TPs 在 PI 中的致病机制复杂,涉及多种免疫细胞以及多个信号通路的相互作用,需要更全面、更详细的实验设计和研究方案来进一步阐明;其次,本研究为体外实验,缺乏体内实验的进一步验证;此外,PI 的病程一般较长,由于条件限制,本研究设置的观察时间点较短,无法全面反映完整的动态变化过程。未来还需对上述不足进行必要的优化与改进。

参考文献:

- [1] KHEDER W, BOUZID A, VENKATACHALAM T, et al. Titanium particles modulate lymphocyte and macrophage polarization in peri-implant gingival tissues[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(14): 11644.
- [2] DIAZ P, GONZALO E, VILLAGRA L J G, et al. What is the prevalence of peri-implantitis? a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Oral Health, 2022, 22(1): 449.
- [3] IVANOVSKI S, BARTOLD P M, HUANG Y S. The role of foreign body response in peri-implantitis: what is the evidence? [J]. Periodontol, 2000, 2022, 90(1): 176-185.
- [4] GAUR S, AGNIHOTRI R, ALBIN S. Bio-tribocorrosion of titanium dental implants and its toxicological implications: a scoping review [J]. Sci World J, 2022, 2022: 4498613.
- [5] GAO J J, WU P, CHI Y J, et al. LY450139 inhibited Ti-particle-induced bone dissolution via suppressing Notch and NF- κ B signaling pathways [J]. Calcif Tissue Int, 2022, 111(2): 211-223.
- [6] CHEN L, TONG Z A, LUO H K, et al. Titanium particles in peri-implantitis: distribution, pathogenesis and prospects[J]. Int J Oral Sci, 2023, 15(1): 49.
- [7] SUPRA R, AGRAWAL D K. Innate Immune response in

- orthopedic implant failure[J]. J Orthop Sports Med, 2023, 5(1): 9-19.
- [8] ASA'AD F, THOMSEN P, KUNRATH M F. The role of titanium particles and ions in the pathogenesis of peri-implantitis[J]. J Bone Metab, 2022, 29(3): 145-154.
- [9] RAKIC M, RADUNOVIC M, PETKOVIC-CURCIN A, et al. Study on the immunopathological effect of titanium particles in peri-implantitis granulation tissue: a case-control study[J]. Clin Oral Implants Res, 2022, 33(6): 656-666.
- [10] KHEDER W, AL KAWAS S, KHALAF K, et al. Impact of tribocorrosion and titanium particles release on dental implant complications-A narrative review[J]. Jpn Dent Sci Rev, 2021, 57: 182-189.
- [11] YU D M, GUO S, YU M, et al. Immunomodulation and osseointegration activities of Na₂TiO₃ nanorods-arrayed coatings doped with different Sr content[J]. Bioact Mater, 2022, 10: 323-334.
- [12] KHATUA S, SIMAL-GANDARA J, ACHARYA K. Understanding immune-modulatory efficacy *in vitro* [J]. Chem Biol Interact, 2022, 352: 109776.
- [13] REIFENRATH J, WELLMANN M, KEMPFERT M, et al. TGF- β 3 loaded electrospun polycaprolacton fibre scaffolds for rotator cuff tear repair: an *in vivo* study in rats [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1046.
- [14] ALBREKTSSON T, TENGVALL P, AMENGUAL L, et al. Osteoimmune regulation underlies oral implant osseointegration and its perturbation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1056914.
- [15] WU X X, CAI C J, GIL J, et al. Characteristics of particles and debris re-leased after implantoplasty: a comparative study[J]. Materials (Basel), 2022, 15(2): 602.
- [16] AMENGUAL-PENAFIEL L, CORDOVA L A, CONSTANZA JA-RA-SEPULVEDA M, et al. Osteoimmunology drives dental implant osseointegration: a new paradigm for implant dentistry[J]. Jpn Dent Sci Rev, 2021, 57: 12-19.
- [17] MESSOUS R, HENRIQUES B, BOUSBAA H, et al. Cytotoxic effects of submicron- and nano-scale titanium debris released from dental implants: an integrative review[J]. Clin Oral Investig, 2021, 25(4): 1627-1640.
- [18] ESLAMI-KALIJI F, HEDAYAT NIA N, LAKEY J R T, et al. Mechanisms of foreign body giant cell formation in response to implantable biomaterials[J]. Polymers (Basel), 2023, 15(5): 1313.
- [19] GHOSH M, MCGURK F, NORRIS R, et al. The implant-induced foreign body response is limited by cd13-dependent regulation of ubiquitination of fusogenic proteins[J]. J Immunol, 2024, 212(4): 663-676.

(下转第 256 页)

本文引文格式:章能胜,王金彬,叶红兵,等.九华黄精炮制前后化学成分差异研究[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):249-256.

【论著与临床报道】

九华黄精炮制前后化学成分差异研究

章能胜¹,王金彬²,叶红兵³

- (1. 安徽卫生健康职业学院医疗卫生技术系,安徽 池州 247099;
2. 中国药科大学药学院,江苏 南京 210009;
3. 安徽省合肥市食品药品检验检测中心,安徽 合肥 230088)

摘要:**目的** 基于超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS/MS),分析九华黄精九蒸九晒法炮制前后差异性化学成分。**方法** 在 UPLC-MS/MS 技术基础上结合统计学分析,以差异倍数(FC, $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$, $P < 0.05$)、变量权重值(VIP, $VIP > 1$, $P < 0.05$)为筛选条件,分析九华黄精九蒸九晒法炮制前后的差异性化学成分,探索其主要成分变化规律。**结果** 共检测到 2 173 个代谢物,主成分分析发现九蒸九晒后前 80 种(top 80)显著差异主要代谢物相对含量上调有 52 种,下调有 28 种,主要差异代谢物为生物碱、黄酮、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、脂质、有机酸等。**结论** 九华黄精九蒸九晒法炮制前后化学成分差异明显,并存在着一定的变化规律,此法可为后续炮制机制和药效研究提供科学依据。

关键词:九华黄精;九蒸九晒;中药炮制;化学成分

中图分类号:R283 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2025)02-0249-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.009

Study on the differences in chemical composition of *Polygonatum Cyrtonema* Hua in Jiuhua Mountain before and after processing

ZHANG Nengsheng¹, WANG Jinbin², YE Hongbing³

- (1. Department of Medical and Health Technology, Anhui Health College, Chizhou 247099, Anhui, China;
2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China;
3. Hefei Food and Drug Inspection and Testing Center of Anhui Province, Hefei 230088, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To analyze the differential chemical components in *Polygonatum Cyrtonema* Hua in Jiuhua Mountain (PCJH) before and after the method of steaming nine times and sun drying nine times using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** On the basis of UPLC-MS/MS technology combined with statistical analysis, with the fold change (FC, $FC > 1.5$ or $FC < 0.67$, $P < 0.05$) and variable importance in projection (VIP, $VIP > 1$, $P < 0.05$) as the screening criteria, the differential chemical components of PCJH before and after the the nine-steaming and nine-sun-drying method were analyzed to explore the change rules of its main components. **Results** A total of 2,173 metabolites were detected. Principal component analysis revealed that among the top 80 significantly different metabolites after steaming nine times and sun drying nine times, 52 showed upregulation and 28 showed downregulation in relative content. The main differential metabolites included alkaloids, flavonoids, amino acids and their derivatives, nucleotides and their derivatives, lipids, and organic acids, etc. **Conclusion** There are significant chemical component differences in PCJH before and after the nine-steaming and nine-sun-drying method, with certain variation patterns. This method can provide a scientific basis for the subsequent research on the processing mechanism and medicinal efficacy.

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学重点研究项目(KJ2020A1142);安徽省高校优秀人才支持计划项目(gxyq2020110)

第一作者:章能胜,硕士,副教授,研究方向:微生物与生物制药,E-mail:nszhang@126.com

Key words: *Polygonatum Cyrtone*ma Hua in Jiuhua Mountain; nine-steaming and nine-sun-drying method; traditional Chinese medicine processing; chemical components

黄精是一种传统经典的食药两用的草本植物,“以其得坤土之精粹”而得名^[1],在我国分布有 30 余种之多,作为中药使用的主要是滇黄精、黄精、多花黄精^[2]。九华黄精是指九华山及其周边地区生长的多花黄精,因九华山特有自然环境和佛学文化亦称地藏黄精,以其独特的药用价值和滋补功效而著称,入列安徽省“十大皖药”^[3]。九华黄精富含蛋白质、淀粉以及人体中必需的氨基酸、微量元素等营养物质^[4],食药两用,常以口服为主,但生品易刺激咽喉,致麻舌感,故以炮制品入药。九蒸九晒是九华黄精生品加工的主要方法,可降低其刺激性,既利于患者服用,又提升药效^[5]。但九蒸九晒炮制法以传统经验为主,缺乏科学全面的理论依据。本研究拟在 UPLC-MS/MS 技术基础上结合统计学分析,筛查九华黄精九蒸九晒炮制前后差异性化学成分,为后续炮制机制和药效研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药材 九华黄精生药材由安徽省青阳县中药材科技公司提供,采集于九华山及其周边地区,药材黄精经合肥市食品药品检验检测中心刘业飞主任中药师鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtone*ma Hua)。

1.2 主要实验试剂和仪器 W6-4 LC/MS 纯水,美国费希尔化学品公司(Fisher Chemical);A955-4 乙腈,美国费希尔化学品公司(Fisher Chemical);A452-4 甲醇,美国费希尔化学品公司(Fisher Chemical);A452-4 甲酸,日本东京化成工业株式会社(TCI);Q Exactive HF-X 质谱仪,美国赛默飞世尔科技公司(Thermo);Vanquish 超高压液相色谱仪,美国赛默飞世尔科技公司(Thermo);5430R 冷冻离心机,德国艾本德公司(Eppendorf);ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm,1.8 μm)色谱柱,美国沃特世公司(Waters)。

1.3 药材炮制 取生品九华黄精药材,除去杂质、异物,洗净,按料液比 1:5 用黄酒搅拌均匀,闷润待黄酒被九华黄精药材吸尽,再蒸制约 10 h(同时收集蒸制过程中流出的汁液),待药材中央发虚,于日光下晒约 8 h 至药材外皮微干,此为九华黄精一蒸一晒品。将九华黄精一蒸一晒品拌入上一步收集的汁液和适量黄酒,闷润至药材表面黄酒被吸收殆尽,取出于日光下晒约 8 h 待药材外皮微干为宜,此为九华黄精二蒸二晒品。依照此方法连续操作,直至得到九华黄精九蒸九晒品(见表 1)。除去首次、末次蒸制,其余蒸制过程所需黄酒的量约为总体的 70%。最后一次将剩余黄酒以及收集的汁液与药材搅拌均匀,蒸制至九华黄精药

材表面黑漆色、发亮为宜。

表 1 样品信息表

序号	样品	代号
1	一蒸一晒九华黄精	H_1
2	二蒸二晒九华黄精	H_2
3	三蒸三晒九华黄精	H_3
4	四蒸四晒九华黄精	H_4
5	五蒸五晒九华黄精	H_5
6	六蒸六晒九华黄精	H_6
7	七蒸七晒九华黄精	H_7
8	八蒸八晒九华黄精	H_8
9	九蒸九晒九华黄精	H_9
10	九华黄精鲜品	H_10

1.4 样品预处理 将样品在液氮中研磨至粉末状,准确称量样品粉末 100 mg 置于离心管中,加入 70%甲醇水溶液 1 mL,充分震荡 30 s,水浴超声波浸提 90 min,16 000 g 离心 10 min,将上清液用移液器转移至 96 孔 TECAN 蛋白过滤板,使用正压氮气过滤,取滤液于 EP 管中,真空冷冻干燥后将冻干品加入 40%甲醇水溶液 300 μL 溶解,16 000 g 离心 10 min,取上清液备用。

1.5 UPLC-MS 分析条件

1.5.1 色谱条件 将 1.4 预处理后样品采用 UPLC-MS/MS 进行分离。柱温为 25 ℃;流速为 0.3 mL/min;以 0.1%甲酸水溶液为流动相 A,0.1%甲酸乙腈溶液为流动相 B,按下表(见表 2)进行梯度洗脱。

表 2 色谱梯度洗脱程序表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
17.0	2	98
17.2	95	5
20.0	95	5

1.5.2 质谱条件 使用质谱仪(Q Exactive HF-X)采集样本一级、二级谱图。质谱仪与超高压液相色谱仪(UPLC)联用,电喷雾电离(ESI)分别进行正离子模式、负离子模式质谱采集。喷雾电压 3800 V(ESI+)/3500 V(ESI-),鞘气流量 40 L/min,离子传输管温度 320 ℃,雾化温度 350 ℃;检测方式为全扫描/数据依赖二级扫描(Full-MS/dd-MS2)模式,top 10 MS1 离子获得 MS/MS 谱图,碰撞能量(CEs)采用阶梯归一

化能级 20、40、60;一级质荷比扫描范围 90~1 300。

1.5.3 数据分析流程 参照侯红平等^[6]数据分析流程,对提取的化学物质进行结构鉴定,主要物质的鉴定结果需二次核对和确认。

2 结果与分析

2.1 外观与风味变化 随着蒸晒次数的增加,九华黄精表面颜色由棕黄色逐渐变暗,五蒸五晒后颜色变化

差异不大,变成了黑漆色(见图 1)。一蒸一晒至五蒸五晒之间随着蒸晒次数的增加,麻舌感逐渐消失,四蒸四晒之后产生甜味,七蒸七晒后逐渐产生苦涩味和酸味。九华黄精经九蒸九晒炮制后,风味酸甜,气味浓郁,无麻舌感。有学者认为这是热处理导致美拉德反应,引起了样品颜色和产物的改变^[7]。



注:a. H_1;b. H_2;c. H_3;d. H_4;e. H_5;f. H_6;g. H_7;h. H_8;i. H_9。

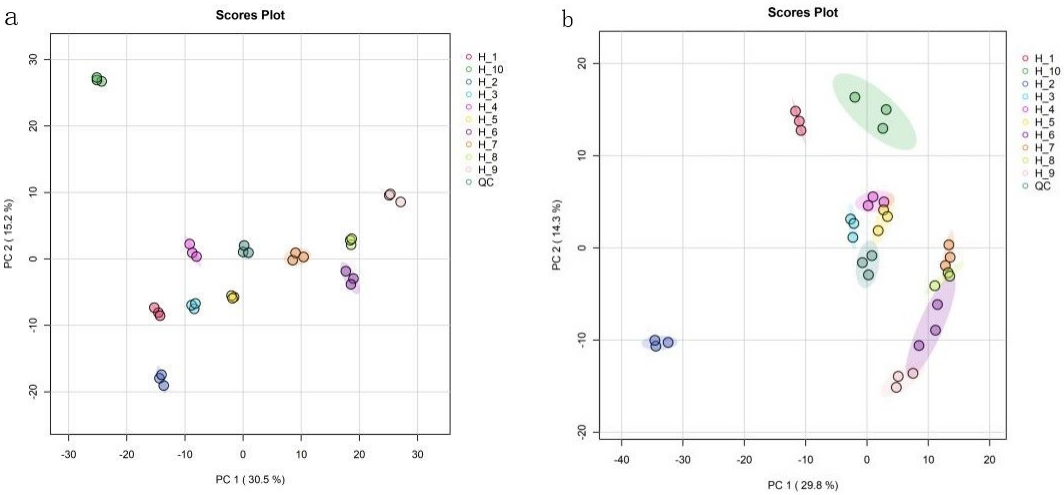
图1 九华黄精九蒸九晒炮制品

2.2 QC 样本检测 对 QC 样本提取峰进行 PCA 分析和 Pearson 相关性分析。PCA 分析结果(见图 2)发现正、负离子模式下 QC 样本紧密聚集在一起,Pearson 相关性分析结果(见图 3)表明 QC 样本间的相关性系数都在 0.99 以上,证实实验的重复性好。

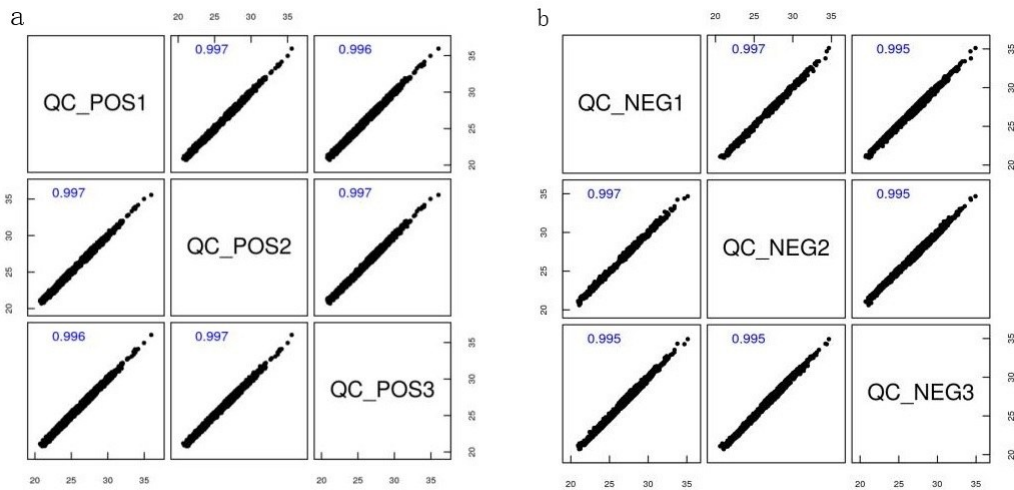
2.3 九蒸九晒炮制过程中九华黄精代谢物的主成分分析 九华黄精九蒸九晒炮制过程中共检测到 2 173 种代谢物,包括生物碱类化合物 648 种(29.82%),莽草酸和苯丙烷类化合物 317 种(14.59%),氨基酸和肽

类化合物 315 种(14.50%),萜类化合物 308 种(14.17%),脂肪酸类化合物 299 种(13.76%),聚酮类化合物 111 种(5.11%),其他化学物 175 种(8.05%)。为分析炮制前后化学成分差异,对其进行主成分分析,结果表明(见图 4)正离子模式下前 5 个主成分方差贡献率分别为 30.5%、15.2%、12.6%、6.6%和 5.9%,负离子模式下前 5 个主成分主成分方差贡献率分别为 29.8%、14.3%、9.9%、5.1%和 4.6%。正、负离子模式前 5 个主成分累计方差贡献率达 70.8%和 63.8%,

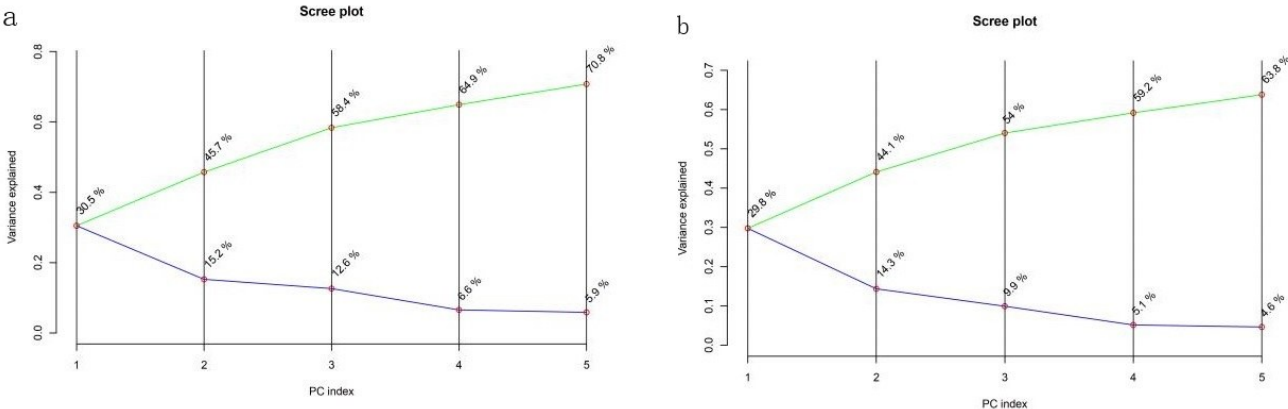
表明包含样本中多数代谢物信息。在正离子模式和负离子模式下,九蒸九晒炮制过程中样本点(H_1~H_9)与九华黄精生品样本点(H_10)之间距离较远,且不同蒸晒次数样品点间较分散,说明样品炮制过程中代谢物变化较明显,种类和含量差异较大。



注:a. 正离子模式总体样本 PCA 分析;b. 负离子模式总体样本 PCA 分析。
图 2 生品和炮制品 PCA 得分



注:a. 正离子模式 QC 样本相关性图;b. 负离子模式 QC 样本相关性图。
图 3 QC 样本相关性图

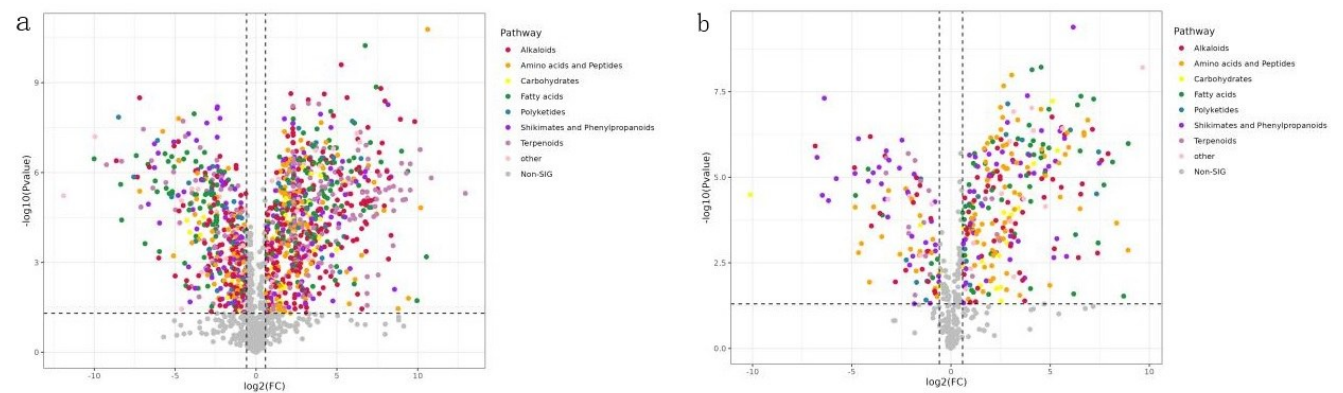


注:a. 正离子模式 PCA 贡献率图;b. 负离子模式 PCA 贡献率图。
图 4 主成分 PCA 贡献率图

为了鉴别主要差异代谢成分,又建立了正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),经 7 次循环交互验证(7-fold cross-validation),得到 R^2Y 、 Q^2 均 >0.99 ,表明模型稳定可靠。采用置换检验(Permutation test)对模型进行检验,OPLS-DA 模型的置换检验上 R^2Y 、 Q^2 数值均接近 1,说明模型准确性好。

基于单变量分析,对检测到物质进行差异分析,以火山图的形式来进行可视化展示[选择条件:差异倍数

(fold change,FC) >1.5 或 $FC<0.67$, $P<0.05$ 的差异物质)。为了直观便于观察差异物质的分类归属,用不同颜色来做区分(非显著差异物质用灰色来表示),示例比较组结果如图 5 所示(横坐标为差异表达倍数的 $\log_2$ 的对数值,纵坐标为显著性 P 值的 $-\log_{10}$ 的对数值),表明炮制品与生品在生物碱类、氨基酸和肽、糖类、脂肪酸等成分上存在差异。



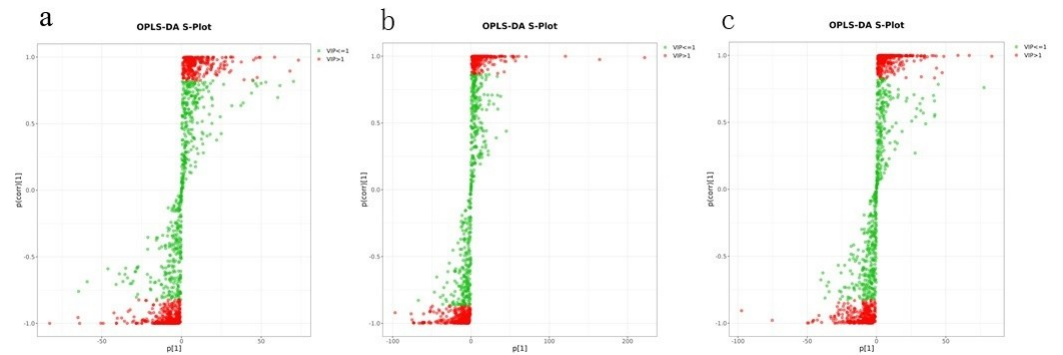
注:a.正离子模式火山图;b.负离子模式火山图

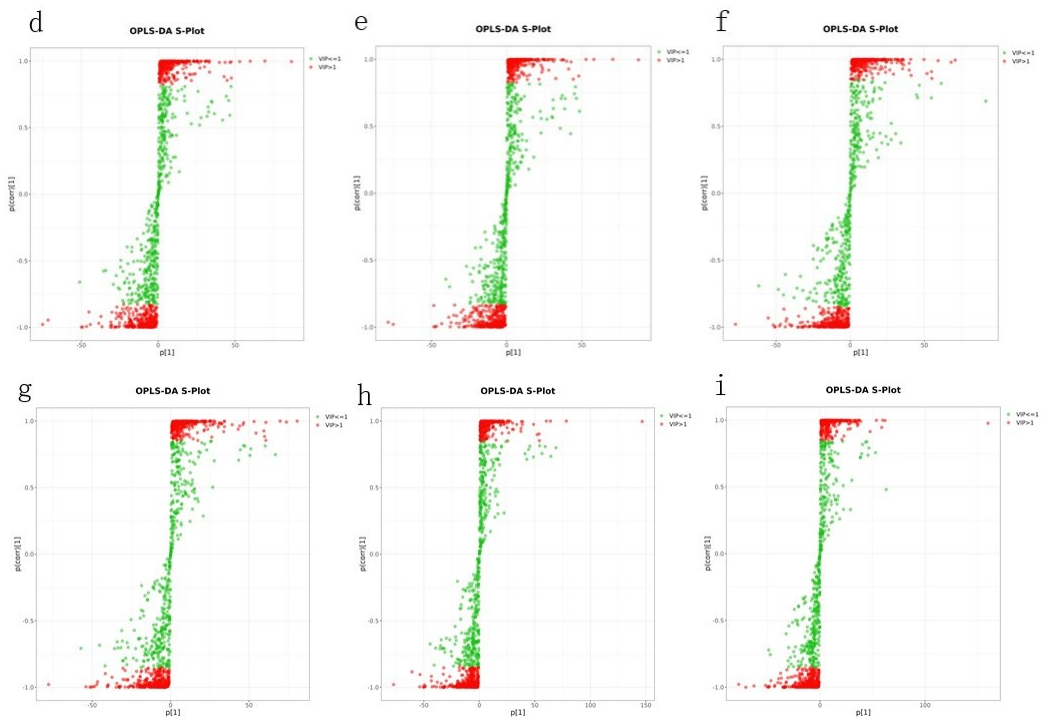
图 5 正、负离子模式火山图

2.4 筛选差异物质 为进一步挖掘具有生物学意义的差异代谢物,利用 OPLS-DA 模型中变量权重值(Variable Importance for the Projection,VIP)衡量各化学物质的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力^[8]。通过 OPLS-DA 分析得到的 S-plot 图(见图 6),越靠近左、右角的代谢物差异越显著,红色点代谢物的 $VIP\geq 1$,绿色点代谢物 $VIP<1$ 。以 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 为显著性差异化学物质筛选标准,筛选出炮制品中差异代谢物数(见表 3),结果显示一蒸一晒品与生品组间总差异化学物质数量最少,九蒸九晒品与生品组间总差异化学物质数量最大,随着蒸晒次数增加与生品组间总差异化学物质数量呈上升趋势。以柱状图(见图 7)表示 top 80 显著性差异物质的差异

倍数变化,结果表明九华黄精生品与炮制品 top 80 显著差异代谢物中以上调的显著差异代谢物为主。

在九华黄精生品与九蒸九晒品的比较组中,通过对比发现 top 80 显著差异主要代谢物相对含量上调有 52 种,其中,生物碱化合物 6 种,黄酮类化合物 2 种,氨基酸及其衍生物类化合物 6 种,核苷酸及其衍生物 5 种,脂质类化合物 12 个,有机酸类化合物 8 个,萜类化合物和木质素类化合物各 1 种,其他类化合物 11 种。代谢物相对含量下调有 28 种,包括生物碱化合物 5 种,黄酮类化合物 4 种,氨基酸及其衍生物类化合物 6 种,核苷酸及其衍生物化合物 4 种,脂质类化合物 3 个,有机酸类化合物 4 个,其他类化合物 2 种。





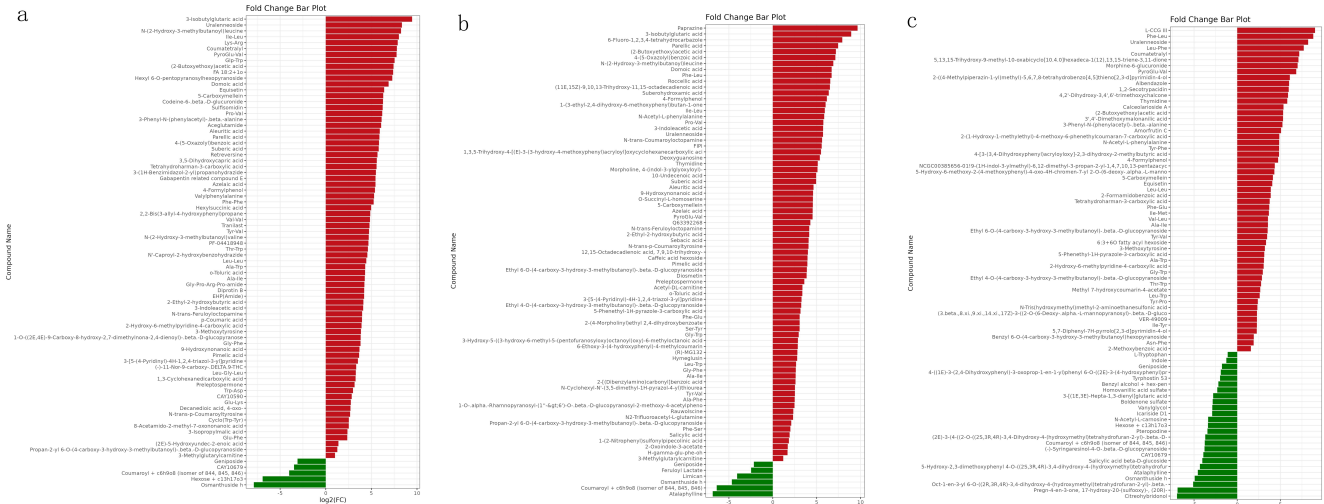
注：a. H_1 vs H_10 S-plot;b. H_2 vs H_10 S-plot;c. H_3 vs H_10 S-plot;
d. H_4 vs H_10 S-plot;e. H_5 vs H_10 S-plot;f. H_6 vs H_10 S-plot;
g. H_7 vs H_10 S-plot;h. H_8 vs H_10 S-plot;i. H_9 vs H_10 S-plot。

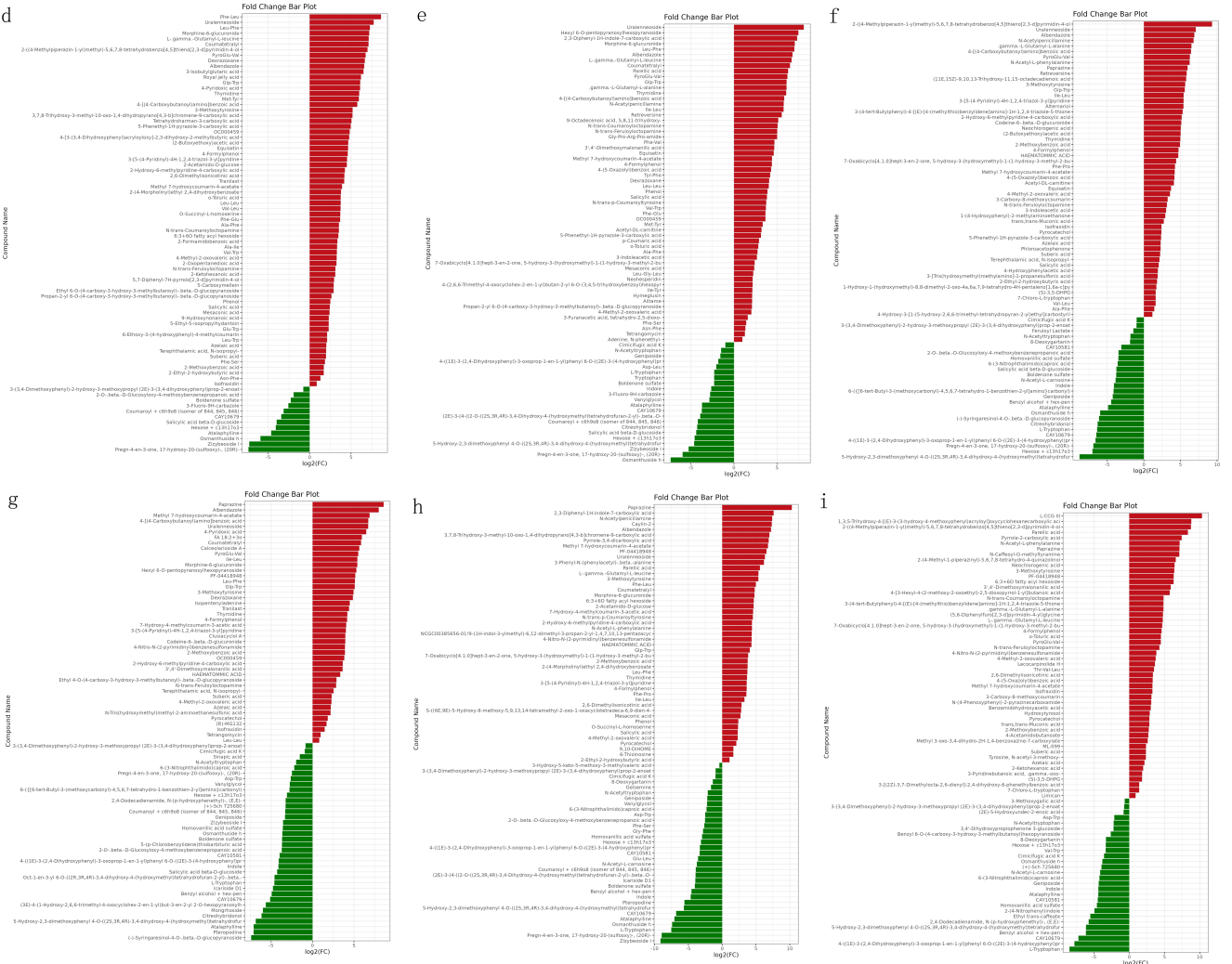
图 6 炮制品和生品 S-plot

表 3 组间比较分析表

序号	对比组	总差异化 学物质数量	top 80 显著差异代谢物变化数	
			上调	下调
1	H_1 vs H_10	1390	74(92.50)	6(7.50)
2	H_2 vs H_10	1491	75(93.75)	5(6.25)
3	H_3 vs H_10	1559	55(68.75)	25(31.25)
4	H_4 vs H_10	1667	68(85.00)	12(15.00)
5	H_5 vs H_10	1760	58(72.50)	22(27.50)
6	H_6 vs H_10	1783	54(67.50)	26(32.50)
7	H_7 vs H_10	1880	45(56.25)	35(43.75)
8	H_8 vs H_10	1890	47(58.75)	33(41.25)
9	H_9 vs H_10	1915	52(65.00)	28(35.00)

注：表内计数资料数据用[$n(\%)$]表示。





注：a. H₁ vs H₁₀; b. H₂ vs H₁₀; c. H₃ vs H₁₀; d. H₄ vs H₁₀; e. H₅ vs H₁₀;
f. H₆ vs H₁₀; g. H₇ vs H₁₀; h. H₈ vs H₁₀; i. H₉ vs H₁₀。

图 7 显著性差异物质表达差异倍数分析

3 讨论

“九蒸九晒”又称“九蒸九曝”，是古代本草中常见的一种药材炮制方法，该法将蒸晒结合并反复运用，使药材最大限度发挥疗效并减轻其毒副作用。研究发现九蒸九晒炮制过程中九华黄精代谢物的种类和含量差异变化较大，一蒸一晒品与生品组间总差异化学物质数量最少，九蒸九晒品与生品组间总差异化学物质数量最大，且随着蒸晒次数增加，与生品组间总差异化学物质数量呈上升趋势，这可能与蒸晒过程中，高温等因素导致大分子物质持续裂解成小分子物质有关。生品与炮制品组间显著差异代谢物中，以上调的显著差异代谢物为 1，差异代谢物主要为生物碱、黄酮、氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、脂质、有机酸等^[9]。

本课题组前期研究发现在九华黄精的九蒸九晒炮制过程中，由于水分减少总多糖相对含量会先增加后下降，葡萄糖和果糖等单糖相对含量先增加后保持稳定，炮制后期再有所下降。这可能是由于九华黄精中

的黏液质多糖会随着九蒸九晒过程的逐步水解成单糖和低聚糖，使得总多糖在炮制过程中消耗造成含量的降低。而低聚糖可进一步分解成小分子单糖，但炮制后期有部分单糖可能会参与美拉德反应导致其有所下降。九蒸九晒炮制后九华黄精黏液质多糖含量降低，可减少对喉咙刺激作用，单糖含量增加可提升甜味，使其服用口感更佳^[10]。炮制过程中氨基酸可能与可溶性的糖类化合物发生美拉德反应，含量不断减少，五蒸五晒后基本消耗殆尽，而五蒸五晒后颜色变化不明显，由此推测美拉德反应参与九华黄精九蒸九晒炮制过程中颜色变化^[11]。九华黄精九蒸九晒炮制后挥发性成分正己醛等含量下降，有学者研究认为正己醛正是黄精引起人咽喉刺激性的主要成分之一^[12]，推测正己醛含量下降是九蒸九晒炮制后九华黄精口感变佳的原因之一。九华黄精炮制后期有机酸类化合物相对含量显著增加，其中酚酸类化合物尤为明显，作为有机酸的一种，酚酸类化合物多为苦涩味，这可能与九华黄精炮制

后期产生苦涩味有关。

综上所述,九华黄精经过九蒸九晒炮制后,其化学成分发生了显著变化。这些变化不仅提高了其滋补功效,还使其更易于被人体吸收和利用。现代药理学研究发现,九华黄精经九蒸九晒炮制后可提升抗氧化^[13]、降血糖^[14]、调节免疫^[15]、抗动脉硬化^[16]、抗肿瘤^[17]等功效,上述药理学改变可能与炮制前后主要差异代谢物有关,但与药效关系需进一步研究。

参考文献:

[1] 赵祺,任仙樱,姜程曦. 九华黄精本草考证[J]. 中草药, 2018,49(17):4184-4188.

[2] ZHANG X N,SHI S H,ZHANG J L,et al. Effects of different processing methods on the quality of *Polygonatum cyrtonema* Hua [J]. TMR Mod Herb Med, 2024, 7(2): 10.

[3] 盛祥文,许兴旺,汪茜. 九华黄精种质资源保护与开发利用现状及对策[J]. 现代农业科技, 2023(22):52-55.

[4] 王晓慧,李帆,罗莎,等. 九华黄精的化学成分研究进展[J]. 特种经济动植物, 2019,22(7):21-23.

[5] 秦宇雯,袁玮,陆兔林,等. 九华黄精的炮制工艺沿革及现代研究[J]. 中草药, 2018,49(18):4432-4438.

[6] 侯红平,王彩霞,魏晓露,等. 高分辨非靶代谢组学方法研究臻通集胶囊对高脂血症模型大鼠的影响[J]. 中国现代中药, 2023,25(4):812-821.

[7] 彭佩瑾,闫媛,安广涛,等. 中药美拉德反应研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024,26(11):121-129.

[8] 闫玉珠,于燕,刘俊叶,等. 酒精性和激素性股骨头坏死的

外周血脂质组学分析[J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47(7):872-880.

[9] 杨思雨,池玉洁,张海琼,等. 基于广泛靶向代谢组学分析不同基原黄连根茎次生代谢物差异[J]. 中国中药杂志, 2024,49(20):5441-5450.

[10] 徐如静,梁娟,俞年军,等. 九华黄精炮制前后多糖类成分结构变化研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2021,40(2): 91-96.

[11] 滕欢欢,王仁中,吴德玲,等. 多花黄精炮制前后不同极性部位抗氧化与降血糖活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022,48(8):70-75.

[12] 林莹. 泰山黄精炮制前后外观性状、有效成分及刺激性物质变化相关性研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2023.

[13] 潘德芳. 九华黄精活性成分多糖及挥发性组分研究[D]. 长沙:中南大学, 2011.

[14] 胡嘉懿. 产业化蒸制过程中九华黄精的品质评价及降血糖作用差异研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2023.

[15] 张宇,夏成涵,吴江平,等. 九华黄精的化学成分及其抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(7): 1149-1157.

[16] GUO A J,LI X Y,PAN L H,et al. The interventional effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharide on atherosclerosis in mice of different sexes [J]. Food Sci Hum Wellness, 2024,13(1):370-380.

[17] 李玲. 连续制备的多花黄精多糖的理化性质及活性研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2018.

收稿日期:2025-01-02;修回日期:2025-02-08

(本文编辑 覃洪含)

(上接第 248 页)

[20] YIN Z Y,GONG G,LIU X H,et al. Mechanism of regulating macrophag-es/osteoclasts in attenuating wear particle-induced aseptic osteolysis [J]. Front Im-munol, 2023,14:1274679.

[21] LI W G,LIU W B,WANG W,et al. Sinusoidal electro-magnetic fields accelerate bone regeneration by boosting the multifunctionality of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2021,12(1):234.

[22] TONG Y,YU Z,CHEN Z X,et al. The HIV protease inhibitor Saquinavir attenuates sepsis-induced acute lung injury and promotes M2 macrophage polarization via

targeting matrix metalloproteinase-9[J]. Cell Death Dis, 2021,12(1):67.

[23] CUTOLO M,CAMPITIELLO R,GOTELLI E,et al. The Role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 867260.

[24] PU J,WU D S,ZHANG Y L,et al. An experimental study on the fretting corrosion behaviours of three material pairs at modular interfaces for hip joint implants [J]. Lubricants, 2021,9(2):12.

收稿日期:2025-01-17;修回日期:2025-02-14

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:葛俊,邹纯才,鄢海燕.基于 Box-Behnken 响应面法结合 GA-BP 神经网络多指标优化罗布麻叶微丸的制备工艺[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):257-263.

【论著与临床报道】

基于 Box-Behnken 响应面法结合 GA-BP 神经网络多指标优化罗布麻叶微丸的制备工艺

葛俊,邹纯才,鄢海燕

(皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 采用 Box-Behnken 响应面法结合 GA-BP 神经网络多指标优化罗布麻叶微丸的制备工艺。方法 利用挤出滚圆法,以收率(%)、圆整度(°)、豪斯纳比(Hausner ratio,HR)和脆碎度(%)为评价指标制备罗布麻叶微丸。在单因素试验基础上,以载药量(%)、滚圆频率(Hz)和滚圆时间(min)为考察因素,基于 G1-EWM 对各评价指标进行组合赋权并计算综合评价指标,采用 Box-Behnken 响应面法优化罗布麻叶微丸制备工艺;建立 GA-BP 神经网络模型,选取合理数据进行学习和训练,并预测罗布麻叶微丸制备工艺;验证比较 Box-Behnken 响应面法和 GA-BP 神经网络模型结果,确定罗布麻叶微丸的最佳制备工艺。结果 Box-Behnken 响应面法的综合评价指标均值为 0.9732(RSD=0.53%),与理论值 0.9710 相比较,绝对误差为 0.0022;GA-BP 神经网络的综合评价指标均值为 0.8691(RSD=0.63%),与理论值 0.9857 相比较,绝对误差为 -0.1166。因此,最终确定罗布麻叶微丸的最佳制备工艺为:载药量为 20%、滚圆时间为 2 min、滚圆频率为 20 Hz。结论 基于 Box-Behnken 响应面法结合 GA-BP 神经网络多指标优化的罗布麻叶微丸制备工艺稳定可行,较为合理。

关键词:罗布麻叶微丸;Box-Behnken 响应面法;G1-EWM;单因素试验;GA-BP 神经网络

中图分类号:R283.6

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0257-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.010

Multi-index optimization of the preparation process of Apocynum venetum leaf pellets based on the Box-Behnken response surface methodology combined with the GA-BP neural network

GE Jun, ZOU Chuncai, YAN Haiyan

(School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To optimize the preparation process of Apocynum venetum leaf pellets using the Box-Behnken response surface methodology (BB-RSM) combined with the GA-BP neural network based on multiple indices. **Methods** The Apocynum venetum leaf pellets were prepared via extrusion-spheronization, with yield (%), roundness (°), Hausner ratio (HR), and friability (%) as evaluation indices. On the basis of single-factor experiments, drug loading (%), spheronization frequency (Hz), and spheronization time (min) were selected as investigation factors. The G1-EWM was employed for combinatorial weighting of each evaluation index and calculating the comprehensive evaluation index. The BB-RSM was used to optimize the preparation process for Apocynum venetum leaf pellets. A GA-BP neural network model was established, and appropriate data were selected for learning and training to predict the preparation process of Apocynum venetum leaf

第一作者:葛俊,在读硕士研究生,研究方向:药剂学,E-mail:1714697845@qq.com

通讯作者:邹纯才,教授,硕士研究生导师,研究方向:药物制剂及质量控制,E-mail:zouchc@163.com

共同通讯作者:鄢海燕,教授,硕士研究生导师,研究方向:药物制剂及质量控制,E-mail:yhy0801@126.com

pellets. The results of the BB-RSM and the GA-BP neural network model were verified and compared to determine the optimal preparation process for Apocynum venetum leaf pellets. **Results** The mean comprehensive evaluation index of the BB-RSM was 0.9732 (RSD=0.53%), with an absolute error of 0.0022 compared to the theoretical value of 0.9710. The mean comprehensive evaluation index of the GA-BP neural network was 0.8691 (RSD=0.63%), with an absolute error of -0.1166 compared to the theoretical value of 0.9857. Therefore, the optimal preparation process for Apocynum venetum leaf pellets was determined to be: drug loading of 20%, spheronization time of 2 min, and spheronization frequency of 20 Hz. **Conclusion** The preparation process of Apocynum venetum leaf pellets optimized by the BB-RSM combined with the GA-BP neural network based on multiple indices is stable, feasible, and reasonable.

Key words: Apocynum venetum leaf pellets; Box-Behnken response surface methodology; G1-EWM; single-factor experiment; GA-BP neural network

罗布麻叶为夹竹桃科植物罗布麻(*Apocynum venetum* L.)叶片经干燥处理后的产品^[1],临床上主要用于治疗心悸失眠、浮肿尿少、肝阳眩晕等症^[2]。《中国药典》(2020 年版)一部收载有罗布麻茶^[2],也有罗布麻片、罗布麻颗粒等剂型的报道^[3]。相比于传统的单元型制剂,微丸具有粒径均一、流动性好、生物利用度高、安全性好等优势,因而备受青睐,拥有广阔的开发应用前景^[4-5]。GA-BP 神经网络在非线性映射方面表现突出,同时具备良好的自适应性和较强的容错性,可以通过学习找出输入与输出之间的规律,有效解释变量之间的复杂关系^[6]。利用 GA-BP 神经网络建立模型,扩大了模拟范围,弥补了 Box-Behnken 响应面法试验的不足^[7]。将 Box-Behnken 设计的响应面法与遗传算法优化的 BP 神经网络相结合,显著提升了实验结果的可靠性和精确度,进而确保了所选制备工艺的优化性和可行性。因此,本实验计划采用 Box-Behnken 设计的响应面分析法,并结合遗传算法优化的 BP 神经网络,基于 G1-EWM 组合赋权多指标优化罗布麻叶微丸的制备工艺。

1 材料与仪器

1.1 材料 罗布麻叶(深圳市盛宝阁食品有限公司,批号:20230915);微晶纤维素(Microcrystalline Cellulose, MCC)(湖州市菱湖新望化学有限公司,批号:20170118);无水乙醇(安徽安特食品股份有限公司,批号:2311073604);乳糖(天津市福晨化学试剂厂,批号:20230402);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 JW5 型挤出滚圆机(常州市佳腾制粒干燥设备有限公司);药典筛(浙江上虞市华丰五金仪器有限公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA2004B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);数显型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);Heido-LR4010/4011 旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司);CS-2 脆碎度测试仪(天津市新天光分析仪器技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 罗布麻叶提取物的制备 取罗布麻叶 20 g,精密称定,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,按照料液比 1 g : 20 mL 加入 60%乙醇溶液,预先浸泡 30 min,加热回流 2 次,每次各 1 h,再通过真空泵抽滤并合并滤液;旋转蒸发回收溶剂得浸膏,于干燥箱中 60 °C 下烘干,制得罗布麻叶提取物。

2.2 罗布麻叶微丸的制备 取适量罗布麻叶提取物,精密称定,加适量的水制得罗布麻叶提取物水溶液,将称量好的辅料按等量递加法与罗布麻叶提取物水溶液混合,加润湿剂后制成“手握成团,轻压即散”的湿软材,利用挤出滚圆机制备罗布麻叶微丸,50 °C 电热恒温鼓风干燥箱烘干 4 h,过筛(18~24 目)即得罗布麻叶微丸。

2.3 微丸的评价指标 参考相关文献^[8-9],以罗布麻叶微丸的圆整度、收率、豪斯纳比(Hausner ratio, HR)^[10]和脆碎度为指标进行考察。

2.4 数据标准化处理 参考文献^[11],采用极值变换法对制备的罗布麻叶微丸各指标数据进行标准化处理。

对于样品中收率,取收率实际测得的最大值,用每一个实测结果除于最大值,即 $x = \frac{y_v}{y_{max}}$ ($v=1, 2, \dots, n$), x 为收率标准化值;对于样品中圆整度、HR、脆碎度,取三个指标实际测得的最小值除于每一个结果,即 $z = \frac{y_{min}}{y_v}$ ($v=1, 2, \dots, n$),分别得出圆整度标准化值、HR 标准化值、脆碎度标准化值。

2.5 G1-EWM 组合赋权

2.5.1 G1 法主观赋权 先确定评级指标序的关系,根据微丸评价指标的重要程度,将 4 个评价指标关系设定为收率(y_1) > 圆整度(y_2) > HR(y_3) = 脆碎度(y_4)。

参考文献^[12]中 G1 主观赋权的公式计算得:收率、

圆整度、HR 和脆碎度的主观权重系数分别为0.3443、0.2459、0.2049、0.2049。

2.5.2 EWM 客观赋权

2.5.2.1 评价指标数据矩阵的建立 设试验某因素下的水平数为 m , 评价指标数为 n , 构建试验评价指标原始数据矩阵 $Y_{m \times n}$ 。 y_{mn} 为第 m 个试验水平的第 n 个评价指标结果。本文中 $m=1,2,3\cdots,p;n=1,2,3\cdots,q$ 。单因素考察时, $p=5$; Box-Behnken 响应面法考察时, $p=17$ 。 $q=3$, 即有 3 个评价指标。

2.5.2.2 矩阵转换 将原始数据矩阵 Y 转换为概率矩阵 $P_{m \times n}$ 。 $P_{m \times n}$ 表示第 m 个试验水平下的第 n 个评价指标的概率。矩阵 P 的形式见式(1)。

$$P = \frac{y_{mn}}{\sum_{i=1}^m y_{in}}$$
 公式(1)

评价指标信息熵(H_j)的计算见式(2)。评价指标 H_j 的值越低, 意味着该评价指标的数据分布越分散, 所提供的信息量更丰富, 因此该指标对整体评价指标体系的影响力更为显著。客观权重系数(w_j^o)的计算见式(3)。

$$H_j = -\frac{1}{\ln m} \sum_{i=1}^m P_{mi} \ln P_{mi}$$
 公式(2)

$$W_j^o = \frac{(1-H_j)}{\sum_{j=1}^n (1-H_j)}$$
 公式(3)

2.5.3 组合权重系数(W_j)的确定 由 2.5.1 和 2.5.2 项下分别得到的主观权重 W_j^s 与客观权重 W_j^o , 按式(4)计算各个评价指标的组合权重系数 w_j 。

$$W_j = \frac{W_j^s W_j^o}{\sum_{j=1}^n W_j^s W_j^o}$$
 公式(4)

综合评价指标=收率标准化值 $\times W_1$ +圆整度标准化值 $\times W_2$ +HR 标准化值 $\times W_3$ +脆碎度标准化值 $\times W_4$ 。

2.6 单因素试验 根据预试验的结果进行分析, 按“2.2”项下方法制备罗布麻叶微丸, 分别考察辅料配比(g:g)、载药量(%)、润湿剂(%)、滚圆频率(Hz)、滚圆时间(min)对综合评价的影响。确定罗布麻叶微丸单因素试验的最佳制备工艺: 辅料配比(乳糖:MCC)为 1:5、载药量为 20%、润湿剂为 10%乙醇溶

液、滚圆频率 20 Hz、滚圆时间 2 min。

2.7 影响因素的确定 通过“2.6”项下各因素的综合评价指标, 计算不同影响因素下各评价指标的 s 值。结果见表 1。 s 值越大, 说明该因素对这个评价指标的影响越大。收率(%): 载药量、滚圆时间和滚圆频率对应的 s 值较大, 说明载药量变化对收率的影响较大, 且收率是非常重要的评价指标之一; 脆碎度(%): 载药量、滚圆时间和滚圆频率对应的 s 值较大, 说明载药量变化对脆碎度的影响较大, 且脆碎度是非常重要的评价指标之一; 各因素对圆整度和 HR 的影响各有不同。根据综合评价指标及 s 值的综合考虑, 确定单因素条件下的载药量(%)、滚圆频率(Hz)和滚圆时间(min)作为主要影响因素。因此, 确定罗布麻叶微丸单因素试验的最佳制备工艺为: 载药量 20%、滚圆频率 20 Hz、滚圆时间 2 min。

表 1 不同影响因素的 s 值

影响因素	收率/%	圆整度/°	脆碎度/%	HR
润湿剂	4.4519	0.7071	0.1694	0.0667
载药量	14.6932	0.6519	0.5225	0.0181
滚圆时间	13.7352	1.2247	0.3444	0.0319
滚圆频率	13.4835	1.5166	0.3246	0.0309
辅料配比	5.9290	1.5572	0.2880	0.0104

2.8 Box-Behnken 响应面法

2.8.1 Box-Behnken 响应面优化罗布麻叶微丸的制备工艺 在“2.6”项下试验的基础上, 选择载药量(A)、滚圆频率(B)以及滚圆时间(C)为考察因素, 本实验将利用 Design-Expert 8.0 软件构建三因素三水平的模拟试验设计。试验因素水平见表 2, 试验设计及结果见表 3。

表 2 响应面试验因素水平表

水平	因素		
	A. 载药量/%	B. 滚圆频率/Hz	C. 滚圆时间/min
-1	15	17	1
0	20	20	2
1	25	23	3

表 3 响应面试验设计及结果

序号	因素			评价指标				综合评价指标	BP 预测综合评价
	载药量/%	滚圆频率/Hz	滚圆时间/min	收率/%	圆整度/°	HR	脆碎度/%		
1	15	17	2	73.44	18	1.095	1.281	0.8348	0.8348
2	25	17	2	79.71	17	1.090	1.126	0.9015	0.9552
3	15	23	2	70.86	18	1.068	1.061	0.8250	0.9055
4	25	23	2	74.67	18	1.094	1.269	0.8415	0.9672
5	15	20	1	77.86	17	1.057	1.122	0.8974	0.8556
6	25	20	1	80.72	17	1.073	1.130	0.9060	0.9672

表 3(续) 响应面试验设计及结果

序号	因素			评价指标				综合评	BP 预测综
	载药量/%	滚圆频率/Hz	滚圆时间/min	收率/%	圆整度/°	HR	脆碎度/%	价指标	合评价指标
7	15	20	3	76.42	17	1.066	1.235	0.8720	0.8633
8	25	20	3	82.86	17	1.069	1.142	0.9128	0.9128
9	20	17	1	78.43	17	1.080	1.069	0.9081	0.9525
10	20	23	1	81.76	17	1.063	1.123	0.9124	0.9124
11	20	17	3	80.43	17	1.081	1.072	0.9154	0.8740
12	20	23	3	79.42	16	1.063	1.306	0.8923	0.9671
13	20	20	2	83.94	16	1.011	1.009	0.9672	0.9672
14	20	20	2	84.49	17	1.017	0.948	0.9653	0.9672
15	20	20	2	87.93	16	1.055	1.023	0.9763	0.9672
16	20	20	2	86.26	17	1.019	1.010	0.9570	0.9672
17	20	20	2	88.46	16	1.022	1.018	0.9823	0.9672

注:由 G1-EWM 得出各评价指标的组合权重 W_j 分别为 0.3532、0.3122、0.0894、0.2452。

2.8.2 回归模型各项方差分析结果 通过进行方差分析,本研究对各因素进行了二次回归分析,并得到了以下回归方程式: $R=0.97+0.012\times A-0.011\times B+3.256\times 10^{-4}\times C-0.013\times A\times B-4.778\times 10^{-4}\times A\times C-6.840\times 10^{-3}\times B\times C-0.060\times A^2-0.059\times B^2$

$-3.847\times 10^{-3}\times C^2$ 。模型的 $P<0.01$,表明回归模型差异显著;失拟项 $P=0.1318>0.05$,无差异,一次项 A、B、C 的 P 值影响程度为 $C>B>A$, F 值为 $A>B>C$,见表 4。 $R^2=0.9618$,说明罗布麻叶微丸综合指标的模型值与实际测得值之间差异较小。

表 4 回归模型各项方差分析结果

因素	平方和	自由度	均方	F	P
模型	3.5×10^{-2}	9	3.878×10^{-3}	19.56	<0.001
A	1.215×10^{-3}	1	1.215×10^{-3}	6.13	0.042
B	9.815×10^{-4}	1	9.815×10^{-4}	4.95	0.061
C	8.482×10^{-7}	1	8.482×10^{-7}	0.004	0.948
AB	6.304×10^{-4}	1	6.304×10^{-4}	3.18	0.118
AC	9.133×10^{-7}	1	9.133×10^{-7}	0.005	0.948
BC	1.871×10^{-4}	1	1.871×10^{-4}	0.94	0.364
A^2	1.5×10^{-2}	1	1.5×10^{-2}	77.00	<0.001
B^2	1.5×10^{-2}	1	1.5×10^{-2}	73.17	<0.001
C^2	6.231×10^{-5}	1	6.231×10^{-5}	0.31	0.593
残差	1.388×10^{-3}	7	1.982×10^{-4}	3.44	0.132
失拟项	1.000×10^{-3}	3	3.334×10^{-4}		
纯误差	3.875×10^{-4}	4	9.688×10^{-5}		
总离差	3.6×10^{-2}	16			

2.8.3 Box-Behnken 响应面最佳制备工艺 其中响应面综合评价指标中 R^2 为 0.9618、C. V. 为 1.54%、Adj R^2 为 0.9126、Pred R^2 为 0.8423、信噪比为 12.289。以上结果均满足 Box-Behnken 响应面最优结果选择原则。因此,采用 Box-Behnken 响应面法得到的罗布麻叶微丸最佳制备工艺:载药量为 20%、滚圆频率 20 Hz、滚圆时间 2 min。通过 Box-Behnken 设计的响应面分析软件,获得三维曲线图,该图展示了载药量、滚圆频率和滚圆时间这 3 个影响因素之间的相互作用,见图 1。

2.9 GA-BP 神经网络

2.9.1 GA-BP 神经网络结构的建立 以响应面试验的 17 组数据为训练样本。载药量、滚圆频率和滚圆时间作为输入层,综合评价指标为输出层,通过不断训练以达到满足模型精度的节点数^[13]。基于 Box-Behnken 响应面法优化罗布麻叶微丸试验结果,通过 Matlab 2014a 软件建立 GA-BP 神经网络预测模型。构建一个包含 3 个输入节点、17 个隐藏节点、1 个输出节点和 1 个输出层的三层 BP 神经网络。同时,遗传算法(GA)的参数设置如下:种群大小为 40 个个体,压差设

定为 2,遗传算法的最大迭代次数为 50 代,每个变量的编码长度为 10 位二进制数,代沟系数为 0.95,交叉率为 0.7,突变率为 0.01。BP 神经网络的训练参数,设

定训练迭代次数为 5 000 次,学习率为 0.05,目标收敛误差为 0.0000001,其他参数保持默认值。

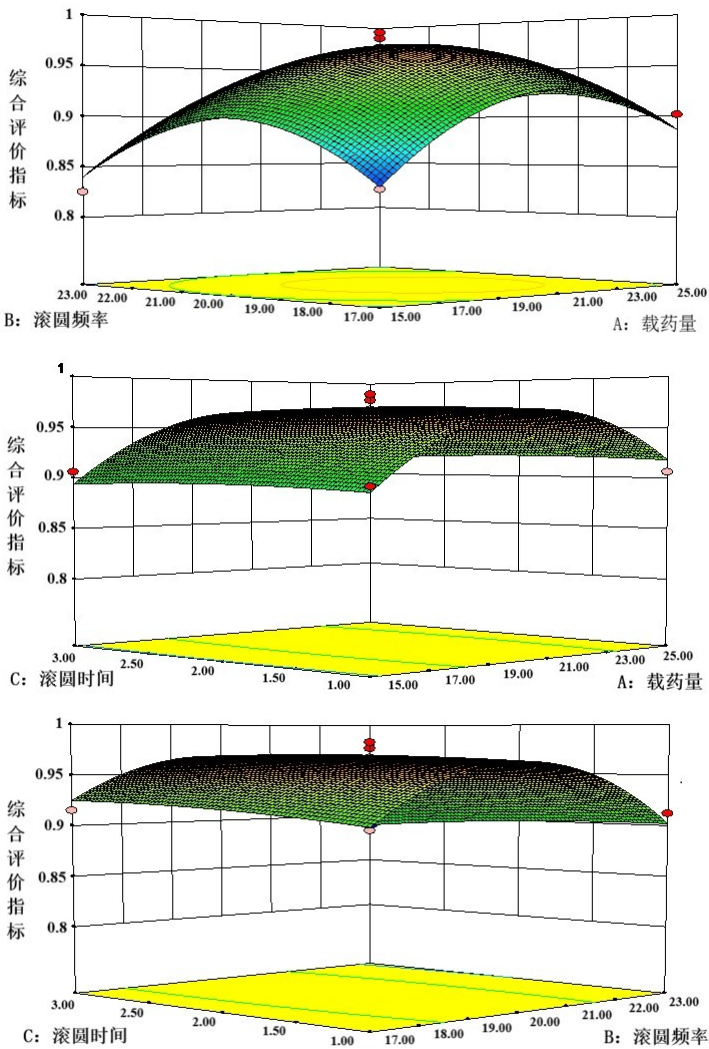


图 1 各影响因素之间交互作用对响应变量的影响的三维曲面图

2.9.2 基于 GA 的目标寻优 基于“2.8.1”项进行目标寻优的进化过程,见图 2。由图 2 可知,随着迭代次数的增加,误差逐渐减小并趋于平缓,说明优化后的数据准确度高。

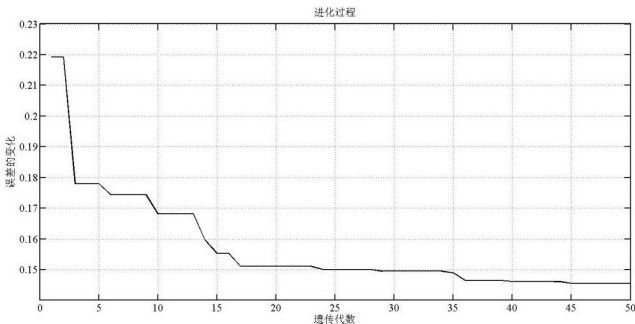


图 2 基于 GA 进行目标寻优的进化过程

2.9.3 数据的训练及测试 将最优权值和阈值赋予新建的 GA-BP 神经网络,以“2.7”项下表 3 中的 4 组数据(序号 1、8、10、13)进行训练,4 组数据(序号 3、6、11、14)进行测试,结果见表 5。由表 5 可知,GA-BP 神经网络能够有效地模拟各影响因素与综合评价指标之间的对应关系,测试值与综合评价指标较为接近。GA-BP 神经网络预测的综合评价指标见表 3。GA-BP 神经网络训练过程见图 3。GA-BP 神经网络均方误差见图 4。

2.9.4 GA-BP 神经网络预测结果 将 GA-BP 神经网络预测得到的 17 组综合评价指标数据(见表 3)导入 Design-Expert 8.0.6.1 软件中进行进一步分析,得到罗布麻叶微丸的最佳制备工艺为:载药量为 25%、滚圆频率为 17 Hz、滚圆时间为 1 min。

表 5 BP 神经网络测试数据及结果

序号	载药 量/%	滚圆频 率/Hz	滚圆时 间/min	综合评 价指标	测试值
3	15	23	2	0.8250	0.8862
6	25	20	1	0.9060	0.9672
11	20	17	3	0.9154	0.9672
14	20	20	2	0.9653	0.9672

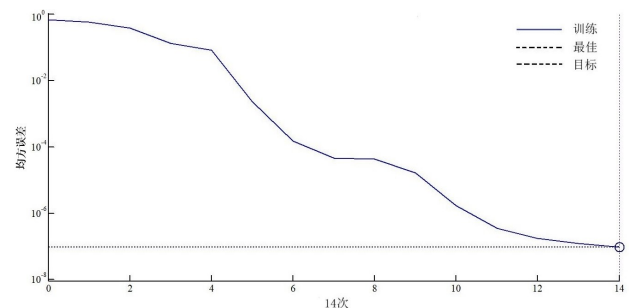


图 3 BP 神经网络训练过程

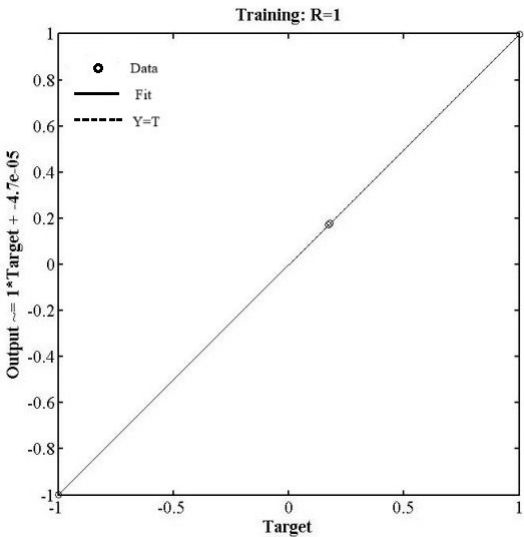


图 4 GA-BP 神经网络均方误差图

2.10 验证试验 GA-BP 神经网络预测得到的罗布麻叶微丸最佳制备工艺:载药量为 25%、滚圆频率 17 Hz、滚圆时间 1 min。GA-BP 神经网络预测值与实测值的误差见图 5。由于与 Box-Behnken 响应面法得出的最佳制备工艺不同,因此分别按照两种方法所得的最佳罗布麻叶微丸制备工艺,按“2.2”项下方法各制备 3 批罗布麻叶微丸,测定其收率、圆整度、HR 及脆碎度,并利用“2.4”、“2.5”项下方法进行标准化处理及权

重赋值计算,比较综合评价指标,见表 6。Box-Behnken 响应面法的综合评价指标均值为 0.9732,与理论值(0.9710)相比较,绝对误差为 0.0022;GA-BP 神经网络的综合评价指标均值为 0.8691,与理论值(0.9857)相比较,绝对误差为-0.1166。Box-Behnken 响应面法得到的制备工艺要优于 GA-BP 神经网络预测的制备工艺,且误差较小。因此,最终确定罗布麻叶微丸的最佳制备工艺为:载药量为 20%、滚圆频率为 20 Hz、滚圆时间为 2 min。

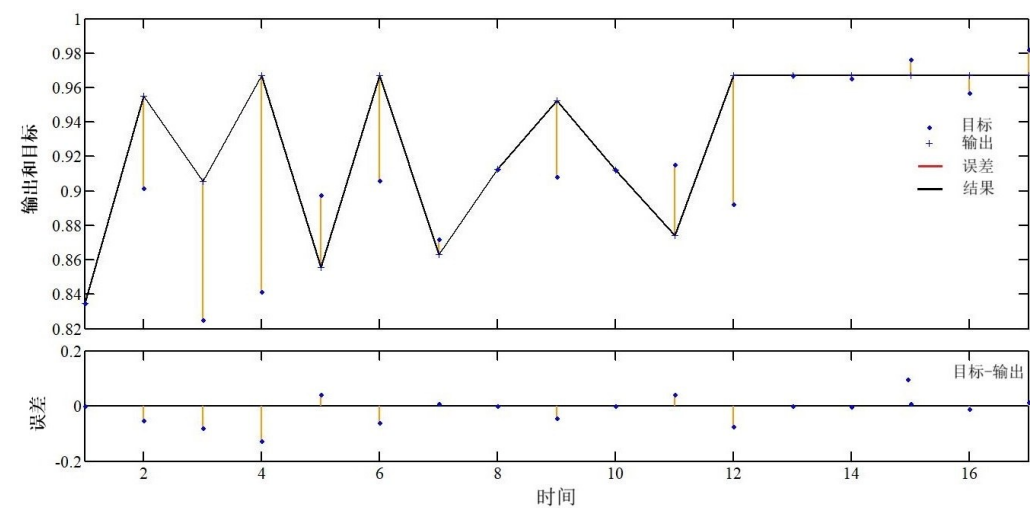


图 5 BP 神经网络预测值与实测值的误差图

表 6 验证试验综合评价指标

方法	批号	收率/%	圆整度/°	HR	脆碎度/%	综合评价指标
Box-Behnken 响应面法	1	84.42	16	1.0147	1.0159	0.9672
	2	83.86	16	1.0193	0.9679	0.9759
	3	87.49	16	1.0433	1.0185	0.9764
GA-BP 神经网络	1	76.59	17	1.0611	1.2541	0.8702
	2	70.91	17	1.0693	1.0942	0.8739
	3	75.44	18	1.1348	1.1348	0.8632

3 讨论

中药微丸是一种由中药提取物或药材粉碎过筛后和辅料制备而成的球形或类球形多元释药系统,在中药研究中具有较为广阔的前景^[14-16]。由于中药药效成分多种多样,这导致了中药微丸制剂工艺设计的复杂和局限性。因此,应当针对具体问题,加强对中药微丸的研究与开发工作。

在课题组前期对罗布麻叶提取工艺进行考察的基础上,探究罗布麻叶微丸制备过程发现中,处方因素和工艺因素均会对微丸的评价指标产生影响。在制备工艺因素中,滚圆频率过大会导致挤出物与挡板和圆筒内壁摩擦板撞击力度较大,产生的细粉较多,对评价指标影响较大;而滚圆时间在 5 min 之后,存在微丸黏附在机器内壁摩擦板上的现象,影响摩擦板作用的发挥并造成微丸损失,因此单因素考察滚圆时间选在 1~5 min。在处方因素中,研究表明,使用微晶纤维素(MCC)制备的微丸具有均匀的粒径、表面光滑且形状规则,同时具有较高的堆密度,这些特性对于微丸的成型、形状固定以及圆整度的形成起着决定性的作用,然而,使用单一 MCC 作为赋形剂,所制微丸黏性较差收率不高,加入适量乳糖可以很好地改善这一缺点。实验中发现乳糖的含量不宜过高,否则易黏附到机器内壁,并且烘干时易焦黄,根据前期预试验以及单因素试验,最终确定乳糖与 MCC 比例为 1:5(g:g)。此外,随着载药量的增大,会使微丸黏度过大,挤出的长条不易折断,从而使收率降低,因此要在能保证成丸的前提下选择最大载药量。现有文献在单因素考察时,对多因素(如辅料配比、润湿剂乙醇浓度等)的取舍多采用直观判断或辅以经验取舍,存在一定的主观性。本试验通过计算各因素对下评价指标的 s 值并以此作为重要判断标准,选取对评价指标影响最大的 3 个考察因素并用于 Box-Behnken 响应面法的优化中,提高了罗布麻叶微丸制备工艺考察的可靠性。

本试验通过采用 GA-BP 神经网络模拟预测进行全局寻优,以期弥补 Box-Behnken 响应面法可能存在的优化结果灵活性较低等不足,验证了 Box-Behnken 响应面法实验结果的可靠性。基于 G1-EWM 组合赋权,利用 Box-Behnken 响应面法结合遗传算法优化的 BP 神经网络,对罗布麻叶微丸的制备工艺进行多参数优化,设计合理,为罗布麻叶微丸的进一步深入研究奠

定了基础。

参考文献:

- [1] 章一茜,卞艳芳.不同采收期的罗布麻叶和其商品中槲皮素的含量测定[J].药学实践杂志,2017,35(1):67-69.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:220.
- [3] 刘倩倩,蒋磊.高效液相色谱双波长法测定复方罗布麻片 I 中 3 组分含量[J].中国药业,2021,30(11):56-58.
- [4] 苏秦,李喜香,包强,等.微丸的研究进展[J].基层中医药,2023,2(11):106-112.
- [5] 钟玲,许小红,杨胜玉,等.中药微丸的药学研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(2):369-372.
- [6] 刘竹,邹纯才,陈涛,等. G1-熵权法多指标优化油菜花粉颗粒处方研究[J].大理大学学报,2024,9(10):13-19.
- [7] 吴雪,邹纯才,鄢海燕,等. Box-Behnken 响应面法优化瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸的提取工艺[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):211-217,233.
- [8] 卢晓艺,许文,叶森,等.盐肤木总酚酸微丸的处方优化及制备工艺研究[J].中国中药杂志,2019,44(13):2785-2791.
- [9] 赵雯,刘睿,张艳军.姜黄素缓释微丸的制备工艺及处方优化[J].时珍国医国药,2015,26(9):2140-2143.
- [10] 罗铮,邓雯,张前亮,等.当归破壁粉制备工艺优化及物理指纹图谱评价研究[J].中草药,2019,50(24):5980-5987.
- [11] 邹纯才,洪国君,鄢海燕.不同数据标准化方法对瓜蒌滴丸抗凝血作用谱效关系的影响[J].中国中药杂志,2018,43(9):1864-1870.
- [12] 木永祥,邹纯才,鄢海燕.基于 Box-Behnken 响应面法结合 BP 神经网络多指标优化汉桃叶微丸的制备工艺[J].山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报,2024,45(7):385-390.
- [13] 霍丹群,冯丹,周荣灵,等. BP 神经网络优化荷叶黄酮提取工艺及黄酮稳定性实验的探索[J].食品工业科技,2014,35(16):274-280.
- [14] 孙明雪.瓜蒌微丸的制备及抗大鼠急性胃溃疡作用与机制研究[D].芜湖:皖南医学院,2023.
- [15] 邓建功,邓建梅.中药缓释微丸制剂的研究进展[J].疾病监测与控制,2015,9(7):483-485.
- [16] 杨锦,马睿蓉,高增平,等.中药微丸制备工艺及其体内外评价研究进展[J].中国药师,2021,24(5):932-935.

收稿日期:2024-12-20;修回日期:2025-01-18

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式: 韦叙, 陈高, 盘丽华, 等. HIV 患者马尔尼菲篮状菌感染的影响因素及预测模型构建[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 264-269, 280.

【论著与临床报道】

HIV 患者马尔尼菲篮状菌感染的影响因素及预测模型构建

韦叙, 陈高, 盘丽华, 梁慧娜, 梁丽花

(广西河池市人民医院检验科, 广西 河池 547000)

摘要: **目的** 探讨艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)患者马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffei*, TM)感染的影响因素并构建预测模型。**方法** 选择 2020 年 1 月至 2024 年 8 月广西河池市人民医院感染性疾病科收治的 HIV 患者 196 例为研究对象, 按约 7:3 的比例随机分为建模组(135 例)和验证组(61 例), 采用 Logistic 回归分析 TM 感染的影响因素, 运用 R 语言绘制列线图预测模型、分析和验证模型的区分度、预测效能、净收益率。**结果** 196 例 HIV 患者 TM 感染率 37.24%。Logistic 回归分析结果显示, 年龄、肺炎、血小板减少、白细胞减少、AST 升高、CD4⁺T 淋巴细胞计数为 TM 影响因素($P < 0.05$)。列线图模型在建模组中的 AUC 为 0.970(95% CI: 0.944~0.997), 验证组中 AUC 为 0.949(95% CI: 0.907~0.990), 两组 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果均 > 0.05 , 临床决策曲线风险阈值概率分别为 1%~100%、5%~100%。**结论** 年龄、血小板减少、肺炎、白细胞减少、AST 升高、CD4⁺T 淋巴细胞计数是 HIV 患者 TM 感染的影响因素, 构建的列线图模型具有较好的区分度和校准度、正向净收益率, 能为临床防治提供参考。

关键词: 艾滋病病毒; 马尔尼菲篮状菌; 影响因素; 预测模型

中图分类号: R512.91

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0264-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.011

Influencing factors of *Talaromyces marneffei* infection in HIV patients and construction of a predictive model

WEI Xu, CHEN Gao, PAN Lihua, LIANG Huina, LIANG Lihua

(Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Hechi in Guangxi, Hechi 547000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influencing factors of *Talaromyces marneffei* (TM) infection in human immunodeficiency virus (HIV) patients and to construct a predictive model. **Methods** A total of 196 HIV patients admitted to the Department of Infectious Diseases in the People's Hospital of Hechi, Guangxi, from January 2020 to August 2024 were selected as the study subjects. They were randomly divided into a modeling group (135 cases) and a validation group (61 cases) at a ratio of approximately 7:3. Logistic regression analysis was used to identify the influencing factors of TM infection. R language was employed to draw a nomogram predictive model, and to analyze and validate the discrimination, predictive performance, and net benefit of the model. **Results** The infection rate of TM in 196 patients with HIV was 37.24%. Logistic regression analysis showed that age, pneumonia, thrombocytopenia, leukopenia, elevated AST, and CD4⁺T lymphocyte count were influencing factors for TM infection ($P < 0.05$). The AUC of the nomogram model in the modeling group was 0.970(95% CI: 0.944 to 0.997) and an AUC of 0.949 (95% CI: 0.907 to 0.990) in the validation group. The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test results were both > 0.05 in the two groups, and the risk threshold probability ranges on the clinical decision curve were 1% to 100% and 5% to 100%, re-

基金项目: 广西真菌研究与真菌病防治重点实验室开放课题(GXHCFM202109)

第一作者: 韦叙, 副主任技师, 研究方向: 病原微生物研究, E-mail: www.xeixuwei@163.com

spectively. **Conclusion** Age, thrombocytopenia, pneumonia, leukopenia, elevated AST, and CD4⁺ T lymphocyte count are influencing factors for TM infection in HIV patients. The constructed nomogram model demonstrates good discrimination and calibration, with a positive net benefit, which can provide a reference for clinical prevention and treatment.

Key words: human immunodeficiency virus; *Talaromyces marneffei*; influencing factors; prediction model

马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffei*, TM)是青霉素中唯一的温度双相条件机会性致病真菌,免疫低下人群易感,具有区域分布特征,主要流行于热带和亚热带地区,是艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者的第三大最常见机会性感染致病菌,即便在接受有效抗真菌治疗的前提下,合并 TM 的 HIV 患者病死率仍高达 30%^[1-2]。调查报道, TM 在 HIV 患者中的感染率为 0.13%~19.63%,在中国 HIV 患者中的感染率为 0.20%~26.5%,主要分布于广西和广东,且呈逐年上升趋势^[3-4]。TM 感染在体征、症状和影像学上均缺乏特征性表现,发病隐匿迅猛,易误诊致治疗延迟,及早防治可以降低死亡率^[5]。目前临床上关于 TM 感染危险因素及预测的研究较为少见。基于此,本研究分析 HIV 合并 TM 患者感染的危险因素并构建列线图预测模型,以期 HIV 患者科学防治 TM 感染提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2020 年 1 月至 2024 年 8 月广西河池市人民医院感染性疾病科收治的 HIV 患者为研究对象。纳入标准:符合 HIV 抗体确证试验阳性的金标准^[6];TM 感染以组织病理发现病原菌或病原菌培养阳性为诊断标准^[7]。排除标准:妊娠期、哺乳期妇女;资料不全;中途转院者。根据统计学研究样本量要求^[8],样本量至少为自变量个数的 5~10 倍,且考虑 20% 的问卷丢失率,本研究共纳入 17 个分析变量,故样本量至少为 102~204 例。本研究共纳入样本 196 例,按照 7:3 的比例,将 196 例患者随机分为建模组(135 例)和验证组(61 例)。本研究经医院伦理委员会批准(伦理号:2021050),均获得患者知情同意并签同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集 包括年龄、性别、民族、工作、居住地、婚姻状况、吸烟、饮酒、有无代谢性酸中毒和肺炎、血小板计数、血钾、血浆总蛋白、血红蛋白、白细胞、谷草转氨酶(AST)、基线 CD4⁺ T 淋巴细胞计数。

1.2.2 病原菌鉴定 严格按照《全国临床检验操作规程》^[9]采取患者外周静脉血进行病原菌培养, TM 鉴定采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of

Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)、形态学方法和 rDNA-ITS 测序确定。

1.2.3 实验室检测 收集患者入院 24 h 血小板计数、血钾、总蛋白或白蛋白、血红蛋白、白细胞、AST 等实验室检查结果。血小板减少是指单位体积血液中所含的血小板计数 $<100\times 10^9/L$ ^[10];低血钾是指血钾含量低于正常范围的一种病理状态,具体为血钾 $<3.5\text{ mmol/L}$ ^[11]。低蛋白血症是指血浆总蛋白的减少,具体为血浆总蛋白 $<60\text{ g/L}$ 或白蛋白 $<35\text{ g/L}$ ^[11];贫血是指外周血液中单位容积血红蛋白浓度低于正常值的一种疾病,临床通常以血红蛋白男性 $<120\text{ g/L}$ 、女性 $<110\text{ g/L}$ 判定为贫血^[12];白细胞减少是指外周血液中白细胞计数持续 $<4.0\times 10^9/L$ ^[12];AST 升高是指 AST 的检测值超过正常参考范围的现象,即 $AST>40\text{ U/L}$ ^[13]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理。分别采用例数和百分比($n, \%$)、均数和标准差($\bar{x}\pm s$)描述计数和计量资料,进行 χ^2 和 t 检验。采用 Logistic 回归分析 HIV 患者 TM 感染的危险因素。R 语言绘制列线图预测模型、受试者工作曲线(ROC)、校准曲线(Calibration)、临床决策曲线(DCA)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 共纳入患者 196 例,其中男 139 例,女 57 例;年龄 20~84 岁,平均 (49.82 ± 12.98) 岁;民族:汉族 58 例,其他 138 例;工作:无 164 例,有 32 例;居住地:农村 46 例,城镇 150 例;婚姻状况:单身 67 例,已婚 129 例。

2.2 TM 感染情况和分组 196 例 HIV 患者中, TM 感染 73 例,无 TM 感染 123 例,感染率 37.24%。建模组 135 例中, TM 感染 51 例,无 TM 感染 84 例,感染率 37.78%。验证组 61 例中, TM 感染 22 例,无 TM 感染 39 例,感染率 36.07%。建模组与验证组 TM 感染率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.053, P=0.818$)。

2.3 建模组 TM 感染单因素分析 根据分析进一步判断相关因素 HIV 患者 TM 感染的影响,发现年龄对 HIV 患者的 TM 感染有影响,即年龄越大的 HIV 患者 TM 感染率越高;有血小板减少、低血钾、低蛋白

血症、肺炎、贫血、白细胞减少、AST 升高,CD4⁺T 淋巴细胞计数<100 个/微升的 HIV 患者 TM 感染率越高。具体情况见表 1。

表 1 建模组 TM 感染单因素分析 (n=135)

项目	n	TM 感染 (n=51)	无 TM 感染 (n=84)	χ^2/t	P
性别				0.246	0.620
男	96	35(68.63)	61(72.62)		
女	39	16(31.37)	23(27.38)		
年龄/岁	55.00±14.49	45.90±9.59		4.388	<0.001
民族				2.286	0.131
汉族	40	19(37.25)	21(25.00)		
其他	95	32(62.75)	63(75.00)		
工作				0.051	0.821
无	118	45(88.24)	73(86.90)		
有	17	6(11.76)	11(13.10)		
居住地				1.125	0.289
农村	28	13(25.49)	15(17.86)		
城镇	107	38(74.51)	69(82.14)		
婚姻状况				0.931	0.335
单身	52	17(33.33)	35(41.67)		
已婚	83	34(66.67)	49(58.33)		
肺炎				14.469	<0.001
无	46	6(11.76)	40(47.62)		
有	89	45(88.24)	54(64.29)		
代谢性酸中毒				0.865	0.352
无	116	42(82.35)	74(88.10)		
有	19	9(17.65)	10(11.90)		
血小板减少				19.898	<0.001
无	65	12(23.53)	53(63.10)		
有	70	39(76.47)	31(36.90)		
低蛋白血症				29.116	<0.001
无	64	9(17.65)	55(65.48)		
有	71	42(82.35)	29(34.52)		
AST 升高				24.778	<0.001
无	55	7(13.73)	48(57.14)		
有	80	44(86.27)	36(42.86)		

表 1(续) 建模组 TM 感染单因素分析 (n=135)

项目	n	TM 感染 (n=51)	无 TM 感染 (n=84)	χ^2/t	P
贫血				36.962	<0.001
无	61	6(11.76)	55(65.48)		
有	74	45(88.24)	29(34.52)		
低血钾				16.555	<0.001
无	62	12(23.53)	50(59.52)		
有	73	39(76.47)	34(40.48)		
白细胞减少				17.665	<0.001
无	71	15(29.41)	56(66.67)		
有	64	36(70.59)	28(33.33)		
CD4 ⁺ T 淋巴细胞计数(个/微升)				16.208	<0.001
≥100	34	3(5.88)	31(36.90)		
<100	101	48(94.12)	53(63.10)		

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示;计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2.4 建模组 TM 感染风险多因素分析 以有无 TM 感染(无 TM 感染=0,有 TM 感染=1)为因变量,以单因素分析中具有统计学意义的 9 项自变量因素(年龄、血小板减少、肺炎、低蛋白血症、低血钾、贫血、白细胞减少、AST 升高、CD4⁺T 淋巴细胞计数)纳入 Logistic 回归分析,自变量赋值:肺炎(0=无,1=有);血小板减少(0=无,1=有);低蛋白血症(0=无,1=有);贫血(0=无,1=有);低血钾(0=无,1=有);白细胞减少(0=无,1=有);AST 升高(0=无,1=有);CD4⁺T 细胞数(0=≥100 个/微升,1=<100 个/微升)。结果显示,年龄、肺炎、血小板减少、白细胞减少、AST 升高、CD4⁺T 淋巴细胞计数为 HIV 患者 TM 感染的影响因素(P<0.05)。见表 2。基于 Logistic 回归分析结果构建预测 HIV 患者 TM 感染的列线图模型,见图 1。

表 2 建模组 TM 感染多因素分析

项目	B	SE	Wald χ^2	P	OR (95% CI)
常量	-17.162	4.766	12.966	<0.001	—
年龄	0.192	0.069	7.792	0.005	1.211(1.059~1.386)
肺炎	2.990	1.406	4.521	0.033	19.894(1.263~313.249)
血小板减少	2.030	0.894	5.150	0.023	7.612(1.319~43.936)
低蛋白血症	1.635	0.919	3.163	0.075	5.128(0.846~31.070)
AST 升高	2.085	0.991	4.428	0.035	8.046(1.154~56.117)
贫血	1.372	1.005	1.865	0.172	3.944(0.550~28.256)
低血钾	0.848	0.991	0.733	0.392	2.336(0.335~16.285)
白细胞减少	2.801	1.209	5.365	0.021	16.464(1.539~176.165)
CD4 ⁺ T 细胞数	0.372	0.180	4.266	0.039	1.450(1.019~2.064)

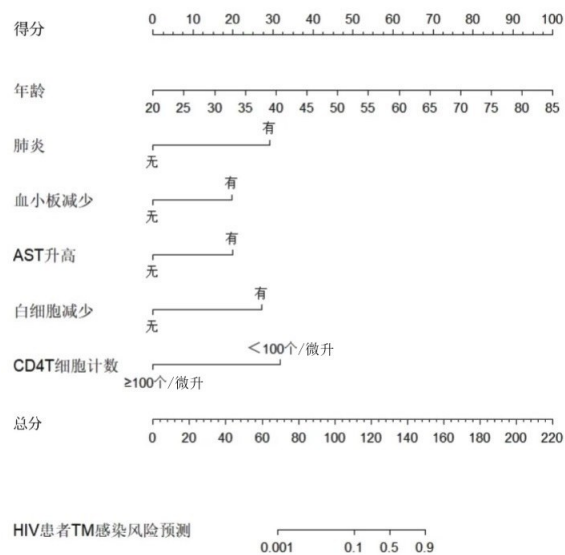
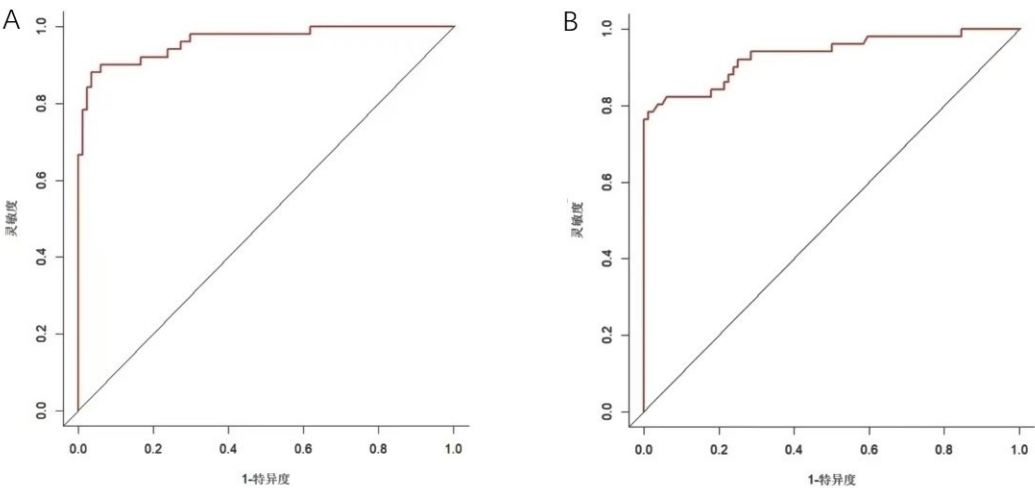


图 1 HIV 患者 TM 感染风险预测列线图模型

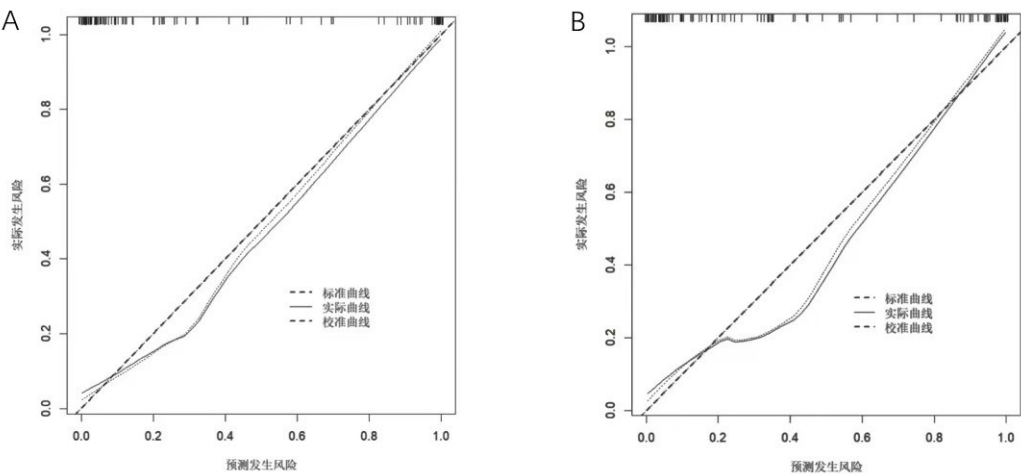
2.5 HIV 患者 TM 感染预测模型效能检验及验证
建模组 ROC 曲线分析结果显示,列线图在预测 HIV

患者 TM 感染的 AUC 为 0.970[95% CI :0.944 ~ 0.997),约登指数为 0.804,灵敏度为 96.5%,特异度为 0.839,最佳临界值为 0.521,说明该模型具有较好的区分度(见图 2A)。验证组外部验证结果显示,AUC 为 0.949(95% CI :0.907~0.990),约登指数为 0.793,灵敏度为 96.3%,特异度为 0.830,最佳临界值为 0.515,说明该模型具有较好的区分度(见图 2B)。Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果显示: $\chi^2=8.255, P=0.409$,说明模型和观察数据吻合较好。校准曲线显示:模型预测结果与实际结果之间一致性较好(见图 3A)。Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果显示: $\chi^2=7.653, P=0.381$ 。校准曲线显示:模型预测结果与实际结果之间一致性较好(见图 3B)。DCA 结果显示,HIV 患者 TM 感染阈值概率为 1%~100% 时,使用该列线图能够获得净收益(见图 4A)。DCA 为每个阈值概率下的净获益率,结果显示 HIV 患者 TM 感染阈值概率为 5%~100% 时,表明使用该列线图能够获得较高的净收益(见图 4B)。



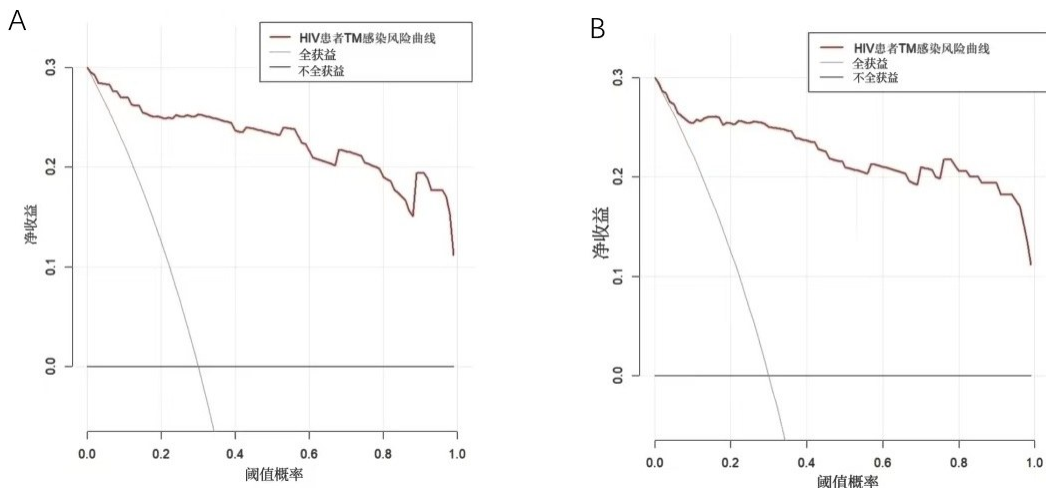
注:A.建模组;B.验证组。

图 2 列线图预测模型的 ROC 曲线



注:A.建模组;B.验证组。

图 3 列线图预测模型的校准曲线



注:A.建模组;B.验证组。

图4 列线图预测模型的DCA曲线

3 讨论

TM是青霉菌属篮状菌中唯一温度双相型罕见机会致病真菌,2022年被WHO收录入真菌病原体优先级清单,流行于亚热带地区,好发于HIV患者等免疫功能差的人群,常见为咳嗽、发热、疲劳、体重减轻、肝脾淋巴结肿大和胃肠道异常等非特异性临床特征,具有高并发症和病死率的特点,严重威胁人类的生命健康^[14]。广西壮族自治区处于亚热带TM感染高流行区,当地居民有食用竹鼠的不良饮食习惯,而调查显示竹鼠携带TM比例高达96%,人食用竹鼠后具有极高的TM感染概率^[15],而HIV是TM感染的易感人群。因此,应高度警惕免疫功能低下人群的感染风险,识别易感危险因素对及早实施针对预防干预意义重大。本研究针对HIV患者TM感染的分析结果显示,196例HIV患者中,TM感染感染率37.24%,提示HIV患者TM感染率较高。

HIV对机体免疫系统的影响机制主要为^[16-19]:①攻击CD4⁺T淋巴细胞影响机体的细胞介导免疫反应;②破坏B淋巴细胞使机体无法产生足够的抗体对抗外来病原体;③损害巨噬细胞功能,使其不能有效地清除体内产生的病毒载量,同时损害其他的组织器官;④HIV感染后会诱导机体生成血小板抗体、单核巨噬系统增殖,增加对血小板的破坏,外周血小板减少,降低机体免疫系统功能和抗应激反应能力。上述机制可导致HIV患者机体免疫系统功能受损、功能障碍,导致机体对各种病菌的抵抗力显著下降。而TM作为一种机会致病真菌,在免疫功能低下的HIV患者中更容易趁虚而入。在本研究中,对196例HIV患者进行分析发现,随着HIV对免疫系统的破坏,患者感染TM的风险呈明显上升趋势。具体而言,CD4⁺T淋巴细胞被攻击后数量减少。已有研究表明,在HIV患者中,

免疫系统的上述受损机制与TM感染的发生率密切相关^[1]。黄强等^[20]的研究发现,CD4⁺T淋巴细胞计数低于一定水平的HIV患者,感染TM的风险大大增加。在本研究TM感染的51例HIV患者中,CD4⁺T淋巴细胞<100个/微升有48例,占比94.12%(48/51),CD4⁺T淋巴细胞最低为21个/微升。同时,B淋巴细胞功能受损后造成体液免疫应答缺陷,患者体内无法产生足够抗体,在面对TM入侵时难以有效抵御,增加易感性^[21]。此外,巨噬细胞功能受损不仅无法及时清除体内病毒载量,也难以有效应对TM^[22]。但因条件受限等客观因素影响,本研究未将B淋巴细胞、巨噬细胞两者作为变量纳入进行探讨,有待日后将两者纳入自变量作进一步研究探索。

本研究发现,年龄越大,合并有肺炎、血小板减少、白细胞减少,AST升高、CD4⁺T淋巴细胞计数<100个/微升的HIV患者TM感染的发生率较高。年龄越大、合并有肺炎的HIV患者TM感染风险是年龄越小、无肺炎患者的1.211、19.894倍(95%CI:1.059~1.386,1.263~313.249),原因可能为年龄越大的HIV患者机体代谢紊乱、免疫系统功能越差,且年龄增长可加速免疫衰老进展,过早的免疫衰老使肺炎等合并症的发生率升高,使之罹患机会性感染的风险亦随之增加^[23-24]。有血小板减少的HIV患者发生TM感染高,发生风险是无血小板减少患者的7.612倍(95%CI:1.319~43.936)。有白细胞减少HIV患者较无白细胞减少患者TM感染风险高(OR=16.464,95%CI:1.539~176.165)。白细胞是清除细菌、病毒、真菌等病原体参与炎症反应的一种血液细胞,具有维持免疫系统正常的功能,能保护机体免受感染,白细胞减少可导致机体免疫系统受损,增加感染的发生风险^[25]。AST升高与HIV患者TM感染呈正相关(B

=2.085),即有 AST 升高的 HIV 患者 TM 感染发生风险越高。AST 是临床评估肝损伤的重要指标,AST 升高可能为 TM 侵犯肝脏引起肝细胞线粒体损伤并促进 AST 释放入血所致^[26],提示 AST 升高能预测 HIV 患者合并 TM 感染。CD4⁺T 淋巴细胞计数与 TM 感染呈正相关($B = 0.372$),CD4⁺T 淋巴细胞计数 < 100 个/微升的 HIV 患者 TM 感染风险高于 ≥100 个/微升的患者($OR = 1.450, 95\% CI : 1.019 \sim 2.064$),即 CD4⁺T 淋巴细胞计数 < 100 个/微升则 TM 感染风险越高。CD4⁺T 淋巴细胞是人体最重要的免疫细胞,主要参与机体的细胞和体液免疫,其数量减少可导致机体免疫功能降低或缺陷,使机会性感染风险增加^[27]。文献报道,年龄、血小板减少、CD4⁺T 淋巴细胞数量、HBV/HCV 感染、机会性感染及抗病毒治疗相关联,是 HIV 感染/AIDS 患者病情进展及预后的预测指标^[28-29]。因此,临床医生应对上述影响因素予以重点关注。

本研究构建的 HIV 患者 TM 感染预测模型列线图,模型最终纳入年龄、肺炎、血小板减少、白细胞减少、AST 升高、CD4⁺T 淋巴细胞计数 6 个变量,这些变量均容易获取,临床可据此制定 HIV 患者 TM 感染的防治措施。该模型在建模组和验证组 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果均 > 0.05,校准曲线中预测结果与实际结果一致性较好,表明模型具有较好的区分度和校准度。临床决策曲线建模组和验证组风险范围显示为正向净收益率。

综上所述,HIV 对机体免疫系统受损机制是导致年龄越大、血小板减少、白细胞减少、AST 升高以及 CD4⁺T 淋巴细胞计数降低等危险因素出现的重要原因,也为构建 HIV 患者 TM 感染的预测模型提供了理论基础。在预测模型中,这些反映免疫系统受损的指标可以作为重要变量纳入,以更好地评估 HIV 患者感染 TM 的风险。目前,本研究仅选择本院收治的 HIV 患者进行单中心调查,存在样本代表性不足,可能导致结果存在一定偏倚,有待日后采用多中心调查,并将 B 淋巴细胞、巨噬细胞作为变量纳入作进一步研究验证。

参考文献:

[1] 卢焕,黎彦君,秦英梅,等. 艾滋病合并中枢性马尔尼菲篮状菌病临床特征[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(6): 674-679.

[2] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组. 艾滋病合并马尔尼菲篮状菌病诊疗专家共识(2024 年更新版)[J]. 中国艾滋病性病, 2024, 30(6): 563-572.

[3] NARAYANASAMY S, DOUGHERTY J, ROGIERVAN DOORN H, et al. Pulmonary talaromycosis: a window into the immunopathogenesis of an endemic mycosis[J].

Mycopathologia, 2021, 186(5): 707-715.

[4] SUN J J, SUN W W, TANG Y, et al. Clinical characteristics and risk factors for poor prognosis among HIV patients with Talaromyces marneffeii bloodstream infection[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 514-516.

[5] 邹盛华,方美兰,林珍丽,等. 马尔尼菲篮状菌病 18 例患者临床特征和微生物学检测分析[J]. 中国热带医学, 2023, 23(2): 139-145.

[6] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2021 年版)[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(11): 1182-1201.

[7] MORRISSEY CO, GILROY NM, MACESIC N, et al. Consensus guidelines for the use of empiric and diagnostic-driven antifungal treatment strategies in haematological malignancy, 2014[J]. Intern Med J, 2014, 44(12b): 1298-1314.

[8] 陈锋. 医用多元统计分析方法[M]. 北京: 中国统计出版社, 2000: 27-28.

[9] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 543.

[10] 中国成人血小板减少症急诊管理共识专家组. 中国成人血小板减少症急诊管理专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2022, 31(2): 161-168.

[11] ULLDEMOLINS M, ROBERTS JA, RELLO J, et al. The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients[J]. Clin Pharmacokin, 2011, 50(2): 99-110.

[12] 沈悌,赵永强. 血液病诊断及疗效标准[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2018: 14-15, 21-22.

[13] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 31-33.

[14] 周怡菲,廖克驹,黄自桥,等. 人类免疫缺陷病毒阴性马尔尼菲篮状菌感染 1 例[J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(6): 723-725.

[15] 蒋玲,李吉垚,夏铭楠. 肺结核并发马尔尼菲篮状菌和鸟分枝杆菌多重感染一例[J]. 中国防痨杂志, 2023, 45(11): 1108-1111.

[16] SALMINEN A. Immunosuppressive network promotes immunosenescence associated with aging and chronic inflammatory conditions[J]. J Mol Med(Berl), 2021, 99(11): 1553-1569.

[17] 颜新爽,秦玉荣,王素芳. 基线 CD4⁺T 淋巴细胞计数水平与 HIV/AIDS 患者抗病毒治疗后免疫重建结局的关系研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(4): 373-377.

[18] EJIGU S, HAILE D, SOLOMON Y. Effect of malaria and HIV/AIDS co-infection on red blood cell indices and its relation with the CD4 level of patients on HAART in Bench Sheko Zone, Southwest Ethiopia[J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0263865.

本文引文格式:叶三宁,贺艳,蒋芳,等.基于 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷抵抗关系指导冠心病患者抗血小板药物选择临床应用的研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):270-274.

【论著与临床报道】

基于 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷抵抗关系指导 冠心病患者抗血小板药物选择临床应用的研究

叶三宁¹,贺艳¹,蒋芳¹,王欣欣²

(1. 滁州城市职业学院,安徽 滁州 239000;

2. 安徽省滁州市第一人民医院心内科,安徽 滁州 239000)

摘要:目的 研究基于 CYP2C19 基因多态性和氯吡格雷抵抗关系指导冠心病患者抗血小板药物选择的临床应用的价值。方法 纳入滁州市第一人民医院心内科 2020 年 1 月至 2023 年 6 月收治的冠心病患者 634 例,采用简单随机抽样法分为研究组($n=317$)和对照组($n=317$)。两组均行经皮冠脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI),对照组术后接受阿司匹林、氯吡格雷常规双联抗血小板治疗,研究组则进行 CYP2C19 基因多态性检测,并根据基因检测结果指导氯吡格雷应用或替格瑞洛替换。对比两组患者用药前后最大血小板聚集率(MAR)变化并计算血小板反应指数(PRI),以及 PCI 术后 1 年主要不良心血管事件(MACE)、安全终点事件发生率,并使用多因素 Logistic 回归模型,分析与患者术后 1 年 MACE 发生的相关因素。结果 两组用药后 7 d 时 MAR 均较用药前下降,研究组用药后 7 d 时 MAR、PRI 均低于对照组($P<0.05$)。研究组失访 21 例,对照组失访 29 例,其余患者均纳入结果分析。研究组随访期间 MACE 发生率较对照组更低($P<0.05$),两组安全终点事件发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Logistic 多因素回归分析示,合并糖尿病是影响冠心病患者 PCI 术后 1 年内发生 MACE 的独立危险因素,基因指导治疗为保护性因素($P<0.05$)。结论 基于 CYP2C19 基因多态性和氯吡格雷抵抗关系指导冠心病患者 PCI 术后抗血小板药物选择,利于改善抗血小板治疗效果,降低 MACE 发生率,且安全性良好。

关键词:CYP2C19 基因多态性;氯吡格雷;冠心病;抗血小板药物

中图分类号:R541.4

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0270-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.012

Research on the clinical application of guiding the selection of antiplatelet drugs in patients with coronary heart disease based on the relationship between CYP2C19 gene polymorphism and clopidogrel resistance

YE Sanning¹, HE Yan¹, JIANG Fang¹, WANG Xinxin²

(1. Chuzhou City Vocational College, Chuzhou 239000, Anhui, China;

2. Department of Cardiology, The First People's Hospital of
Chuzhou, Anhui Province, Chuzhou 239000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To study the clinical value of guiding the selection of antiplatelet drugs in patients with coronary heart disease (CHD) based on the relationship between CYP2C19 gene polymorphism and clopidogrel resistance. **Methods** A total of 634 CHD patients admitted to the department of cardiology of the First People's Hospital of Chuzhou from January 2020 to June 2023 were enrolled and were randomly divided into a study group ($n=317$) and a control group ($n=317$) by simple random sampling method. Both groups underwent percutaneous coronary intervention (PCI). The control group received conventional dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel postoperatively, while the study group underwent CYP2C19 gene polymor-

基金项目:安徽省高校自然科学研究项目(2023AH052842)

第一作者:叶三宁,讲师,研究方向:心血管疾病, E-mail:13665505809@163.com

phism testing and was guided in clopidogrel application or switched to ticagrelor based on the genetic test results. The maximum platelet aggregation rate (MAR) changes before and after medication and the platelet reactivity index (PRI) were compared between the two groups. Additionally, the incidence of major adverse cardiovascular events (MACE) and safety endpoint events within 1 year after PCI was calculated. A multivariate logistic regression model was used to analyze the factors associated with the occurrence of MACE within 1 year after operation. **Results** The MAR decreased in both groups 7 days after medication compared to before medication, and the MAR and PRI in the study group were lower than those in the control group 7 days after medication ($P<0.05$). There were 21 cases of loss to follow-up in the study group and 29 cases in the control group, and the remaining patients were included in the result analysis. The incidence of MACE during the follow-up period was lower in the study group than in the control group ($P<0.05$), with no significant difference in the incidence of safety endpoint events between the two groups ($P>0.05$). Logistic multivariate regression analysis indicated that the comorbid diabetes was an independent risk factor for MACE within 1 year after PCI in CHD patients, and gene-guided therapy was a protective factor ($P<0.05$). **Conclusion** Guiding the selection of antiplatelet drugs for patients with CHD after PCI based on the relationship between CYP2C19 gene polymorphism and clopidogrel resistance is beneficial for improving the efficacy of antiplatelet therapy, reducing the incidence of MACE, and demonstrating good safety.

Key words: CYP2C19 gene polymorphism; clopidogrel; coronary heart disease; antiplatelet drugs

2023 年最新发布的中国心血管健康与疾病报告显示,我国心血管疾病患病人数高达 3.3 亿,其中冠心病患者数量超过 1 139 万,且患病人数呈逐年上升趋势,在影响患者生活质量的同时也带来了严重的社会和经济负担^[1]。经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention,PCI)是临床治疗冠心病的有效手段,且已被大量研究证实有助于心肌缺血的改善,但 PCI 术后支架内血栓形成直接影响患者预后,故有必要长期应用抗血小板药物^[2-3]。阿司匹林联合氯吡格雷是临床标准 PCI 术后抗血小板方案,但约 11%~44% 的患者对氯吡格雷低反应或无反应,即发生氯吡格雷抵抗,且氯吡格雷抵抗与心血管负性事件风险上升直接相关^[4]。研究显示,氯吡格雷经细胞色素酶 P450 代谢后方可转化为具有抗血小板聚集作用的活性产物,而作为 CYP450 酶系中重要药物代谢酶,CYP2C19 基因多态性直接影响着氯吡格雷代谢,并直接影响着抗血小板治疗效果^[5]。替格瑞洛是一种无需代谢激活即可直接作用于 P2Y12 受体并抑制血小板聚集的药物,近年来,越来越多的研究证实了替格瑞洛在 PCI 术后抗血小板治疗中的重要价值,但基于

CYP2C19 基因多态性指导抗血小板治疗药物选择的获益,当前证据的数量和质量均有限。为此,本研究纳入 634 例冠心病患者并进行 1 年随访,旨在为冠心病患者 PCI 术后抗血小板治疗方案的选择提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入滁州市第一人民医院心内科 2020 年 1 月至 2023 年 6 月收治的冠心病患者,纳入标准:①经冠状动脉造影检查明确诊断为冠心病^[6];②符合 PCI 治疗指征^[7];③预期生存期≥12 个月;④知晓研究内容并自愿参与研究。排除标准:①近期有出血性疾病发作史,或合并肝功能、凝血功能异常;②合并严重心功能不全,左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)≤30%;③合并恶性肿瘤;④对阿司匹林、氯吡格雷或造影剂过敏。共纳入符合条件的患者 634 例,采用简单随机抽样法分为研究组($n=317$)和对照组($n=317$)。两组患者基线 LVEF、病变数量等临床资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。本研究经本院医学伦理委员会批准后实施(伦理审批号 2020-01-13)。

表 1 两组患者一般临床资料比较

组别	n	性别		年龄/岁	基线 LVEF/%	病变数量	
		男	女			单支病变	多支病变
研究组	317	187(58.99)	130(41.01)	62.15±8.83	52.62±9.81	144(45.43)	173(54.57)
对照组	317	195(61.51)	122(38.49)	62.26±8.71	52.77±9.59	139(43.85)	178(56.15)
t/χ^2		0.422		0.158	0.195	0.160	
P		0.516		0.875	0.846	0.690	

注:表内计数资料数据用[$n(\%)$]表示,计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

1.2 治疗方案 两组患者均由同一组医护人员完成 PCI 治疗,术后均给予阿司匹林口服,每日 1 次、每次 300 mg,1 个月后减量至每日 1 次、每次 100 mg,长期服用。对照组患者给予氯吡格雷口服,每日 1 次、每次 75 mg,持续 1 年。研究组患者行 CYP2C19 基因多态性检测,包括全血 DNA 提取、目的基因 PCR 扩增、基因芯片杂交显色等步骤,并根据检测结果进行 CYP2C19 基因型分析。其中,CYP2C19 * 1/* 1、CYP2C19 * 1/* 2、CYP2C19 * 1/* 3 基因型判定为快代谢型,抗血小板治疗方案与对照组相同,CYP2C19 * 2/* 2、CYP2C19 * 2/* 3、CYP2C19 * 3/* 3 基因型判定为慢代谢型,将氯吡格雷口服更换为替格瑞洛口服,每日 2 次、每次 90 mg,持续 1 年。

1.3 观察指标

1.3.1 血小板聚集率和反应指数 分别于服药前及服药 7 d 后检测患者最大血小板聚集率(maximun aggregation rate,MAR)变化,并计算血小板反应指数(platelet reactivity index,PRI)。采集患者肘静脉血 2 mL,置于 3.2%枸橼酸钠抗凝真空管内,以 1200 r/min 离心 5 min,留取上层血浆即富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP);将剩余标本以 3 000 r/min 离心 6 min,留取上层血浆即贫血小板血浆(platelet-poor plasma,PPP)。将 250 μ L PRP 和 500 μ L PPP 分别置于 2 个比色杯中,向 PRP 内加入搅拌子,吸取 5 μ L 0.05 mmol/L 腺苷二磷酸加入 PRP,使腺苷二磷酸最终浓度达到 10 μ mol/L。使用血小板聚集仪检测 5 min 内最大 MAR。此外,参照 PLT VASP/P2Y12 试剂盒说明书测定 PRI,PRI 越低则表明对抗血小板治疗反应性越佳^[8]。

1.3.2 随访 采用电话随访、门诊访视等方式对患者开展为期 12 个月的随访,记录其术后 1 年主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular events,MACE)、安全终点事件发生。MACE 包括心源性死

亡、再发心肌梗死、靶血管再次血运重建、支架内血栓形成等。安全终点事件以出血事件发生计,参照出血学术研究会(BARC)定义, ≥ 2 级判定为小出血、 ≥ 3 级判定为大出血^[9]。

1.3.3 影响因素 按照患者 PCI 术后 1 年内是否发生 MACE,将其分别纳入发生组、未发生组,对比两组患者临床资料,将组间比较存在统计学差异的因素纳入多因素 Logistic 回归模型,分析与患者术后 1 年 MACE 发生的相关因素。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计学软件分析本研究相关数据,计数资料以(例数/百分比)即(n/%)表示,并采用 χ^2 检验;计量资料均符合正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示,采用双侧 t 检验;影响因素分析采用 Logistic 多因素回归模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAR 变化和 PRI 两组用药后 7 d 时 MAR 均较用药前下降,研究组用药后 7 d 时 MAR、PRI 均较对照组更低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者 MAR 变化和 PRI 比较

组别	n	MAR/%		PRI
		用药前	用药后 7 d	
研究组	317	53.51 $\pm$ 11.06	35.36 $\pm$ 6.72 ^a	45.88 $\pm$ 9.02
对照组	317	53.64 $\pm$ 10.88	41.08 $\pm$ 7.95 ^a	54.85 $\pm$ 10.76
t/χ^2		0.149	9.783	11.375
P		0.881	<0.001	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;与用药前比较,a: $P < 0.05$ 。

2.2 随访结果 研究组失访 21 例、对照组失访 29 例,其余患者均纳入结果分析。研究组随访期间 MACE 发生率较对照组更低($P < 0.05$),两组安全终点事件发生率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 两组患者随访期间 MACE 发生率比较

组别	n	心源性死亡	心肌梗死	靶血管再次血运重建	支架内血栓形成	其他	合计
研究组	296	1(0.34)	7(2.36)	5(1.69)	1(0.34)	5(1.69)	19(6.42)
对照组	288	2(0.69)	16(5.56)	7(2.43)	5(1.74)	6(2.08)	36(12.50)
χ^2							6.328
P							0.012

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.3 单因素分析 发生 MACE 组与未发生 MACE 组糖尿病患病率、治疗策略比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

2.4 多因素分析 将单因素分析中组间比较存在统

计学差异的因素纳入多因素分析。按表 6 赋值,Logistic 多因素回归分析示,合并糖尿病是影响冠心病患者 PCI 术后 1 年内发生 MACE 的独立危险因素,基因指导治疗为保护性因素($P < 0.05$)。见表 7。

表 4 两组患者随访期间安全终点事件发生率比较

组别	<i>n</i>	小出血	大出血	合计
研究组	296	29(9.80)	8(2.70)	37(12.50)
对照组	288	25(8.68)	6(2.08)	31(10.76)
χ^2				0.428
<i>P</i>				0.513

注：表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

表 5 发生与未发生 MACE 患者临床资料比较

临床资料	<i>n</i>	发生组 (<i>n</i> =55)	未发生组 (<i>n</i> =529)	<i>t</i> / χ^2	<i>P</i>
年龄/岁	584	62.23±7.64	62.08±8.81	0.122	0.903
基线 LVEF/%	584	52.14±9.59	52.81±9.62	0.492	0.623
性别				0.316	0.574
男	351	35(63.64)	316(59.74)		
女	233	20(36.36)	213(40.26)		
病变数量				0.396	0.529
单支病变	257	22(40.00)	235(44.42)		
多支病变	327	33(60.00)	294(55.58)		
合并症					
高血压	352	31(56.36)	321(60.68)	0.388	0.533
糖尿病	159	23(41.82)	136(25.71)	6.525	0.011
治疗策略				6.328	0.012
常规治疗	288	36(65.45)	252(47.64)		
基因指导治疗	296	19(34.55)	277(52.36)		

注：表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示，计数资料数据用[*n*(%)]表示。

表 6 多因素回归分析赋值表

变量名	变量类型	变量	赋值
Y	因变量	PCI 术后 1 年内发生 MACE	未发生=0,发生=1
X1	自变量	合并糖尿病	未合并=0,合并=1
X2	自变量	基因指导治疗	无=0,有=1

表 7 影响冠心病患者 PCI 术后 1 年内发生 MACE 的多因素回归分析结果

影响因素	<i>b</i>	<i>SE</i>	Wald χ^2	<i>P</i>	OR	95% <i>CI</i>
合并糖尿病	0.498	0.122	16.662	0.009	1.645	1.295~2.090
基因指导治疗	-0.433	0.185	5.478	0.003	0.649	0.451~0.932

3 讨论

当前,阿司匹林联合氯吡格雷双联抗血小板治疗仍为冠心病患者 PCI 术后首选标准治疗方案,但近年来欧美和我国针对非 ST 段抬高型急性冠脉综合征的诊疗指南更新,使得氯吡格雷在抗血小板治疗中的绝对地位有所动摇^[10]。其原因在于,越来越多的患者被检出 CYP2C19 基因突变,而 CYP2C19 基因突变会导致氯吡格雷抵抗,从而降低其有效血药浓度,并限制抗血小板治疗效果,增加支架内血栓形成的风险^[11]。

研究显示,白种人群 CYP2C19 基因慢代谢携带率仅为 3%、津巴布韦人群为 4%,韩国人群为 13%,而我国人群 CYP2C19 基因慢代谢携带率高达 15%~

17%^[12-13]。因此,对于我国冠心病患者而言,氯吡格雷 300 mg/d 负荷剂量、75 mg/d 维持剂量的给药模式可能亟需调整。替格瑞洛是一种无需代谢激活即可作用于 P2Y12 受体的新型抗血小板药物,其抗血小板作用主要通过阻碍腺苷二磷酸诱导下游信号传递而发挥,已有超过 2 万例多中心、随机对照研究证实了替格瑞洛在抗血小板治疗中的有效性和安全性^[14]。此次研究尝试基于 CYP2C19 基因多态性指导冠心病患者 PCI 术后抗血小板药物的使用,即将 CYP2C19 基因型慢代谢、氯吡格雷抵抗者的抗血小板药物由氯吡格雷更换为替格瑞洛,旨在取得更为理想的抗血小板聚集效果。结果显示,用药 7 d 后,研究组 MAR、PRI 均较对照组显著下降,其中,更低的 MAR 意味着研究组取得了更为理想的抗血小板聚集治疗效果,而 MAR 下降也被证实有助于冠心病患者 PCI 术后 MACE 的预防^[15]。得益于这一变化,研究组随访期间 MACE 发生率较对照组显著下降,其优势主要在于:基于 CYP2C19 基因多态性指导抗血小板药物选择,能够有效降低 PRI,以确保抗血小板治疗反应,从而预防支架内血栓形成,并在降低心血管缺血风险等方面取得显著获益,最终实现预后改善^[16]。同时,替格瑞洛对血小板的抑制过程具有可逆性,故其长期使用的安全性同样值得肯定。在本次研究中,两组患者安全终点比较差异无统计学意义,印证了上述结论。除此之外,有学者就替格瑞洛与双倍剂量氯吡格雷在预防 MACE 方面的效果开展对照研究,发现对于慢代谢型 CYP2C19 基因型患者而言,替格瑞洛的获益显著优于氯吡格雷^[17]。因此,基于 CYP2C19 基因多态性不仅有助于指导冠心病患者抗血小板药物的选择,未来替格瑞洛的广泛应用可能能够直接避免氯吡格雷低反应性的出现^[18]。本研究结果显示,除糖尿病外,基于 CYP2C19 基因多态性指导替格瑞洛替代应用,能够使冠心病患者 PCI 术后 MACE 发生风险下降 35.1%,再一次印证了基于基因指导治疗的重要意义。未来,本研究将对两组受试者开展进一步长期随访,以明确替格瑞洛停药后远期有效性和安全性,从而为抗血小板药物的选择提供更为充实的循证证据。

综上所述,基于 CYP2C19 基因多态性和氯吡格雷抵抗关系指导冠心病患者 PCI 术后抗血小板药物选择,对于改善抗血小板治疗效果、预防 MACE 发生有益,且安全性良好,值得推广应用。

参考文献:

[1] SHAWKY A,SABIT H,NAZIH M,et al. CYP2C19 polymorphism in ischemic heart disease patients taking clopidogrel after percutaneous coronary intervention in Egypt

[J]. J Epidemiol Glob Health, 2023, 13(2): 374-383.

[2] ROCHMAWATI I D, HIDAYAT N, POMANTOW D. The effect of loss-of-function allele (CYP2C19 * 3) with Clopidogrel efficacy in coronary heart disease patients[J]. Pharm Educ, 2021, 21(2): 178-183.

[3] 张先蒙, 谢骏, 张福娅. Lp-PLA2 与冠状动脉粥样硬化性心脏病的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2022, 43(3): 136-138, 147.

[4] LEE S H, JEONG Y H, HONG D, et al. Clinical impact of CYP2C19 genotype on clopidogrel-based antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2023, 16(7): 829-843.

[5] NAWAZ U, NOOR M, WAHEED A. Cytochrome P-450 CYP2C19 genetic polymorphism and its relation with clopidogrel resistance[J]. J Pak Med Assoc, 2023, 73(12): 2388-2392.

[6] 李宇, 王怀森, 冯晓俊, 等. 替格瑞洛对比氯吡格雷治疗携带 CYP2C19 功能缺失等位基因的轻度缺血性卒中或短暂性脑缺血发作患者有效性和安全性的系统评价[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(5): 678-683.

[7] ZHANG M, WANG J R, ZHANG Y, et al. Effects of individualized antiplatelet therapy, based on CYP2C19 genotyping, on platelet function in patients underwent percutaneous coronary intervention[J]. Perfusion, 2022, 37(1): 78-85.

[8] WÓJCIK T, KAROLKO B, WIŚNIEWSKI J, et al. The influence of acute coronary syndrome on the levels of clopidogrel active metabolite and platelet inhibition in patients with and without CYP2C19 * 2(681G>A), * 3(636G>A) and ABCB1 C3435C>T gene polymorphisms[J]. Postępy Kardiologii Interwencyjnej, 2021, 17(2): 179-186.

[9] 叶尔买克·唐沙哈尔, 阿依别克·乃比, 郭永忠. 新疆冠状动脉旁路移植术后患者氯吡格雷相关基因 CYP2C19 的多态性分析[J]. 临床心血管病杂志, 2024, 40(8): 665-668.

[10] YUAN X Y, LIU Y, ZHANG T, et al. The prognostic difference study on the individualized clopidogrel administration in Hmong and Dong patients based on the CYP2C19 gene polymorphism after percutaneous coronary intervention [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2024, 70(8): 110-115.

[11] 莫秀丽, 曾梨, 陈文. 冠心宁片治疗稳定性冠心病的临床疗效及对血清 VEGF、ET-1、NO 的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(3): 83-85.

[12] 时官支, 陈国芳, 姚美雪, 等. CYP2C19 基因快检功能缺失等位基因型 sICAS 患者氯吡格雷剂量的探索研究[J]. 徐州医科大学学报, 2023, 43(10): 732-738.

[13] OSAMA S, WIRTH F, ZAHRA G, et al. CYP2C19 * 2 genetic polymorphism and incidence of in-stent restenosis in patients on clopidogrel: a matched case-control study[J]. Drug Metab Pers Ther, 2021, 37(2): 155-161.

[14] SUSLEYICI B, CİFTÇİ C, YURDAKUL S, et al. Prevalence of CYP2C19 polymorphisms in clopidogrel treated turkish patients: preliminary results, 2017[J]. Curr Pharmacogenomics Pers Med, 2021, 18(2): 116-122.

[15] 马冬娇, 陈国芳, 冯尧, 等. 强化氯吡格雷对 CYP2C19 中慢代谢型轻型卒中患者的疗效与安全性[J]. 中国临床研究, 2022, 35(8): 1051-1054.

[16] LEE S Y, BAE D H, KIM M, et al. Clinical impact of platelet reactivity and gene polymorphisms in patients with ischemic heart disease after percutaneous coronary intervention[J]. Cardiovasc Interv, 2022, 1(4): 168.

[17] 孙雪, 格桑罗布, 张令军, 等. CYP2C19 基因与氯吡格雷关系研究的文献计量学及可视化分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2021, 19(2): 36-39.

[18] ALKATTAN A, ALMUTAIRI Y, ALSALAMEEN E, et al. The CYP2C19 genotypes and its effect on clopidogrel as an anti-platelet drug among the Arab population[J]. Indian J Pharmacol, 2021, 53(1): 85-87.

收稿日期: 2024-10-16; 修回日期: 2024-11-22

(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:张全,刘丽雯,莫远新,等.低密度脂蛋白与转铁蛋白比值在肺癌患者中的预后价值[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):275-280.

【论著与临床报道】

低密度脂蛋白与转铁蛋白比值在肺癌患者中的预后价值

张全,刘丽雯,莫远新,陆榆金,邱模勤,丘宏图,苏翠云,赵文华
(广西医科大学附属肿瘤医院呼吸肿瘤内科,广西南宁 530021)

摘要:**目的** 研究低密度脂蛋白与转铁蛋白比值(LTR)在接受免疫治疗的晚期非小细胞肺癌患者中的预后价值。**方法** 利用回顾性分析的方法纳入广西医科大学附属肿瘤医院 2019 年 3 月 10 日至 2022 年 12 月 31 日期间入院的 168 例驱动基因阴性的非小细胞肺癌患者的住院信息,用受试者工作特征曲线(ROC)找到最佳截断值对 LTR 进行分组,并进行两组间单因素和多因素 COX 分析,评估影响预后的因素。使用卡普兰梅尔(Kaplan-Meier)和分层分析评估两组预后差异。**结果** 高 LTR 组(≥ 1.43 mmol/L)显示出较高的死亡风险(单因素 $HR = 1.88, 95\% CI: 1.04 \sim 3.40, P = 0.036$;多因素 $HR = 3.60, 95\% CI: 1.02 \sim 12.67, P = 0.046$)。Kaplan-Meier 分析表明高 LTR 组生存期较短($P = 0.033$)。分层分析显示 LTR 在 65 岁以下患者和无肝转移的患者中有显著预测价值。**结论** LTR 可作为接受一线免疫联合化疗治疗晚期非小细胞患者的潜在预后生物标志物,特别是在年轻患者和无肝转移的患者中。

关键词:转铁蛋白;低密度脂蛋白;免疫治疗;癌,非小细胞肺

中图分类号:R730.26

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0275-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.013

Prognostic value of the low-density lipoprotein to transferrin ratio in patients with lung cancer

ZHANG Quan, LIU Liwen, MO Yuanxin, LU Yujin, QIU Moqin,
QIU Hongtu, SU Cuiyun, ZHAO Wenhua

(Department of Respiratory Oncology, Affiliated Tumor Hospital of
Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prognostic value of low-density lipoprotein to transferrin ratio (LTR) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) undergoing immunotherapy. **Methods** A retrospective analysis was conducted on the hospitalization information of 168 patients with driver gene-negative NSCLC admitted to the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University from March 10, 2019, to December 31, 2022. The optimal cutoff value for LTR was determined using the receiver operating characteristic (ROC) curve, and patients were grouped accordingly. Univariate and multivariate Cox regression analyses were performed to assess factors influencing prognosis. The Kaplan-Meier method and stratified analysis were used to evaluate prognostic differences between the two groups. **Results** The high LTR group (≥ 1.43 mmol/L) exhibited a higher risk of mortality (univariate $HR = 1.88, 95\% CI: 1.04$ to $3.40, P = 0.036$; multivariate $HR = 3.60, 95\% CI: 1.02$ to $12.67, P = 0.046$). Kaplan-Meier analysis indicated shorter survival in the high LTR group ($P = 0.033$). Stratified analysis revealed significant prognostic value of LTR in patients

基金项目:广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2023092)

第一作者:张全,硕士,住院医师,研究方向:呼吸系统肿瘤,E-mail:quanzhang549@gmail.com

通讯作者:赵文华,博士,主任医师,研究方向:呼吸系统肿瘤,E-mail:3194753378@qq.com

under 65 years old and those without liver metastasis. **Conclusion** LTR can serve as a potential prognostic biomarker for patients with advanced NSCLC receiving first-line immunotherapy combined with chemotherapy, particularly in younger patients and those without liver metastasis.

Key words: transferrin; low-density lipoprotein; immunotherapy; carcinoma, non-small cell lung

肺癌在全球癌症中的发病率和死亡率均居首位,肺癌中约 3/4 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)。目前免疫检查点(Programmed cell death 1 ligand 1,PD-L1)/(Programmed Cell Death 1,PD-1)抑制剂联合化疗是晚期驱动基因阴性 NSCLC 患者的标准一线治疗^[1],然而它的总体治疗的反应率仅为 20%~40%。目前有几种生物标志物可以预测肿瘤免疫治疗相关的疗效,例如 PD-L1 的表达、肿瘤突变负荷、微生物组成等^[2-3]。然而,这些生物标志物仍存在局限性,例如 PD-L1 表达在空间和时间上存在差异,同一患者的检测结果可能在不同时间和不同检测部位得到不同的结果^[4];肿瘤突变负荷仅在高负荷患者组有一定的预测作用^[5]。免疫治疗的效果依赖于 T 细胞,以前的研究通常将低密度脂蛋白(LDL)与心血管疾病联系起来。但最近的研究表明,LDL 在 CD8⁺T 细胞抗肿瘤免疫中是必需的^[6]。另一方面,铁可以影响葡萄糖和脂肪代谢,转铁蛋白和转铁蛋白受体信号通路对肿瘤的形成和癌变至关重要,其载体也广泛用于肿瘤治疗^[7-8]。综上,LDL 和转铁蛋白在肿瘤发展中扮演着各自独特且互补的角色,两者的相关性尚不明确,本研究通过将低密度脂蛋白与转铁蛋白比值(LTR)作为研究指标,旨在消除单一因素潜在的量级差异和测量偏差,从而使得研究结果更具可比性和科学性。

1 对象与方法

1.1 研究对象 采用回顾性研究的方法,资料来自于 2019 年 3 月 10 日至 2022 年 12 月 31 日期间在广西医科大学附属肿瘤医院呼吸肿瘤内科住院的患者。患者资料纳入标准:①年满 18~80 岁;②肿瘤体力状态评分(ECOG)0~2 分;③组织学或者病理学确诊的非驱动基因阳性(EGFR 基因突变、ALK 融合、ROS1 融合、BRAF V600/NTRK 融合、MET14 外显子跳跃突变、RET 融合、KRAS G12C、HER-2 突变)的 NSCLC 患者;④国际肺癌联盟(IASLC)肺癌第八版分期ⅣA 或ⅣB 期;⑤一线接受过至少两周期的 PD-1 抑制剂联合化疗方案。排除标准包括:①治疗前未检测 LDL 或转铁蛋白;②缺少随访数据。共有 168 例患者被纳入进一步分析,研究中每 3 个月进行 1 次随访,最后随访时间为 2023 年 8 月 15 日。筛选流程见图 1。

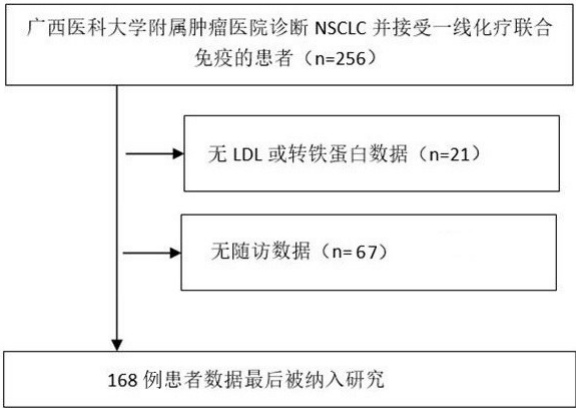


图 1 筛选患者流程图

1.2 数据收集及分析 本研究收集的患者资料包括性别、年龄、肿瘤转移(转移部位被分开考虑,以单独评估各个部位转移对预后的影响)、ECOG 评分、病理类型、吸烟史(当前吸烟或曾经有过吸烟行为记为有吸烟史,否则为无吸烟史)、转移部位、病理分期、LDL、转铁蛋白,将 LTR 数值变量用 PowerStats (<https://www.empowerstats.com>, X and Y Solutions, Inc, Boston, MA)的受试者工作特征曲线(ROC)方法,选取最佳截断值 1.43 mmol/L 作为分界点,转换为二分类变量,即高 LTR 组(LTR≥1.43 mmol/L)和低 LTR 组(LTR<1.43 mmol/L)。研究设计已得到广西医科大学附属肿瘤医院伦理审查委员会的批准,审查委员会批准号为 LW2024108。

1.3 分析方法 分类变量以频率和百分比显示,连续变量以($\bar{x} \pm s$)显示。连续和分类变量的测量使用了学生 t 检验和皮尔逊 χ^2 检验。为了确认治疗前 LTR 对总生存期(OS)的独立预测影响,使用了单因素和多因素 COX 风险回归模型分析。通过 Kaplan-Meier 生存分析来确定治疗开始时的 LTR 水平是否可以作为预测 NSCLC 患者联合免疫治疗和化疗疗效的预后生物标志物。为了进一步评估 LTR 在不同患者特征中的预测效力,还进行了分层分析。本研究统计分析使用了 R(<https://www.R-project.org>)和 PowerStats 软件。双侧 $P < 0.05$ 被视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 人群特征 共有 168 例患者资料被纳入分析(见表 1),其中低 LTR 组(LTR<1.43 mmol/L)73 例,高 LTR 组(LTR≥1.43 mmol/L)95 例。由于临床样本条件、检测时间等问题,部分患者未能获得 PD-L1 相

关检测数据,共获得 PD-L1 检测数据共 75 例。两组的分布仅在肝转移方面差异有统计学意义($P < 0.05$),而在年龄、性别、吸烟史、ECOG 评分、病理类型、PD-L1 表达、TNM 分期或脑转移方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 人群基线特征			
因素	LTR<1.43 mmol/L (<i>n</i> = 73)	LTR≥1.43 mmol/L (<i>n</i> = 95)	<i>P</i>
年龄/岁			0.271
<65	52(71.23)	60(63.16)	
≥65	21(28.77)	35(36.84)	
性别			0.506
男	52(71.23)	72(75.79)	
女	21(28.77)	23(24.21)	
吸烟史			0.749
无	32(43.84)	44(46.32)	
有	41(56.16)	51(53.68)	
ECOG 评分			0.529
0	20(27.40)	22(23.16)	
1~2	53(72.60)	73(76.84)	
病理类型			0.771
腺癌	45(61.64)	54(56.84)	
鳞癌	23(31.51)	35(36.84)	
其他	5(6.85)	6(6.32)	
PD-L1			0.479
<1	9(36.00)	14(28.00)	
≥1	16(64.00)	36(72.00)	
TNM 分期			0.344
ⅣA	43(58.90)	49(51.58)	
ⅣB	30(41.10)	46(48.42)	
脑转移			0.052
无	68(93.15)	79(83.16)	
有	5(6.85)	16(16.84)	
肝转移			0.015
无	67(91.78)	74(77.89)	
有	6(8.22)	21(22.11)	
骨转移			0.417
无	49(67.12)	58(61.05)	
有	24(32.88)	37(38.95)	

注:表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

2.2 单因素 COX 回归分析 与非吸烟者相比,有吸烟史的患者死亡风险增加了 81%($P = 0.045$),而高 LTR 组患者的死亡风险是低 LTR 组的 1.88 倍($P = 0.036$)。年龄、性别、ECOG 评分、PD-L1 表达、TNM 分期和转移部位在死亡风险上差异无统计学意义,见表 2。

2.3 多因素 COX 回归分析 调整了年龄、性别、吸烟史、ECOG 评分、PD-L1 表达、TNM 分期和转移等变量,得到了与单因素分析一致的结果($P = 0.046$),见表 3。

2.4 Kaplan-Meier 生存分析 高 LTR 组患者的 OS 为 12.4 个月,而低 LTR 组患者的 OS 为 15 个月。两组之间的生存差异有统计学意义($P = 0.033$),见图 2。

表 2 单因素 COX 回归分析				
因素	<i>n</i> (%)	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
年龄/岁				
<65	112(66.67)	1.00		
≥65	56(33.33)	1.37	0.78~2.41	0.269
性别				
男	124(73.81)	1.00		
女	44(26.19)	0.68	0.35~1.32	0.251
吸烟史				
无	76(45.24)	1.00		
有	92(54.76)	1.81	1.01~3.25	0.045
ECOG 评分				
0	42(25.00)	1.00		
1~2	126(75.00)	1.90	0.94~3.82	0.072
病理类型				
腺癌	99(58.93)	1.00		
鳞癌	58(34.52)	0.88	0.50~1.56	0.662
其他	11(6.55)	0.00	0.00~Inf	0.995
PD-L1				
<1	23(30.67)	1.00		
≥1	52(69.33)	1.30	0.47~3.58	0.614
TNM 分期				
ⅣA	92(54.76)	1.00		
ⅣB	76(45.24)	1.50	0.86~2.60	0.151
脑转移				
无	147(87.50)	1.00		
有	21(12.50)	1.58	0.79~3.16	0.192
肝转移				
无	141(83.93)	1.00		
有	27(16.07)	1.07	0.52~2.20	0.853
骨转移				
无	107(63.69)	1.00		
有	61(36.31)	0.98	0.55~1.75	0.941
LTR				
<1.43 mmol/L	73(43.45)	1.00		
≥1.43 mmol/L	95(56.55)	1.88	1.04~3.40	0.036

注:表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

表 3 多因素 COX 分析			
因素	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
LTR<1.43 mmol/L	1.00		
LTR≥1.43 mmol/L	3.60	1.02~12.67	0.046

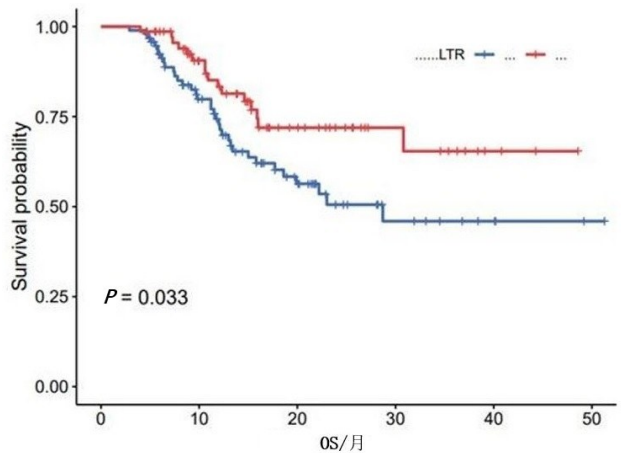


图 2 不同 LTR 分组下患者 OS 的生存曲线

2.5 分层分析 在没有肝转移的晚期 NSCLC 患者中,LTR 对免疫联合化疗的预测效力更高 ($P = 0.012$),在年龄 <65 岁患者中也发现了同样的规律 ($P = 0.009$),见表 4。

表 4 分层分析				
因素	<i>n</i>	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
年龄/岁				
<65	112(66.67)	3.42	1.37~8.54	0.009
≥65	56(33.33)	0.85	0.28~2.61	0.773
性别				
男	124(73.81)	2.12	0.95~4.72	0.066
女	44(26.19)	1.86	0.46~7.58	0.387
吸烟史				
无	76(45.24)	2.03	0.63~6.47	0.234
有	92(54.76)	2.24	0.93~5.42	0.074
ECOG 评分				
0	42(25.00)	5.14	0.94~28.14	0.059
1~2	126(75.00)	1.64	0.75~3.54	0.213
PD-L1				
<1	23(30.67)	3.20	0.30~34.59	0.338
≥1	52(69.33)	3.96	0.78~20.20	0.098
TNM 分期				
ⅣA	92(54.76)	2.32	0.88~6.12	0.088
ⅣB	76(45.24)	1.77	0.65~4.82	0.265
脑转移				
无	147(87.50)	2.00	0.95~4.24	0.069
有	21(12.50)	1.50	0.20~11.54	0.697
肝转移				
无	141(83.93)	2.68	1.25~5.75	0.012
有	27(16.07)	0.40	0.06~2.57	0.334
骨转移				
无	107(63.69)	2.27	0.97~5.33	0.060
有	61(36.31)	1.82	0.55~6.07	0.327

注:表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

3 讨论

本研究共有 168 例接受化疗联合免疫治疗的 NSCLC 患者资料被纳入分析,单因素和多因素 COX 回归分析结果均表示治疗前高 LTR 组的生存期较短。同时,在分层分析中结果显示,LTR 水平在年龄较小和无肝脏转移的患者组中,更具有提示意义。

目前少有将铁代谢指标和脂肪代谢指标联合预测 NSCLC 预后的研究。然而,既往研究表明铁和脂质代谢所代表的代谢重编程在肿瘤的发生发展中扮演着至关重要的角色^[9]。科学界普遍认同肥胖与某些癌症的发展有关^[10],肥胖本身已被证实是肿瘤远处转移和耐药的一个重要风险因素^[11]。LDL 可以向癌细胞提供胆固醇,满足肿瘤细胞生长的高胆固醇需求^[12]。特别是在肺癌中,有研究发现高 LDL 水平与预后不良相关,这其中就包括接受免疫治疗和靶向治疗的患者^[13]。脂肪代谢促进肿瘤生长的能力与它能够抑制

免疫微环境有关。更多的 LDL 吸收增加了其与 CD36 (一种清道夫受体)的结合^[14],通过 CD36 CAF 中的脂质过氧化/p38/CEBPs 轴招募 CD33 来源的髓系抑制细胞,增强免疫抑制的肿瘤微环境。有研究表明,LDL 通过调节细胞表面 T 细胞受体和 MHC-I 的水平的 PCSK9(一种前蛋白酶)调控癌症中的免疫检查点^[6]。目前,各种药物正在与 PCSK9 抑制剂和免疫检查点抑制剂联合研究中^[15]。肿瘤的代谢重编程从不孤立发生。如前所述,PCSK9 促进 LDL 受体的降解并提高 LDL 水平,且被 SREBP 负向调控^[16-17]。SREBF 是脂肪调节的促进因子,在包括胶质母细胞瘤、前列腺癌和乳腺癌在内的各种肿瘤背景中异常表达^[18]。研究表明,在黑色素瘤中,SREBF2 结合的启动子的一个亚组调控参与铁稳态的基因^[19],诱导转铁蛋白的转录。转铁蛋白在肝脏中合成,其主要作用是运输铁,肿瘤细胞通常需要大量铁以支持其快速增长和增殖。转铁蛋白通过运输铁间接影响肿瘤细胞的铁获取和生长,失调的铁代谢影响免疫细胞。鸟苷三磷酸环化酶 1 促进了激活 T 细胞中的线粒体铁转运蛋白和线粒体铁蛋白的表达。同样,铁的减少会减少 B 细胞的增殖^[20],而铁的增加则促进浆细胞分化和 IgG 的产生^[21]。因此,多项研究聚焦于靶向铁死亡以增强癌症治疗免疫疗法的有效性,铁的减少预示着肿瘤的不良预后^[22-23]。综上,高 LDL 水平以及低转铁蛋白水平均能通过影响肿瘤微环境中的免疫活性,对肿瘤的免疫调节产生抑制作用。本研究选择将 LTR 作为生物标志物来评估其对肺癌免疫治疗的潜在影响,这种比值的使用可以更综合地反映出患者体内两种重要代谢过程的交互作用,进而提供更全面的预后信息。通过分析 LTR,能够探索并验证这两种标志物在调节免疫反应及肿瘤生长中的协同作用,为开发新的治疗策略提供理论基础。

不同年龄肿瘤患者的免疫功能不同,有研究显示外周 T 细胞比例随年龄增长逐渐下降^[24],年龄较小的患者更容易调动体内的免疫来抵抗肿瘤。在本研究的分层分析中,LTR 在年龄≥65 周岁的患者中预测效能更好,这也和上文提到的 LTR 对免疫调节功能有关。肝脏会调节外周血液中 LDL 和转铁蛋白水平^[25],同时肝脏转移肿瘤会改变局部微环境,导致免疫抑制因子的增加,使抗肿瘤药物可依赖的肿瘤免疫反应减弱^[26],在本研究中就体现在 LTR 在有肝转移晚期 NSCLC 患者中的预测效能不佳。

以往的研究主要集中在脂肪代谢或铁代谢对于肿瘤发生发展的影响,但是很少有将二者看作整体来研究。本研究通过观察 LTR 对免疫联合化疗治疗肿瘤患者 OS 的影响,选择了合适的统计分析方法,通过分层分析来找出 LTR 在不同人群特征上的预测效果。

LTR 作为一种潜在的预后生物标志物,其临床应用前景值得进一步探讨。首先,LTR 的测定相对简单且成本较低,只需要常规的血生化检查即可获得,这使得其在临床上的推广具有可行性。相比于其他需要复杂基因检测的免疫标志物,如 PD-L1 表达或肿瘤突变负荷(TMB),LTR 的易获得性使得其特别适合在资源有限的环境中使用。此外,LTR 的使用可以帮助临床医生更好地为患者制定个体化的治疗策略。对于高 LTR 的患者,可能需要更加积极的干预措施,例如更频繁的随访或联合使用其他治疗药物来控制肿瘤进展。结合其他生物标志物使用,LTR 还可以作为一个辅助指标,帮助筛选可能受益于免疫治疗的患者。然而,在将 LTR 应用于临床之前,还需要进一步的前瞻性研究来验证其在不同人群中的预测效能和临床应用价值。例如,本研究中所纳入的患者全部来自于单一医院,这可能会导致一定的选择性偏倚。未来的研究应包括来自不同地区和种族背景的患者,以增强结论的普适性。尽管本研究得出了 LTR 作为 NSCLC 患者预后生物标志物的初步结论,但依然存在一些局限性。首先,本研究的样本量相对有限,仅纳入了 168 例患者,这可能会影响统计分析的稳定性。未来的研究可以通过多中心、大样本的设计来进一步验证 LTR 的预测价值。此外,LTR 在肿瘤治疗中的机制尚不完全明确,虽然本研究提出了一些可能的生物学机制,但这些机制仍需要通过体内和体外实验进行验证。未来的研究还可以探索如何有效干预 LDL 和转铁蛋白的代谢来改善患者的预后。例如,PCSK9 抑制剂已被证实能够通过降低 LDL 水平来改善心血管健康,是否能够在癌症患者中起到类似的抗肿瘤作用,值得进一步研究。此外,调节铁代谢的药物,如铁螯合剂,是否能够改善高 LTR 患者的免疫反应,也是一个值得探索的方向。

综上所述,LTR 作为一个新型的预后生物标志物,具有重要的临床应用潜力。它不仅能够反映肿瘤代谢的综合状态,还能够一定程度上预测免疫治疗的疗效,为个体化治疗提供参考依据。希望未来通过更多的基础和临床研究,能够进一步验证和扩展这一发现,使 LTR 真正应用于临床实践中,造福更多的晚期 NSCLC 患者。

参考文献:

[1] NOVELLO S,KOWALSKI D M,LUFT A,et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in squamous non-small-cell lung cancer: 5-year update of the phase III KEY-NOTE-407 study[J]. J Clin Oncol, 2023, 41(11): 1999-2006.

[2] LANTUEJOUL S,SOUND-TSAO M,COOPER W A,et al. PD-L1 testing for lung cancer in 2019: perspective from the IASLC pathology committee[J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(4): 499-519.

[3] TRAVIS W D,DACIC S,WISTUBA I,et al. IASLC multidisciplinary recommendations for pathologic assessment of lung cancer resection specimens after neoadjuvant therapy[J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(5): 709-740.

[4] HIRSCH F R,MCELHINNY A,STANFORTH D,et al. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the blueprint PD-L1 IHC assay comparison project[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(2): 208-222.

[5] RIZVI N A,CHO B C,REINMUTH N,et al. Durvalumab with or without tremelimumab vs standard chemotherapy in first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer: the MYSTIC phase 3 randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol, 2020, 6(5): 661-674.

[6] YUAN J J,CAI T,ZHENG X J,et al. Potentiating CD8+ T cell antitumor activity by inhibiting PCSK9 to promote LDLR-mediated TCR recycling and signaling[J]. Protein Cell, 2021, 12(4): 240-260.

[7] KIM H,VILLAREAL L B,LIU Z L,et al. Transferrin receptor-mediated iron uptake promotes colon tumorigenesis[J]. Adv Sci(Weinh), 2023, 10(10): e2207693.

[8] CANDELARIA P V,LEOH L S,PENICHET M L,et al. Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents[J]. Front Immunol, 2021, 12: 607692.

[9] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31-46.

[10] PETRELLI F,CORTELLINI A,INDINI A,et al. Association of obesity with survival outcomes in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(3): e213520.

[11] LI S,WU T,LU Y X,et al. Obesity promotes gastric cancer metastasis via diacylglycerol acyltransferase 2-dependent lipid droplets accumulation and redox homeostasis[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101596.

[12] MAYENGBAM S S,SINGH A,PILLAI A D,et al. Influence of cholesterol on cancer progression and therapy [J]. Transl Oncol, 2021, 14(6): 101043.

[13] KARAYAMA M,INUI N,INOUE Y,et al. Increased serum cholesterol and long-chain fatty acid levels are associated with the efficacy of nivolumab in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2022, 71(1): 203-217.

[14] ZHU G Q,TANG Z,HUANG R,et al. CD36⁺ cancer-associated fibroblasts provide immunosuppressive microenvironment for hepatocellular carcinoma via secretion of macrophage migration inhibitory factor[J]. Cell

Discov,2023,9(1):25.

[15] WOLCHOK J D,KLUGER H,CALLAHAN M K,et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma [J]. N Engl J Med,2013,369(2):122-133.

[16] KATSUKI S,JHA P K,LUPIERI A,et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) promotes macrophage activation via LDL receptor-independent mechanisms[J]. Circ Res,2022,131(11):873-889.

[17] HORTON J D,SHAH N A,WARRINGTON J A,et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(21):12027-12032.

[18] CHEN M,ZHANG J W,SAMPIERI K,et al. An aberrant SREBP-dependent lipogenic program promotes metastatic prostate cancer[J]. Nat Genet,2018,50(2):206-218.

[19] HONG X,ROH W,SULLIVAN R J,et al. The lipogenic regulator SREBF2 induces transferrin in circulating melanoma cells and suppresses ferroptosis [J]. Cancer Discov,2021,11(3):678-695.

[20] CRONIN S J F,SEEHUS C,WEIDINGER A,et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer [J]. Nature,2018,563(7732):564-568.

[21] HILL D L,CARR E J,RUTISHAUSER T,et al. Im-

mune system development varies according to age,location,and anemia in African children[J]. Sci Transl Med,2020,12(529):eaaw9522.

[22] WANG W M,GREEN M,CHOI J E,et al. CD8⁺ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy[J]. Nature,2019,569(7755):270-274.

[23] CHIANG H C,LIN M Y,LIN F C,et al. Transferrin and prealbumin identify esophageal cancer patients with malnutrition and poor prognosis in patients with normal albuminemia;a cohort study[J]. Nutr Cancer,2022,74(10):3546-3555.

[24] XU Z H,HAN D L,ZHANG Y,et al. The effects of aging,sex,and tumor burden on the peripheral blood immune cell profile and absolute counts [J]. J Cancer,2024,15(12):3930-3938.

[25] KNOPP R H. Introduction: low-saturated fat, high-carbohydrate diets:effects on triglyceride and LDL synthesis, the LDL receptor, and cardiovascular disease risk [J]. Proc Soc Exp Biol Med,2000,225(3):175-177.

[26] LI J J,WANG J H,TIAN T,et al. The liver microenvironment orchestrates FGL1-mediated immune escape and progression of metastatic colorectal cancer[J]. Nat Commun,2023,14(1):6690.

收稿日期:2025-01-09;修回日期:2025-02-20

(本文编辑 钟琳)

(上接第 269 页)

[19] 门娅玲,何伶俐,赵春蓉,等. 人类免疫缺陷病毒相关免疫性血小板减少症患者糖皮质激素治疗后复发的影响因素[J]. 中国性科学,2023,32(1):133-137.

[20] 黄强,王宇,江渊,等. (1-3)-β-D 葡聚糖联合降钙素原、CD4⁺ T 淋巴细胞多指标在艾滋病患者马尔尼菲篮状菌感染早期诊断临床研究[J]. 中国真菌学杂志,2024,19(1):21-24,29.

[21] 郭娜,宋爱心,张秋月,等. HIV-1 感染早期 B 淋巴细胞免疫应答研究进展[J]. 中国病毒病杂志,2018,8(2):109-113.

[22] 沈林霞. 马尔尼菲篮状菌通过精氨酸代谢影响巨噬细胞极化和杀伤的机制[D]. 南宁:广西医科大学,2019.

[23] 郭悦,张燕琳,朱丹,等. 病毒学抑制的 HIV-1 感染者免疫衰老相关 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群的分析[J]. 现代预防医学,2022,49(12):2262-2270.

[24] PATEL P P,WELLER J H,WESTERMANN C R,et al. Appendectomy and cholecystectomy outcomes for pediatric cancer patients with leukopenia;a NSQIP-pediat-

ric study[J]. J Surg Res,2021,267:556-562.

[25] WANG G,WEI W D,JIANG Z S,et al. Talaromyces marneffeii activates the AIM2-caspase-1/-4-GSDMD axis to induce pyroptosis in hepatocytes[J]. Virulence,2022,13(1):963-979.

[26] 张怡洁,黄金龙,杨薇. 艾博韦泰治疗获得性免疫缺陷综合征的效果及药物不良反应[J]. 中国药物与临床,2024,24(2):125-129.

[27] 樊慧峰,曾森强,黄莉,等. 人类免疫缺陷病毒阴性儿童马尔尼菲篮状菌感染 11 例外周血免疫学特征及基因变异分析[J]. 中华实用儿科临床杂志,2024,39(1):44-48.

[28] 戴国瑞,种雪静,肖江,等. 成人 HIV/AIDS 病人 HAART 前血小板减少的发生率及相关因素分析[J]. 中国艾滋病性病,2016,22(11):860-863.

[29] 何清辉,黄劲华,罗育勤,等. 高效抗逆转录病毒治疗 AIDS 伴有严重血小板低下的疗效观察[J]. 数理医药学杂志,2019,32(3):334-336.

收稿日期:2024-10-06;修回日期:2024-12-23

(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:练梦南,李浩,陈敏,等.长链非编码 RNA *HOXA11-AS* 在早期妊娠稽留流产绒毛组织中的表达和临床意义[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):281-285,290.

【论著与临床报道】

长链非编码 RNA *HOXA11-AS* 在早期妊娠 稽留流产绒毛组织中的表达和临床意义

练梦南¹,李浩¹,陈敏²,许誉耀²,宾仕凤¹,梁雁¹,农艳玫¹,陈秋霞¹,龚丽森¹

(1. 广西南宁市第八人民医院妇科,广西南宁 530003;

2. 广西南宁市第八人民医院检验科,广西南宁 530003)

摘要:目的 探究长链非编码 RNA(lncRNA) *HOXA11-AS* 在稽留流产绒毛组织中表达水平和临床意义。方法 选取 2022 年 9 月至 2023 年 8 月在某院就诊的 118 例稽留流产妇女作为研究组,125 例正常妊娠行人工流产终止妊娠妇女作为对照组,检测并比较两组绒毛组织中 *HOXA11-AS* 的表达水平。分析 *HOXA11-AS* 表达与孕妇人口学和临床特征、血清 VEGF 水平及稽留流产发生的相关性。并探究 *HOXA11-AS* 表达在稽留流产发生中的预测效能。结果 研究组中 *HOXA11-AS* 的表达水平较对照组的低($P < 0.001$)。有流产史的孕妇 *HOXA11-AS* 表达水平较无流产史的低($P = 0.019$)。*HOXA11-AS* 表达水平与孕妇血清 VEGF 水平呈正相关($r_s = 0.290, P < 0.001$)。多因素分析模型中,*HOXA11-AS* 表达水平越低则孕妇发生稽留流产的风险越高($P < 0.05$)。*HOXA11-AS* 表达水平预测稽留流产发生的曲线下面积为 0.702(95% *CI*: 0.640~0.759)。结论 *HOXA11-AS* 在稽留流产中低表达,并与血清 VEGF 有关,可作为预测稽留流产发生的潜在生物标志物,为临床早期评估稽留流产发生,针对性采取干预措施提供依据。

关键词:RNA,长链非编码;流产,稽留;*HOXA11-AS*;血管内皮生长因子

中图分类号:R714.21

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0281-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.014

Expression and clinical significance of long non-coding RNA *HOXA11-AS* in villous tissues of early pregnancy with missed abortion

LIAN Mengnan¹, LI Hao¹, CHEN Min², XU Yuyao², BIN Shifeng¹,

LIANG Yan¹, NONG Yanmei¹, CHEN Qiuxia¹, GONG Lisen¹

(1 Department of Gynecology, Nanning Eighth People's Hospital, Nanning 530003,

Guangxi, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanning Eighth

People's Hospital, Nanning 530003, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression level and clinical significance of long non-coding RNA (lncRNA) *HOXA11-AS* in villous tissues of missed abortion. **Methods** A total of 118 women with missed abortion who visited a certain hospital from September 2022 to August 2023 were selected as the study group, and 125 women with normal pregnancy who underwent induced abortion for pregnancy termination were selected as the control group. The expression levels of *HOXA11-AS* in villous tissues were detected and compared between the two groups. The correlation between *HOXA11-AS* expression and maternal demographic and clinical characteristics, serum VEGF levels, and the occurrence of missed abortion was analyzed. Additionally, the predictive efficacy of *HOXA11-AS* expression in the occurrence of missed abortion was explored. **Results**

基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z-A20221239)

第一作者:练梦南,副主任医师,研究方向:妇产科常见疾病的诊疗、病因机制研究,E-mail:18777180916@163.com

The expression level of *HOXA11-AS* in the study group was lower than that in the control group ($P < 0.001$). Pregnant women with a history of abortion had lower *HOXA11-AS* expression levels than those without ($P = 0.019$). The expression level of *HOXA11-AS* was positively correlated with the level of serum VEGF in pregnant women ($r_s = 0.290$, $P < 0.001$). In the multivariate analysis model, lower *HOXA11-AS* expression levels were associated with a higher risk of missed abortion in pregnant women ($P < 0.05$). The area under the curve for *HOXA11-AS* expression level in predicting the occurrence of missed abortion was $0.702(95\% CI: 0.640 \sim 0.759)$. **Conclusion** *HOXA11-AS* is underexpressed in missed abortion and is associated with serum VEGF, making it a potential biomarker for predicting the occurrence of missed abortion and providing a basis for clinical early assessment and targeted interventions.

Key words: RNA, long non-coding; missed abortion; *HOXA11-AS*; vascular endothelial growth factor

早期妊娠稽留流产是指妊娠 ≤ 12 周,胎儿或胚胎已死亡但长时间滞留母体宫腔内未能及时自然排出的疾病^[1]。我国早期妊娠稽留流产的发生率约为 13.4%,并呈逐年上升趋势^[2]。临床上若不能及时发现和良好处理稽留流产,可诱发多种不良妊娠结局的发生。因此,早期评估、识别稽留流产发生的高风险孕妇,及时预防、干预措施,积极减少早期妊娠稽留流产发生及不良结局给孕妇健康的威胁,具有重要的现实意义。

HOXA11-AS 是属于长链非编码 RNA (lncRNA) 的一种,既往研究报道其与多种恶性肿瘤的发生有关^[3],可能通过影响血管内皮生长因子(VEGF)的表达抑制肿瘤细胞侵袭,从而抑制血管形成^[4]。*HOXA11-AS* 目前在妊娠和胎盘相关疾病中研究证据有限。考虑到胎盘滋养层细胞与肿瘤细胞有着类似的生物学特性^[5],且公开数据库高通量 RNA 测序芯片(GSE139087)在 3 例早期妊娠稽留流产和 3 例正常早孕期行清宫术妇女绒毛组织中发现 *HOXA11-AS* 低表达,因此推测 *HOXA11-AS* 的异常表达可能与早期妊娠稽留流产的发生有关。本研究拟通过比较早期妊娠稽留流产和正常妊娠妇女绒毛组织中 *HOXA11-AS* 的表达水平,分析其与人口学和临床特征、血清 VEGF 水平、稽留流产发生的相关性,并探讨其在早期妊娠稽留流产发生中的预测效能,为临床早期识别早期妊娠稽留流产发生的高危人群,针对性采取预防、干预措施,减少不良妊娠结局发生提供依据。具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2022 年 9 月至 2023 年 8 月在本院就诊的早期妊娠稽留流产妇女 118 例为研究组,年龄 18~41 岁,平均年龄(30.11 ± 5.88)岁。另选取同期孕早期正常妊娠行人工流产术终止妊娠妇女 125 例为对照组,年龄 18~45 岁,平均年龄(32.61 ± 6.57)岁。本研究经过医院医学伦理委员会审核批准(审批方式:会议审查),所有研究对象知晓研究目的并签署

知情同意书。研究组纳入标准:(1)年龄 ≥ 18 周岁,单胎妊娠,孕周 ≤ 12 周;(2)符合 2020 年中华医学会儿科学分会《早期妊娠稽留流产治疗专家共识》早期妊娠稽留流产的诊断标准,且超声诊断符合以下标准:①超声检查头臀长 ≥ 7 mm,未见胎心搏动;②宫腔内妊娠囊平均直径 ≥ 25 mm,未见胚胎;③宫腔内妊娠未见卵黄囊,2 周后仍然未见胚胎和胎心搏动;④宫腔内妊娠可见卵黄囊,11 d 后仍然未见胎心搏动。(3)择期行清宫术,清宫术前宫口未开。对照组纳入标准:(1)年龄 ≥ 18 周岁,单胎妊娠,孕周 ≤ 12 周;(2)单胎正常妊娠,妊娠期间无阴道流血、腹痛等先兆流产症状和体征;B 超检查宫内胚胎发育正常,有胎心管搏动;(3)择期行清宫术,清宫术前宫口未开。排除标准:孕妇合并严重器质性疾病、生殖器急性或其他内分泌疾病;孕期服用药物、接触射线等;家族遗传学疾病或血液系统疾病;信息资料不全。

1.2 方法

1.2.1 *HOXA11-AS* 表达检测 在静脉麻醉下行负压吸宫术(53.3~66.7 kPa),采集绒毛组织后迅速在生理盐水中漂洗,分别剪取 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的新鲜绒毛组织置入冻存管中,加入 RNA 保护液并置于一 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于 *HOXA11-AS* 表达水平检测。①绒毛组织总 RNA 提取:取 80~100 mg 的绒毛组织剪碎后置于研磨管中,加入 500 μL 的 Trizol 试剂,置于研磨仪上进行低温研磨,结束取出后再加入 500 μL 的 Trizol,混匀后置于室温下裂解 10 min,2 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min。取上层液体至新的 EP 管中,加入 200 μL 氯仿,混匀后室温下静置 10 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 15 min;取上层水置于新的 1.5 mL EP 管中,加入 500 μL 异丙醇,混匀后室温下静置 10 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 10 min,去掉上清液,加入 1 mL 的 75% 乙醇,置于振荡器上振荡 10~15 s,混匀后 7 500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,重复 2 次;去掉上清液,将管内液体晾干,然后加入无酶水 30 μL ,反复轻柔吹吸溶解 RNA。②逆转录和 RT-

qPCR: 试剂盒购买于日本 Takara 公司(货号: RR036A;RR820A),具体步骤根据试剂盒说明书实施。逆转录采用两步法,去除基因组 DNA 后配置逆转录反应的混合液 20 μ L,置于扩增仪上,反应条件如下:37 $^{\circ}$ C,15 min;85 $^{\circ}$ C,5 s;4 $^{\circ}$ C。RT-qPCR 实验中,引物设计和合成由上海生工有限公司完成,内参 GAPDH 和 HOXA11-AS 引物序列见表 1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C,30 s;95 $^{\circ}$ C,5 s,60 $^{\circ}$ C,30 s,40 个循环,绘制溶解曲线,记录内参基因 Ct 值和目的基因 Ct 值,重复 2 个复孔,以平均值代表检测结果。HOXA11-AS 表达水平:采用 $\Delta\Delta$ Ct 法计算 mRNA 的相对表达量。计算公式: $\Delta\Delta$ Ct=[病例组 Ct(目的基因)-Ct(内参基因)]-[对照组 Ct(目的基因)-Ct(内参基因)]。

表 1 引物序列		
引物名称		序列(5' to 3')
GAPDH	F	CTTAGCACCCCTGGCCAAG
GAPDH	R	TGGTCAGAGTCCTTCCACG
HOXA11-AS	F	CGGCTACAAGGAGATTTGG
HOXA11-AS	R	AGGCTCAGGGATGGTAGTCC

1.2.2 VEGF 水平检测 入院采集清晨空腹静脉血 3~5 mL,1 500 r/min,15 min 离心后获得上层血清。采用酶联免疫法(ELISA)检测血清中 VEGF 含量,试剂盒购自武汉华美生物有限公司,所有样本设置 2 个复孔,并设置空白对照孔。根据试剂盒说明书进行操作,最后记录酶标仪 450 nm 波长时各孔吸光值(OD)。根据标准品的孔和空白对照孔的 OD 值建立标准曲线,然后根据各个样本孔的 OD 值计算出相应的 VEGF 含量。

1.3 信息采集 所有研究对象的人口学和临床信息采用病历信息系统进行采集,包括年龄、身高、体重、文化程度、吸烟或二手烟暴露、饮酒史、产次、流产史等。

体重指数(BMI)=体重(kg)/身高的平方(m^2)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件和 MedCalc 软件进行数据统计分析。计量资料符合正态分布采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验或 ANOVA 检验;不符合正态分布采用[$M(P_{25}\sim P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验。相关性分析采用 Pearson 或 Spearman 秩相关进行分析。多因素分析采用二元 Logistic 回归模型。预测效能采用受试工作总特征曲线(ROC)进行分析。

2 结果

2.1 研究组和对照组绒毛组织中 HOXA11-AS 表达比较 研究组绒毛组织中 HOXA11-AS 的表达水平较对照组的低,且差异有统计学意义($Z=-5.440$, $P<0.001$),见图 1。

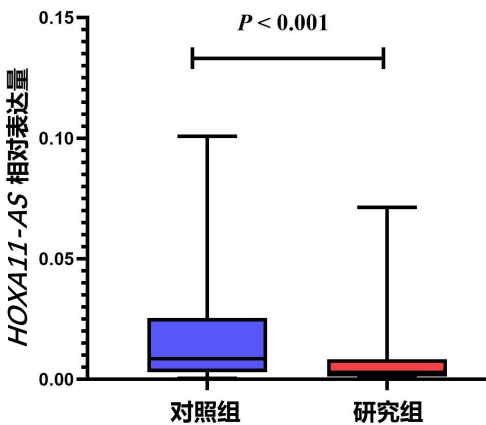


图 1 研究组和对照组绒毛组织中 lncRNA HOXA11-AS 的相对表达量的比较

2.2 不同人口学和临床特征孕妇 HOXA11-AS 的表达比较 有流产史孕妇绒毛组织中 HOXA11-AS 的表达水平低于无流产史孕妇,且差异有统计学意义($Z=2.353$, $P=0.019$),见表 2。

表 2 不同人口学和临床特征孕妇绒毛组织中 HOXA11-AS 表达水平的比较 (n=243)

变量	n	HOXA11-AS 的相对表达量	Z / H	P
年龄/岁				
<35	164	0.006(0.002~0.018)	1.768	0.077
≥35	79	0.003(0.002~0.013)		
BMI/(kg·m ⁻²)				
<18.5	38	0.004(0.002~0.014)	1.093	0.579
18.5~24	149	0.005(0.002~0.018)		
≥24	56	0.004(0.002~0.013)		
吸烟或二手烟暴露				
否	121	0.005(0.002~0.014)	0.042	0.967
是	122	0.005(0.002~0.019)		

表 2(续) 不同人口学和临床特征孕妇绒毛组织中 *HOXA11-AS* 表达水平的比较 ($n=243$)

变量	n	<i>HOXA11-AS</i> 的相对表达量	Z/H	P
饮酒史				
否	176	0.005(0.002~0.016)	0.375	0.708
是	67	0.004(0.002~0.018)		
产次				
初产妇	77	0.006(0.002~0.019)	0.603	0.546
经产妇	166	0.004(0.002~0.016)		
文化程度				
初中及以下	109	0.004(0.002~0.015)	0.672	0.715
高中及大专	28	0.005(0.001~0.018)		
本科及以上	106	0.006(0.002~0.015)		
流产史				
否	58	0.008(0.003~0.019)	2.353	0.019
是	185	0.004(0.002~0.016)		

注:表内计量资料数据以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。

2.3 *HOXA11-AS* 表达与孕妇血清 VEGF 水平的相
关性 *HOXA11-AS* 表达与总体孕妇血清 VEGF 呈
正相关 ($r_s = 0.290, P < 0.001$)。研究组中

HOXA11-AS 表达与血清 VEGF 水平呈正相关 ($r_s =$
 $0.268, P = 0.003$),见表 3。

表 3 绒毛组织中 *HOXA11-AS* 的表达与血清 VEGF 水平的相关性

变量	总体 ($n=243$)		对照组 ($n=125$)		研究组 ($n=118$)	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P
<i>HOXA11-AS</i> 的相对表达量	0.290	<0.001	0.103	0.255	0.268	0.003

注:VEGF:血管内皮生长因子; r_s :等级相关系数。

2.4 Logistic 回归分析 *HOXA11-AS* 表达与稽留流
产发生相关性 以“ $Y=0$ ”为未发生稽留流产,“ $Y=1$ ”
为发生稽留流产,将单因素分析和相关性分析中 $P <$
 0.05 的流产史、血清 VEGF 和 *HOXA11-AS* 表达纳
入构建二元 Logistic 回归模型,共线性诊断 VIF 均<
10,提示自变量之间不存在严重共线性,可纳入 Logis-

tic 回归模型进行分析。分析结果显示,是否有流产
史、VEGF 和 *HOXA11-AS* 表达水平是稽留流产发生
独立影响因素 ($P < 0.05$)。其中, *HOXA11-AS* 表达
水平越低则稽留流产发生风险越大 ($OR = 0.376,$
 $95\% CI : 0.218 \sim 0.647, P < 0.001$)。见表 4。

表 4 二元 Logistic 回归模型分析 *HOXA11-AS* 与稽留流产发生的相关性

变量	β	SE	Wald χ^2	OR	95% CI	P
流产史						
否	—	—	—	1.000	—	—
是	1.186	0.376	9.959	3.274	1.567~6.838	0.002
血清 VEGF 水平	-0.002	0.001	24.069	0.998	0.997~0.999	<0.001
<i>HOXA11-AS</i> 表达	-0.979	0.278	12.442	0.376	0.218~0.647	<0.001

注: *HOXA11-AS* 水平为 Log_{10} 转换。

2.5 绒毛组织中 *HOXA11-AS* 表达预测稽留流产发
生的预测效能 ROC 曲线分析显示,绒毛组织中
HOXA11-AS 表达可预测稽留流产的发生 ($P <$
 0.001),预测的曲线下面积(AUC)为 0.702(95% $CI :$
0.640 ~ 0.759),灵敏度为 64.41%,特异度为
70.40%。见图 2。

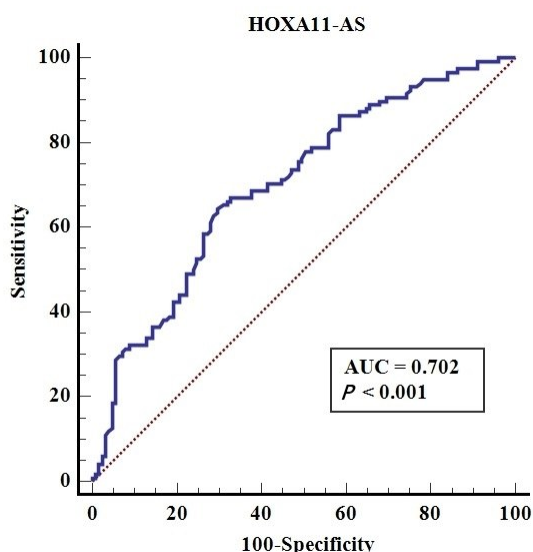


图 2 ROC 曲线分析 lncRNA *HOXA11-AS* 表达预测稽留流产发生的 AUC

3 讨论

本研究中发现,早期妊娠稽留流产妇女绒毛组织中 lncRNA *HOXA11-AS* 低表达,并与血清 VEGF 水平呈正相关,*HOXA11-AS* 表达水平越低则发生早期妊娠稽留流产的风险越大;*HOXA11-AS* 表达能够预测孕妇早期妊娠稽留流产的发生且预测效能较好。

既往研究关于 lncRNA 在稽留流产中异常表达的证据有限。LUO M 等^[6]研究发现,稽留流产妇女绒毛组织中 lncRNA *MALAT1*、*HOTAIR* 和 *MEG3* 的表达水平较正常妊娠妇女绒毛组织中高。ZHAO H 等^[7]研究发现,*HOXA11-AS* 是胚胎植入子宫内膜关键时期中表达下降最明显的 lncRNA,并与子宫内膜蜕膜化有关。本研究中,*HOXA11-AS* 在早期妊娠稽留流产妇女绒毛组织中表达下降,*HOXA11-AS* 表达越低则孕妇发生早期妊娠稽留流产的风险也越高,与既往研究结果类似,也与公开数据库高通量测序(GSE139087)结果中 *HOXA11-AS* 表达水平在早期妊娠稽留流产妇女绒毛组织中表达低于正常妊娠妇女一致,且差异有统计学意义。预测效能分析中还发现,*HOXA11-AS* 能够预测早期妊娠稽留流产的发生,且预测的 AUC>0.7,预测效能较好,说明 *HOXA11-AS* 的表达可用来早期预测稽留流产的发生,为临床上识别早期妊娠稽留流产发生的高风险人群,指导临床诊疗工作的开展,积极预防不良妊娠结局发生对孕妇健康影响提供新的依据。

子宫—胎盘循环异常是新提出的稽留流产发病因^[8]。在妊娠过程中绒毛形成和胚胎发育需要广泛的血管形成去供给营养,胎盘绒毛和胚胎血管化对于早期妊娠的成功至关重要^[9]。而这个过程与血管形成有关的各种细胞因子表达异常则可导致血管生成障碍

从而引起稽留流产^[10]。YIM G W 等^[11]研究发现,*HOXA11-AS* 在卵巢癌患者中高表达,可能通过作用其下游靶点 VEGF 水平,从而实现卵巢癌细胞侵袭导致不良疾病预后发生。妊娠过程中血管的生成与滋养层细胞的侵袭有关。VEGF 被认为是最强大的血管生成启动子,对妊娠早期胎盘微血管生成和网络构建具有极其重要的作用。JING G Z 等^[12]研究发现,稽留流产妇女血清中 VEGF 下调,可调控 MEK/ERK 信号通路影响滋养层细胞的增殖、激活和血管生成,抑制妊娠期绒毛血管生成从而导致稽留流产发生。张树红^[13]研究发现,VEGF 在稽留流产组患者绒毛组织中表达量较正常早孕组低,可能通过影响胎盘的发育导致绒毛血管生成障碍,进而导致稽留流产的发生。VEGF 表达下降可导致胚胎发育过程中母胎界面的血管生成不足、胎盘缺血再灌注出现问题,从而引起稽留流产的发生^[14-15]。本研究中发现,稽留流产孕妇绒毛组织中 *HOXA11-AS* 的表达与血清 VEGF 水平呈正相关,*HOXA11-AS* 表达下降则可能导致孕妇血清 VEGF 水平的下降,抑制了滋养层细胞的侵袭能力,无法有效促进血管的生成,从而导致稽留流产的发生。但关于稽留流产中 *HOXA11-AS* 表达调控血清 VEGF 下降的机制研究还少有报道,还需要后续深入研究验证。

综上所述,lncRNA *HOXA11-AS* 在早期妊娠稽留流产中低表达,并与流产史、血清 VEGF 有关,可作为早期妊娠稽留流产发生预测的潜在生物标志物,为临床早期识别稽留流产高风险人群,针对性采取干预措施,减少不良妊娠发生风险提供科学理论依据,也为 lncRNA 参与早期妊娠稽留流产发生的机制研究提供前期基础。

参考文献:

- [1] 黄艳婷,梁月秀,归楠楠. 稽留流产相关危险因素研究进展[J]. 右江医学,2023,51(10):935-939.
- [2] ZHANG X Y,LI J,GU Y Q,et al. A pilot study on environmental and behavioral factors related to missed abortion[J]. Environ Health Prev Med,2011,16(4):273-278.
- [3] XUE J Y,HUANG C,WANG W,et al. *HOXA11-AS*: a novel regulator in human cancer proliferation and metastasis[J]. Onco Targets Ther,2018,11:4387-4393.
- [4] 王平,孟立平,刘龙斌,等. 循环外泌体介导的 lncRNA *HOXA11-AS* 通过上调 *SOX4* 促进血管内皮细胞增殖[J]. 温州医科大学学报,2021,51(8):639-645.
- [5] BUCKBERRY S,BIANCO-MIOTTO T,ROBERTS C T. Imprinted and X-linked non-coding RNAs as potential regulators of human placental function[J]. Epigenetics, 2014,9(1):81-89.

(下转第 290 页)

本文引文格式:谢松桂,覃艳宁,黄晓凤,等.可复性与不可复性牙髓炎牙髓血流状态及影响因素的研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):286-290.

【论著与临床报道】

可复性与不可复性牙髓炎牙髓血流状态及影响因素的研究

谢松桂¹,覃艳宁²,黄晓凤¹,官骏昊¹,黎淑芳¹

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 广西百色市人民医院,右江民族医学院附属西南医院口腔科,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨牙髓血流量(pulpal blood flow,PBF)对可复性牙髓炎(reversible pulpitis,RP)与有症状不可复性牙髓炎(symptomatic irreversible pulpitis,SIRP)的诊断能力。方法 选取牙髓炎病例 189 例,记录患者一般信息及临床检查结果,分为 RP 组及 SIRP 组,RP 组 83 例,SIRP 组 106 例。采用激光多普勒血流仪(laser Doppler flowmetry,LDF)测试患牙与对照牙的 PBF,并计算其差值。以牙髓血流差值作为自变量,性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型作为控制变量,诊断作为因变量进行 Logistic 回归分析。结果 ①RP 平均 PBF 差值与 SIRP 平均 PBF 差值比较差异具有统计学意义($P < 0.001$)。②牙髓血流差值与诊断结果的差异具有统计学意义($P < 0.05$),加入性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型作为控制变量之后,牙髓血流差值与诊断结果两者的差异仍具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 牙髓血流量与牙髓炎临床诊断有关,牙髓血流差值有助于 RP 和 SIRP 的临床诊断。

关键词:牙髓血流量;激光多普勒血流仪;可复性牙髓炎;有症状不可复性牙髓炎

中图分类号:R781.31

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0286-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.015

Study on the pulpal blood flow status and influencing factors of reversible and irreversible pulpitis

XIE Songgui¹, QIN Yanning², HUANG Xiaofeng¹, GUAN Junhao¹, LI Shufang¹

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Department of Stomatology, Baise People's Hospital in Guangxi, Southwest Hospital

Affiliated to Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic ability of pulpal blood flow (PBF) for reversible pulpitis (RP) and symptomatic irreversible pulpitis (SIRP). **Methods** A total of 189 pulpitis cases were selected, and general information and clinical examination results were recorded for the patients. The patients were divided into an RP group ($n=83$) and an SIRP group ($n=106$). Laser Doppler flowmetry (LDF) was used to measure the PBF of the affected and control teeth, and the difference value was calculated. Logistic regression analysis was performed with the PBF difference as the independent variable, and gender, age, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate, and tooth position type as control variables, while diagnosis was the dependent variable. **Results** ① There was a statistically significant difference in the mean difference value of PBF between the RP group and the SIRP group ($P < 0.001$). ② There was a statistically significant difference between the difference value of PBF and the diagnostic result ($P < 0.05$). After adding gender, age, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, heart rate, and tooth position type as control variables, there was still a statistically significant difference between the difference value of PBF and the diagnostic result ($P <$

基金项目:广西研究生教育创新计划项目(YCSW2024528);2024 年自治区级大学生创新训练计划(202410599032)

第一作者:谢松桂,在读硕士研究生,研究方向:牙体牙髓病学,E-mail:1031303126@qq.com

通讯作者:黎淑芳,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:牙体牙髓病学,E-mail:303121175@qq.com

0.05). **Conclusion** PBF is related to the clinical diagnosis of pulpitis, and the difference value of PBF contributes to the clinical diagnosis of RP and SIRD.

Key words: pulpal blood flow; laser Doppler flowmetry; reversible pulpitis; symptomatic irreversible pulpitis

牙髓炎是常见的口腔疾病,准确判断牙髓的状态对临床治疗方案的选择具有重要意义。目前临床上对牙髓状态的判断主要包括温度测试和电活力测试^[1]。美国牙髓病学协会(American Association of Endodontists,AAE)制定了诊断标准,通过对比患牙与对照牙对冷和/或热刺激的敏感反应,并结合是否存在自发痛,来鉴别可复性牙髓炎(RP)与有症状不可复性牙髓炎(SIRD)^[2]。然而这类方法在很大程度上依赖于患者的主观反馈,因此在客观性方面存在不足。

近年来,不少学者应用激光多普勒血流仪(LDF)测定牙髓血流量以评估牙髓健康状态,比起传统的感觉检测,更能真实地反映出牙髓活力^[3]。本课题组前期应用 LDF 测定正常成人的上下颌第一恒磨牙、青年人前磨牙生理状态下牙髓血流量,发现不同的牙位其牙髓血流量(PBF)存在差异^[4-5],为临床提供正常参考值范围具有一定的意义。然而,PBF 是否受到牙髓炎症状态及个体因素的影响,例如:年龄、性别、血压、心率等因素的影响,需要进一步的探讨。本研究为减少个体差异,以患牙与对照牙髓血流差值为研究指标,纳入性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型混杂研究因素,探讨 PBF 与 RP 和 SIRD 临床诊断的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 在 2021 年 12 月至 2022 年 12 月期间,从右江民族医学院附属医院口腔门诊中筛选出了 189 例牙髓炎患者。根据 AAE 的诊断标准分为 RP 组 83 例和 SIRD 组 106 例。RP 患者平均年龄(29.01±12.65)岁,女性 54 例,男性 29 例,前牙 23 例,前磨牙 21 例,磨牙 39 例。SIRD 患者平均年龄(29.13±14.90)岁,女性 67 例,男性 39 例,前牙 22 例,前磨牙 23 例,磨牙 61 例。本研究经右江民族医学院附属医院伦理委员会批准(伦理委员审查号:2023030201),所有患者均知情同意。

1.1.1 AAE 诊断标准^[6] RP:①患牙龋坏达牙本质深层等病因;②没有自发痛;③对热、冷刺激有不适或短暂疼痛,无延缓痛或延缓痛时间<30 s;④根尖区 X 光无异常。SIRD:①患牙龋坏达牙本质深层等病因;②有自发痛及牵涉痛;③热、冷刺激剧痛,有延缓痛,延缓痛时间≥30 s;④叩痛可能出现;⑤根尖区 X 光有异常。

1.1.2 纳入及排除标准 纳入标准:①根尖片显示根尖发育完全且无明显根尖周异常;②无窦道、肿胀、松

动度;③患者可有效配合完成 LDF 检测且依从性好。④患牙对侧同名牙牙体完整,无任何不适,无牙周袋,既往未做过任何治疗。排除标准:①正在进行正畸治疗的患者;②患牙及对照牙有外伤史患者;③近期有服用心血管系统药物;④对检测材料过敏;⑤信息采集不完整有误或拒绝接受检测者。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集 患者的个人基本信息、就诊原因、病程等一般情况。

1.2.2 对照牙的选择 以患牙的对侧同名牙为对照牙。要求牙体完整,无任何不适,无牙周袋,既往未做过任何治疗。

1.2.3 测量血压、心率 测量前 30 min 禁烟禁酒禁咖啡,静息 5 min。使用腕式血压计进行血压及心率测量,待血压计显示结果后记录数值。患者休息 5 min 后再测量 1 次,最终取 2 次测量结果平均值。

1.2.4 测量 PBF 值 患者静息 10 min,患牙区及对照牙区硅橡胶取模,制作橡胶夹板。在橡胶夹板上,于被测牙齿唇面的中部 1/3 区域打孔,以便将 LDF 探头稳固地安装在上面,确保探头能与牙面紧密接触。随后,在患者保持安静的状态下,分别测量并记录了患牙和对照牙的 PBF。

1.3 统计学方法 本研究采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。采用夏皮洛-威尔克检验进行两组 PBF 差值的正态性检验,采用两独立样本 *t* 检验统计分析两组的 PBF 差值。选取性别、年龄、收缩压、舒张压、心率以及牙位类型作为控制因素,将血流差值设为自变量,诊断结果作为因变量,运用 Logistic 回归分析方法进行探究,同时绘制 ROC 曲线来评估血流差值诊断的性能。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 PBF 差值比较 RP 与 SIRD 的 PBF 差值与牙髓炎诊断之间两独立样本 *t* 检验如表 1 所示,RP 平均 PBF 差值与 SIRD 平均 PBF 差值比较,差异具有统计学意义(*P* < 0.001)。

表 1 RP 与 SIRD 的 PBF 差值比较				
项目	<i>n</i>	平均 PBF 差值	<i>t</i>	<i>P</i>
RP	83	3.77±1.86	-10.499	<0.001
SIRD	106	6.85±2.11		

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2.2 牙髓血流差值与牙髓炎诊断结果的 Logistic 回归分析 以性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型作为控制变量,血流差值作为自变量,诊断结果作为因变量进行分层 Logistic 回归分析,探索牙髓血流差值对牙髓炎诊断结果的影响,变量赋值情况,见表 2。牙髓血流差值与诊断结果的差异具有统计学意义($P<0.05$),加入性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型作为控制变量之后,牙髓血流差值与诊断结果两者的差异仍具有统计学意义($P<0.05$),见表 3。ROC 分析表明模型区分效能良好($AUC=0.860$, $95\%CI:0.808\sim0.912$),最佳截断值 5.5,对应的敏感度为 72.6%,特异度为 83.1%,见表 4、图 1。说明该模型预测诊断结局准确率较高,可以用牙髓血流差

值鉴别 RP 和 SIRP,这与临床上牙体牙髓医生经验接近。

表 2 变量赋值表

变量	赋值说明
性别	女性=1,男性=2
年龄	原值输入
收缩压	原值输入
舒张压	原值输入
心率	原值输入
牙位类型	前牙=1,前磨牙=2,磨牙=3
血流差值	原值输入
诊断结果	RP=1,SIRP=2

表 3 牙髓血流差值与诊断结果之间 Logistic 回归分析

项目		B	SE	Wald χ^2	P	OR	95% CI
模型 1	血流差值	0.781	0.114	46.537	<0.001	2.183	1.744~2.731
模型 2	血流差值	0.78	0.114	46.5	<0.001	2.182	1.744~2.73
模型 3	性别	0.102	0.393	0.067	0.796	1.107	0.512~2.393
	血流差值	0.787	0.116	45.984	<0.001	2.197	1.75~2.757
	性别	0.109	0.394	0.077	0.781	1.116	0.515~2.415
模型 4	年龄	0.008	0.015	0.294	0.588	1.008	0.98~1.037
	血流差值	0.786	0.117	44.766	<0.001	2.194	1.743~2.761
	性别	0.104	0.401	0.067	0.795	1.11	0.505~2.436
模型 5	年龄	0.008	0.015	0.264	0.607	1.008	0.979~1.038
	收缩压	0.002	0.026	0.005	0.942	1.002	0.952~1.055
	血流差值	0.837	0.125	44.785	<0.001	2.311	1.808~2.953
	性别	-0.064	0.429	0.022	0.882	0.938	0.405~2.176
	年龄	-0.002	0.016	0.016	0.901	0.998	0.967~1.03
模型 6	收缩压	0.084	0.037	5.316	0.021	1.088	1.013~1.169
	舒张压	-0.164	0.046	12.814	<0.001	0.848	0.775~0.928
	血流差值	0.834	0.126	43.869	<0.001	2.303	1.799~2.948
	性别	0	0.434	0	0.999	1	0.427~2.343
	年龄	-0.002	0.016	0.015	0.902	0.998	0.967~1.03
	收缩压	0.072	0.037	3.696	0.055	1.075	0.999~1.156
模型 7	舒张压	-0.167	0.047	12.9	<0.001	0.846	0.772~0.927
	心率	0.075	0.043	2.949	0.086	1.077	0.99~1.173
	血流差值	0.987	0.149	44.094	<0.001	2.682	2.005~3.589
	性别	-0.045	0.451	0.01	0.921	0.956	0.395~2.312
	年龄	0.006	0.016	0.123	0.726	1.006	0.974~1.038
	收缩压	0.068	0.039	3.099	0.078	1.071	0.992~1.155
	舒张压	-0.152	0.048	10.051	0.002	0.859	0.782~0.944
	心率	0.078	0.045	2.98	0.084	1.081	0.99~1.18
	牙位类型	0.971	0.289	11.263	0.001	2.64	1.498~4.655

表 4 血流差值预测诊断结局的分析结果

变量	AUC	SE	P	95% CI	灵敏度	特异度	约登指数
血流差值	0.860	0.026	<0.001	0.808~0.912	0.726	0.831	0.557

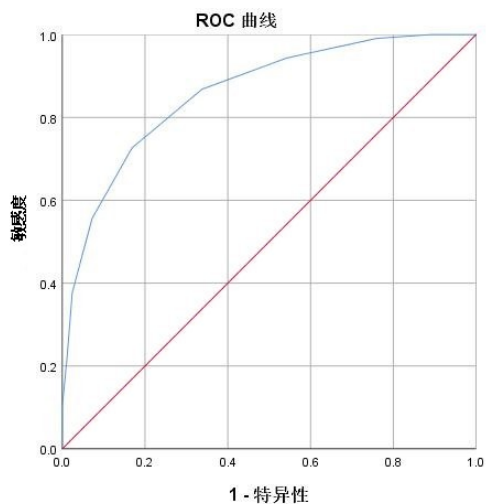


图 1 牙髓血流差值预测牙髓炎临床诊断的 ROC 曲线

3 讨论

如何准确地鉴别牙髓炎诊断是制定治疗计划的先决条件,取决于对牙髓状态的准确判断。目前临床上常用的判断牙髓状态的方法是牙髓温度测试和牙髓电活力测试,结果主要依赖于患者主观感受,比较容易出现假阳性的结果或者假阴性的结果^[7]。LDF 简单无创被广泛应用于临床,如有学者使用多普勒检测血流动力学可以在早期筛查出高危产妇^[8]。在口腔医学方面,LDF 测试检测牙髓活力具有灵敏性高和特异性强特点^[9],通过 LDF 检测牙髓炎 PBF 对临床医生在牙髓炎疾病诊断中有一定的指导意义。

本课题组在前期已有上下颌第一恒磨牙、前磨牙生理状态下 PBF 临床参考值的研究,发现 PBF 受到患者年龄、性别、牙齿类型的影响。此外郭飞飞等^[10]通过研究发现适龄人群女性 PBF 值略高于男性,同时也发现,对于同一性别的个体而言,上颌中切牙和侧切牙的 PBF 间也存在统计学差异,中切牙 PBF 值高于侧切牙。作者分析出现这一结果最主要的原因是和牙齿本身的形态结构有关。随着年龄的增长,根管管径减小的趋势在性别上也有显著差异^[11],PBF 也可能随着根管系统增龄性的变化而变化。马宁虎等^[12]应用 LDF 检测 7~13 岁儿童上颌切牙牙髓血流,也证明了 PBF 值随着年龄的增加而减小。另一方面,PBF 可能与患者血压、心率相关。有报道指出,因受髓腔微循环的影响,PBF 的变化和患者血压、心率紧密相关,并指出 LDF 检测不适用于高血压患者、明显贫血和有血液系统疾病患者^[13]。说明在不同血压、心率状态下,患牙的 PBF 值可能会受影响。因此,为了减少个体差异,本研究指标是患牙和对照牙的牙髓血流量差值,而非患牙的血流量。牙髓血流量差值以个体正常对照牙作为基线,可能比与临床参考值对照更可靠,同时将血压、心率、年龄、性别、牙位类型纳入混杂研究因素。

本研究发现,RP 平均 PBF 差值与 SIRP 平均 PBF 差值,比较差异具有统计学意义,可以推测牙髓血流差值与鉴别诊断 RP 与 SIRP 临床诊断具有一定的临床意义。RP 在炎症早期其牙髓组织破坏较小,其牙髓血运接近于正常值,表明血流量可能仍处于正常或接近正常水平,提示牙髓仍有一定的自我修复能力。SIRP 大多已经处于疾病发展过程或者晚期,大部分牙髓组织已经被破坏,血运能力降低,血流量下降,与对照牙牙髓血流量差距较大。

由 Logistic 回归分析结果可知,牙髓血流差值与诊断结果的差异具有统计学意义,加入性别、年龄、收缩压、舒张压、心率、牙位类型作为控制变量之后,牙髓血流差值与诊断结果两者的差异仍具有统计学意义。这表明 PBF 的变化与牙髓炎临床诊断存在密切关联。由 ROC 曲线结果显示,说明该模型预测诊断结局准确率高,表明牙髓血流差值在区分 RP 和 SIRP 具有良好的诊断能力,支持 LDF 作为牙髓状态临床评估工具的有效性。牙髓血流差值在牙髓炎诊断中的敏感性及特异性,可为临床医生鉴别 RP 和 SIRP 提供了具体的参考标准,有助于临床判断牙髓健康状态。以上结果表明,根据牙髓血流差值有助于判断牙髓状态,可以为牙髓炎的临床诊断及治疗提供重要参考依据。

综上所述,牙髓血流与牙髓炎临床诊断之间具有一定相关性,牙髓血流差值对诊断 RP 和 SIRP 具有一定的价值,但本研究样本规模相对有限,未来的研究应考虑更大样本量及不同人群的比较以增强结果的普遍适用性。

参考文献:

- [1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2012.
- [2] CHO S Y, SEO D G, LEE S J, et al. Prognostic factors for clinical outcomes according to time after direct pulp capping[J]. J Endod, 2013, 39(3): 327-333.
- [3] ALGHAITHY R A, QUALTROUGH A J E. Pulp sensibility and vitality tests for diagnosing pulpal health in permanent teeth: a critical review[J]. Int Endod J, 2017, 50(2): 135-142.
- [4] 黄晓凤, 胡玉萍, 李娇娇, 等. 青年人群前磨牙牙髓血流灌注量研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2024, 29(4): 200-205.
- [5] 胡玉萍, 杨雪, 张然, 等. LDF 检测正常成人第一恒磨牙牙髓血流量的研究[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(12): 852-857.
- [6] GLICKMAN G N. AAE Consensus conference on diagnostic terminology: background and perspectives [J]. J Endod, 2009, 35(12): 1619-1620.
- [7] PATRO S, METO A, MOHANTY A, et al. Diagnostic

accuracy of pulp vitality tests and pulp sensibility tests for assessing pulpal health in permanent teeth;a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Environ Res Public Health,2022,19(15):9599.

[8] 利青,钟秋红,罗雪清,等. 子痫前期对胎儿的影响以及多普勒血流的临床意义[J]. 右江民族医学院学报,2019,41(4):452-454.

[9] GHOUTH N,DUGGAL M S,BANIHANI A,et al. The diagnostic accuracy of laser doppler flowmetry in assessing pulp blood flow in permanent teeth;a systematic review[J]. Dent Traumatol,2018,34(5):311-319.

[10] 郭飞飞,周志斐,句新科,等. 激光多普勒血流检测仪用于青年前牙牙髓活力检测临床参考值范围的初步研究[J]. 实用口腔医学杂志,2018,34(2):248-252.

[11] 吴亚芸,牛忠英,闫澍,等. 汉族人上颌中切牙牙根直径及根管管径与年龄关系的研究[J]. 实用口腔医学杂志,2015,31(6):784-788.

[12] 马宁虎,肖刚,张媛媛,等. 激光多普勒血流仪检测年轻上颌切牙牙髓血流的探索[J]. 华西口腔医学杂志,2017,35(5):494-497.

[13] GOPIKRISHNA V,TINAGUPTA K,KANDASWAMY D. Comparison of electrical, thermal, and pulse oximetry methods for assessing pulp vitality in recently traumatized teeth[J]. J Endod,2007,33(5):531-535.

收稿日期:2025-01-03;修回日期:2025-02-18
(本文编辑 覃黎黎)

(上接第 285 页)

[6] LUO M,XIAO H,WANG L Q,et al. The expression and clinical significance of three lncRNAs in patients with a missed abortion[J]. Exp Ther Med,2021,21(1):8.

[7] ZHAO H T,HU S G,QI J,et al. Increased expression of HOXA11-AS attenuates endometrial decidualization in recurrent implantation failure patients [J]. Mol Ther, 2022,30(4):1706-1720.

[8] ZYGULA A,KOSINSKI P,WROCZYNSKI P,et al. Oxidative stress markers differ in two placental dysfunction pathologies: pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth restriction [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020,2020:1323891.

[9] 张冬雪,袁宁潞,贺倩,等. 血管内皮生长因子与妊娠相关疾病关系的研究进展[J]. 中国医药,2021,16(11):1754-1756.

[10] 谢瑞萍,杨彩霞,范俊梅,等. 稽留流产患者血清、绒毛与蜕膜组织中 SLIT2 的表达及临床意义[J]. 中国计划生育学杂志,2024,32(4):856-860.

[11] YIM G W,KIM H J,KIM L K,et al. Long Non-coding RNA HOXA11 antisense promotes cell proliferation and invasion and predicts patient prognosis in serous ovarian cancer[J]. Cancer Res Treat,2017,49(3):656-668.

[12] JING G Z,YAO J L,DANG Y H,et al. The role of β -HCG and VEGF-MEK/ERK signaling pathway in villi angiogenesis in patients with missed abortion[J]. Placenta,2021,103:16-23.

[13] 张树红. hsa-miR-199a-5p、ITGA3 和 VEGF 在稽留流产绒毛组织中表达的研究[D]. 南宁:广西医科大学,2019.

[14] LIU T,YAN M,LIU F,et al. The role of p53-MDM2 signaling in missed abortion and possible pathogenesis [J]. J Obstet Gynaecol Res,2022,48(11):2686-2696.

[15] 黄钟慧,韩秋峪. 稽留流产患者绒毛组织中 Netrin-1、DCC、UNC5B 和 VEGF 表达[J]. 中国计划生育学杂志, 2021,29(7):1388-1391,1540.

收稿日期:2024-12-21;修回日期:2025-02-17
(本文编辑 钟琳)

本文引文格式: 宁家杰, 邓静, 李珊珊, 等. 鼻咽癌与重度抑郁症的生物标记物研究[J].
右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 291-300, 334.

【论著与临床报道】

鼻咽癌与重度抑郁症的生物标记物研究

宁家杰¹, 邓静¹, 李珊珊², 廖燕¹, 黄建华¹, 龙建雄³, 曾萍萍¹

(1. 广西医科大学护理学院, 广西 南宁 530021;

2. 广西医科大学第一附属医院麻醉科, 广西 南宁 530021;

3. 广西医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计教研室, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 本研究旨在通过生物信息学分析鼻咽癌(NPC)患者与重度抑郁症(MDD)患者的共同生物标记物, 筛选并鉴定他们共同相关的枢纽基因和生物学通路。 **方法** 本研究使用 R 语言分析了 GSE12452、GSE98793 数据集中 NPC、MDD 与正常人群之间的差异表达基因。使用加权基因共表达网络分析(WGCNA)进行取交集来筛选高度相关的基因。基于 Cox 回归筛选核心基因, LASSO 回归构建预后风险模型并绘制受试者工作特征(ROC)曲线。该模型使用来自基因表达综合(GEO)的外部数据集进行了验证。 **结果** 结果显示 3 个基因(CKAP5、GRB10、TPT1)被鉴定为 NPC 和 MDD 的核心基因。根据中位风险评分可将 NPC 患者分为高风险组和低风险组, 低风险组患者生存时间延长, 免疫浸润增强, 而且浸润免疫细胞与预后基因和风险评分有很强的相关性。此外, 使用数据集 GSE102349 验证了 NPC 预后风险模型有效预测总生存期。 **结论** 本研究通过生物信息学分析鉴定了 NPC 与 MDD 相关联的 3 个预后能力最强的核心基因 CKAP5、GRB10 和 TPT1, 并发现他们对 NPC 的预后有影响。

关键词: 鼻咽癌; 重度抑郁症; 预后模型; 生物信息学; 机器学习

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0291-11

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.016

Study on biomarkers of nasopharyngeal carcinoma and major depressive disorder

NING Jiajie¹, DENG Jing¹, LI Shanshan², LIAO Yan¹,

HUANG Jianhua¹, LONG Jianxiong³, ZENG Pingping¹

(1. School of Nursing, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 3. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** This study aimed to identify common biomarkers between nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients and major depressive disorder (MDD) patients through bioinformatics analysis. **Methods** Differentially expressed genes (DEGs) among NPC, MDD, and normal populations in the GSE12452 and GSE98793 datasets were analyzed using R language. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was employed to screen highly correlated genes by intersecting the results. Core genes were screened based on Cox regression, and a prognostic risk model was constructed by LASSO regression, followed by plotting the receiver operating characteristic (ROC) curve. This model was validated with an external dataset from the Gene Expression Omnibus (GEO). **Results** Three genes (CKAP5, GRB10, TPT1) were identified as core genes for both NPC and MDD. NPC patients were divided into high-risk and low-risk groups based on median

基金项目: 国家自然科学基金项目(82260663); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2024252)

第一作者: 宁家杰, 在读硕士研究生, 护师, 研究方向: 鼻咽癌, E-mail: 1078150081@qq.com

通讯作者: 曾萍萍, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 护理教育学、护理心理学, E-mail: 2716235867@qq.com

risk scores, with patients in the low-risk group exhibiting prolonged survival times and enhanced immune infiltration. Moreover, infiltrating immune cells showed strong correlations with prognostic genes and risk scores. Additionally, the NPC prognostic risk model was validated for effective prediction of overall survival using the GSE102349 dataset. **Conclusion** This study identified three core genes (*CKAP5*, *GRB10*, *TPT1*) with the strongest prognostic capabilities associated with both NPC and MDD through bioinformatics analysis and demonstrated their influence on the prognosis of NPC.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; major depressive disorder; prognostic model; bioinformatics; machine learning

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是常见的头颈部恶性肿瘤,也是世界第 23 位最常见的癌症和第 21 位癌症死亡原因^[1]。据中国癌症登记数据库统计,中国 NPC 的发病率和死亡率分别为 187.48/10 万和 105.32/10 万^[2]。除了环境因素对 NPC 病因的影响外,EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)已被证明是 NPC 发病的一个令人信服的危险因素。目前以放疗为主的多学科综合治疗是 NPC 主要的治疗方法,随着强调放射治疗,影像引导放射治疗等放疗技术的更新, NPC 患者的生存率及局部控制率均有所提高^[3]。NPC 患者在放疗尤其是放化疗联合治疗的过程中常发生口腔黏膜反应、恶心呕吐、皮肤反应等不良反应症状^[4],容易使患者产生焦虑、抑郁等负面情绪,甚至产生自杀意念。而临床上主要针对放疗效果和损伤情况进行研究,缺少对放疗患者不良情绪的评估,忽略了患者最常见的焦虑和抑郁等情绪。

在普通人群中,抑郁症的患病率正在增长,其典型特征是快感缺乏和无法体验快乐。多种躯体症状(如疲劳、体重波动)以及认知症状(如注意力不集中、消极认知)可伴随抑郁症^[5]。抑郁症分为重度抑郁障碍(major depressive disorder, MDD)和心境恶劣。很长一段时间以来, MDD 一直被认为是癌症的合并症,而不是癌症的风险因素。近年来, MDD 与 NPC 风险之间的因果关系在许多观察性研究中得到了广泛的探讨。然而,研究结果存在争议。一些研究认为抑郁与 NPC 放疗患者之间存在因果关系^[6],而另一些则没有^[7]。这些争议的原因可能是这些研究的环境差异很大,包括癌症的类型和影响研究结果的混杂因素。由于干预性研究中因果关系的推断通常面临潜在的混杂偏倚和反向因果关系的挑战,因此 MDD 与 NPC 之间的关系仍有待阐明。

为了进一步阐明 NPC 与 MDD 的关系,本研究对两者相关的生物学信息与功能进行了初步探讨。此外,本研究还探讨了浸润免疫细胞与核心基因、风险评分的相关性。总之,本研究发现了 NPC 与 MDD 相关的核心基因,并成功构建了预后风险模型,这可能会对 NPC 的诊断和治疗及预后具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 数据选取与差异分析 从 NCBI GEO 公共数据库中下载 GSE12452 数据集,获得 41 例鼻咽癌患者的表达谱数据(正常组 10 例, NPC 组 31 例)。下载 GSE98793 数据集,获得 192 例外周血清样本数据(MDD 组 128 例, 正常人组 64 例)。下载并利用 GSE102349 的 113 例鼻咽癌患者的生存数据进行后续验证。方差分析采用 limma^[8] 软件包, 方差分析过滤条件为 $|\log_2FC| > 0.25$ & $P < 0.05$ 。

1.2 加权基因共表达网络分析 通过构建加权基因共表达网络,找到共表达基因模块,探索基因网络与表型的关系,以及网络中的核心基因。共 233 个样本, 8 697 个差异表达相关基因作为表达矩阵进行进一步分析。GSE12452 软阈值设置为 0.95, GSE98793 软阈值设置为 0.90。将加权邻接矩阵转化为拓扑重叠矩阵(TOM)来估计网络的连通性,并采用层次聚类方法构造 TOM 矩阵的聚类树结构。聚类树的不同分支代表不同的基因模块,不同的颜色代表不同的模块。

1.3 功能富集分析 用 R 包“clusterProfiler”^[9]对筛选出的差异基因进行基因本体(Gene Ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)功能富集分析。本研究中筛选条件为 $P < 0.05$ 。选取与 NPC 和 MDD 发生过程中相关的 10 条信号通路来探索差异表达基因的生物学功能。接着,利用基因集富集分析(GSEA)来了解 NPC 患者与 MDD 患者所涉及的生物过程。

1.4 特征基因的筛选及鉴定 从 GSE12452 和 GSE98793 两个数据集的 WGCNA 结果中取交集筛选出 47 个基因。由于只有 GSE102349 拥有患者生存进展数据,因此针对该基因表达谱和生存数据进行进一步分析与验证。接着,从 113 例中选取 88 例拥有详细数据的 NPC 患者中采用单因素 COX 比例风险回归分析筛选核心基因,并使用 R 包“survival”和“ggpubr”将其可视化。纳入 $P < 0.05$ 的基因,利用 LASO 回归算法中的系数得到风险评分。根据评分,获得预测 NPC 与 MDD 患者相关性最强的 3 个核心基

因(*CKAP5*、*GRB10*、*TPT1*)。

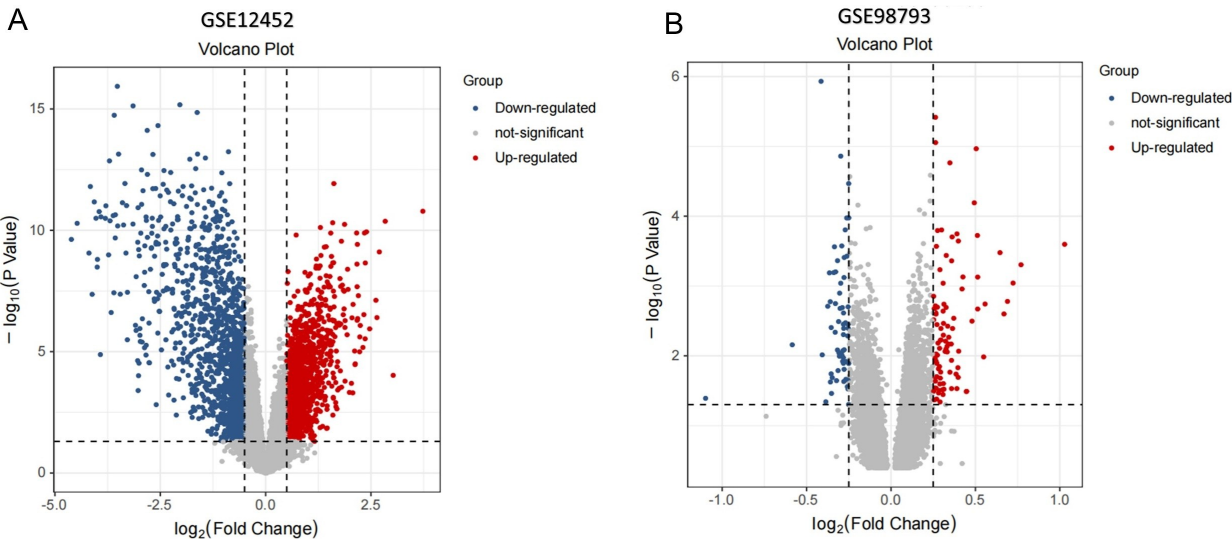
1.5 生存分析 根据中位风险评分,将验证数据集中的 88 例 NPC 患者分为高风险组和低风险组。设置不同的终点(1 年、2 年和 3 年),并使用随时间变化的受试者工作特征(ROC)曲线评估模型的性能,绘制 3 个特征基因的 ROC 曲线,判断核心基因在 NPC 患者中的预测诊断能力。

1.6 高风险组与低风险组免疫微环境差异分析与功能富集分析 采用 CIBERSORT、ssGSEA、xcell 算法分析高风险组与低风险组患者肿瘤组织中免疫细胞的浸润水平和基质细胞的水平,接着利用 R 包“ESTIMATE”分析两组患者的免疫评分;再利用免疫激活检查点与免疫抑制检查点分析两组风险患者肿瘤浸润的水平。随后,计算 Pearson 相关系数,评估 3 个核心基因(*CKAP5*、*GRB10*、*TPT1*)、风险评分与免疫细胞浸润之间的相关性。接着再进行两组风险患者的差异分析与功能富集分析,在他们的表达基因中使用 limma 软件包分析并取交集,筛选标准为: $P < 0.05$ 。用 R 软件包“clusterProfiler”对筛选出的差异表达基因进行 GO 分析和 KEGG 功能富集分析。接着,利用基因集富集分析(GSEA)来了解两组风险患者所涉及的生物过程。

1.7 统计分析 本研究采用 R 4.3.1 进行统计分析。对于定量数据,正态分布变量的统计显著性采用 Student’s t 检验,非正态分布变量的统计显著性采用 Wilcoxon 秩和检验。对于两组以上的比较,分别采用 Kruskal-Wallis 检验和单因素方差分析作为非参数和参数方法。采用双侧 Fisher 精确检验分析列联表。采用 Kaplan-Meier 生存分析和 COX 比例风险模型,利用在线工具(<https://hiplot.com.cn/cloud-tool/drawing-tool/detail/113>)绘制火山图,利用在线工具(<http://sangerbox.com/home.html>)绘制受试者工作特征(ROC)曲线。纳入具有详细临床资料的患者,并在多元回归模型中调整混杂因素。所有比较均为双侧比较, α 水平为 0.05,多重假设检验采用 Benjamini-Hochberg 方法控制错误发现率(FDR)。

2 结果

2.1 NPC 患者与 MDD 患者之间相关基因鉴定的差异表达 用 limma 包筛选 NPC 患者样本组织数据集中共存在 7 006 个差异表达基因,其中 3 003 个上调基因,4 003 个下调基因;MDD 患者血清样本数据集中共存在 1 691 个差异表达的基因,其中 974 个上调基因,717 个下调基因。见图 1A、图 1B。



注:A 为 GSE12452 数据集(NPC 患者)中差异表达基因的火山图;B 为 GSE98793 数据集(MDD 患者)中差异表达基因的火山图。

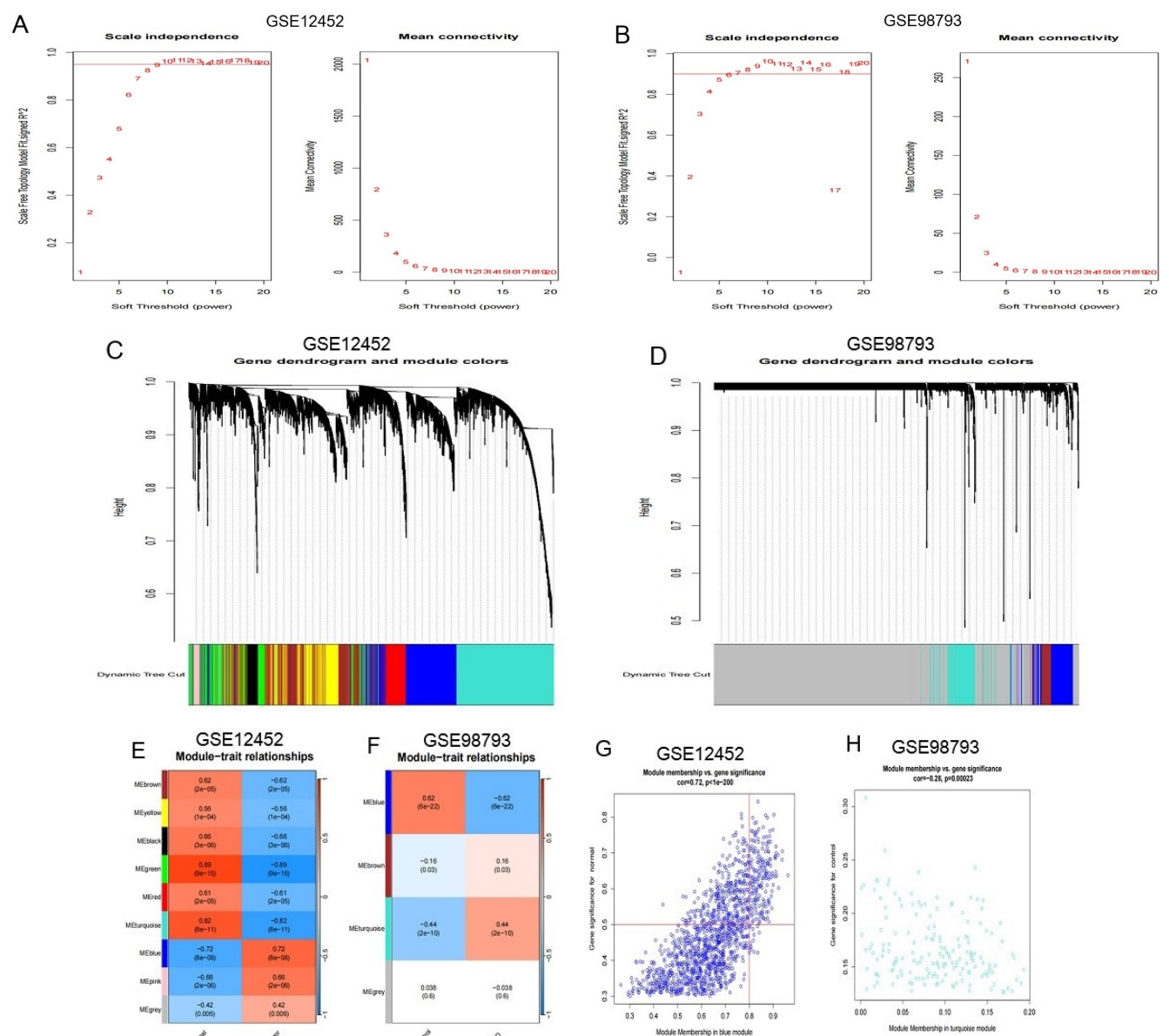
图 1 NPC 患者与 MDD 患者相关基因鉴定的差异表达图

2.2 NPC 患者与 MDD 患者之间高相关基因模块的鉴定 为了在重叠的 NPC 患者与 MDD 患者相关基因中寻找高度相关的基因,本研究进行 WCGNA 鉴定高度相关的基因模块。首先,本研究将 GSE12452 的基因软阈值设置为 0.95(见图 2A),将 GSE98793 的基因软阈值设置为 0.90(见图 2B),得到基因树状图(见图 2C、图 2D),并根据基因树状图分别识别出 9 个基

因模块(见图 2E)和 4 个基因模块(见图 2F)。在这 9 个基因模块中,蓝色模块与肿瘤发生有很强的相关性(系数为 0.72, P 值为 8×10^{-8} ,见图 2E、图 2G),绿色模块中的基因与正常组的相关性最为显著(系数为 0.89, P 值为 9×10^{-15} ,见图 2E)。在这 4 个基因模块中,绿色模块与 MDD 发生的相关性为(系数为 0.44, P 值为 2×10^{-10} ,见图 2F、见图 2H)。蓝色模块中的

基因与正常组的相关性最为显著(系数为 0.62, P 值为 6×10^{-22} , 见图 2F)。最后,本研究从 GSE12452 的绿色模块和蓝色模块中分别提取 647 个和 1 338 个基

因,从 GSE98793 的蓝色模块和绿色模块中分别提取 141 个和 168 个基因,接着进行进一步分析。



注: A 为 GSE12452 软阈值功率的确定;B 为 GSE98793 软阈值功率的确定;C 为 GSE12452 基于差异度量 (1-TOM) 聚类的差异表达基因的树形图;D 为 GSE98793 基于差异度量 (1-TOM) 聚类的差异表达基因的树形图;E 为 GSE12452 基因模块与临床特征的相关性;F 为 GSE98793 基因模块与临床特征的相关性;G 为 GSE12452 基因的蓝色模块基因相关散点图;H 为 GSE98793 基因的绿色模块基因相关散点图。

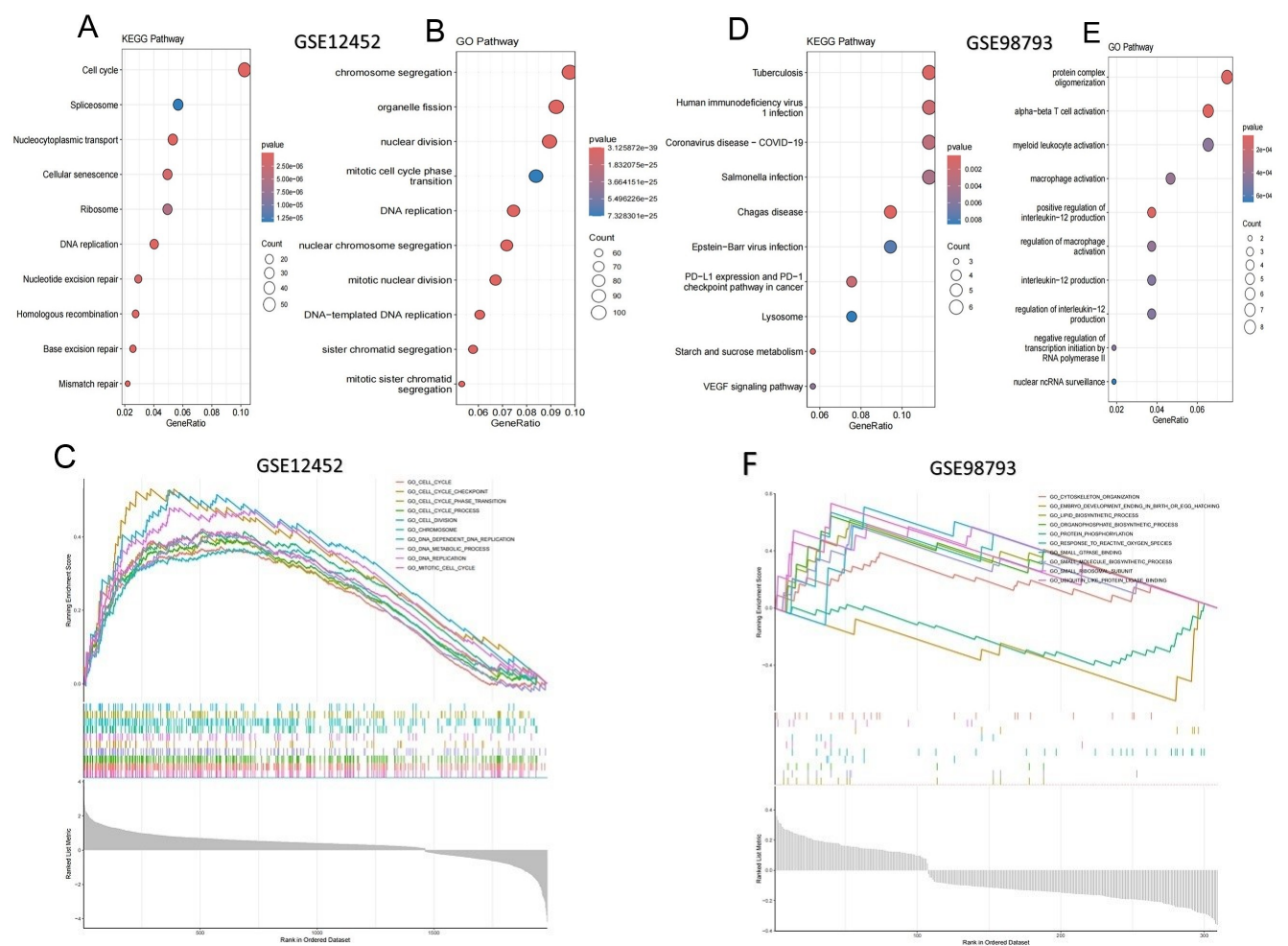
图 2 WGCNA 高相关基因模块的鉴定

2.3 NPC 患者与 MDD 患者之间的基因富集分析
本研究从 GSE12452 的绿色模块和蓝色模块中分别提取了 647 个和 1 338 个基因,进行了 KEGG 功能富集分析与 GO 分析。选取与 NPC 和 MDD 发生过程中相关的 10 条信号通路来探索差异表达基因的生物学功能,并使用气泡图进行展示(见图 3A、图 3B)。接着,本研究还进行 GSEA。结果显示,在 GSE12452 集群中显著富集的前 10 个标志通路包括细胞周期、细胞

周期检查点、细胞周期相变、细胞周期过程、细胞分裂、染色体、DNA 依赖和复制、DNA 代谢过程、DNA 复制以及有丝分裂细胞周期(见图 3C)。本研究从 GSE98793 的蓝色模块和绿色模块中分别提取了 141 个和 168 个基因,进行了 KEGG 功能富集分析与 GO 分析。选取与 NPC 和 MDD 发生过程中相关的 10 条信号通路来探索差异表达基因的生物学功能,并使用气泡图进行展示(见图 3D、图 3E)。接着,本研究还进

行 GSEA。结果显示,在 GSE98793 集群中显著富集的前 10 个标志通路包括细胞骨架组织、胚胎发育、脂质生物合成过程、有机磷酸盐生物合成过程、蛋白质磷

酸化、对活性氧的反应、小 gt 酶结合、小分子生物合成过程、小核糖体亚基和泛素样蛋白质连接酶结合(见图 3F)。

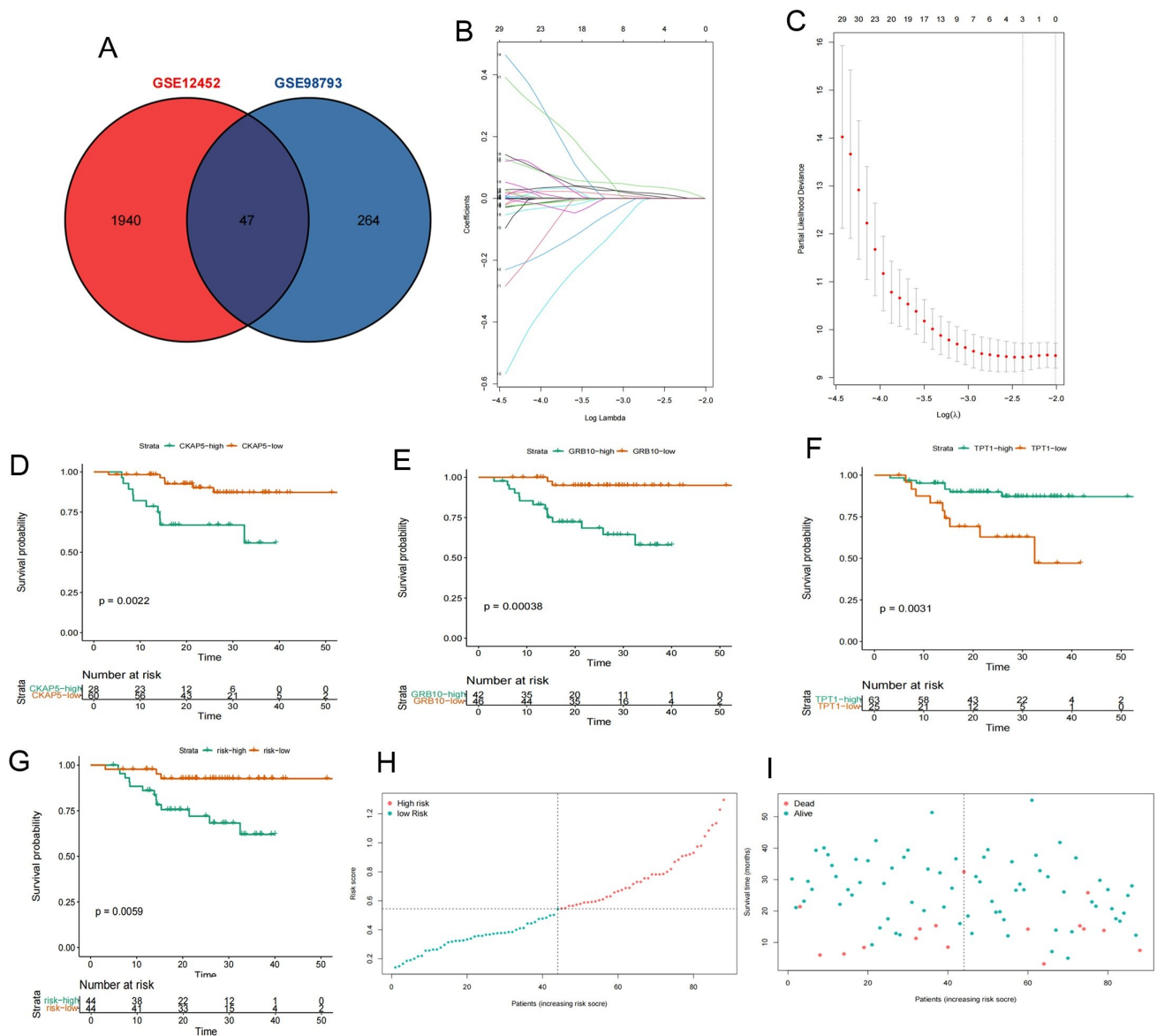


注：A 为 GSE12452 的 KEGG 通路富集分析；B 为 GSE12452 的差异基因 GO 分析；C 为 GSEA 显示的 GSE12452 基因聚类的 10 条信息通路；D 为 GSE98793 的 KEGG 通路富集分析；E 为 GSE98793 的差异基因 GO 分析；F 为 GSEA 显示的 GSE98793 基因聚类的 10 条信号通路。

图 3 NPC 患者与 MDD 患者各自的基因富集分析

2.4 生存分析 在 WGCNA 结果中取交集筛选出 47 个基因(见图 4A)。在 NPC 患者生存信息数据集中采用单因素 COX 比例风险回归分析,共筛选 70 个候选预后基因,在 $P < 0.05$ 的基础上鉴定出 27 个基因,然后应用这些基因进行 LASSO 回归,鉴定出 3 个最小 lambda 值的基因 *CKAP5*、*GRB10*、*TPT1*(见图 4B、图 4C)。此外,有两个风险预后基因(*CKAP5*、*GRB10*)的结果证明,该两个基因的高表达预后较差(见图 4D、图 4E);而另外 1 个基因(*TPT1*)的结果却显示,高表达预后较好(见图 4F)。3 个基因与生存概率均显著相关 ($P < 0.01$)。接着,本研究利用 LASSO 回归算法得

到的系数得到风险评分。根据风险评分的中位数将患者分为高风险组与低风险组。在该 88 例患者中,高风险评分的患者比低风险评分的患者有更低的生存概率和更早的死亡时间(见图 4G~图 4I)。此外,本研究预测了 3 个核心基因的预后准确性(见图 5)。在这 3 个数据集中,与正常患者、低风险患者相比,NPC 患者、MDD 患者、高风险患者的两个预后基因(*CKAP5*、*GRB10*)表达均显著上调,*TPT1* 表达下降(见图 5D)。总的来说,NPC 患者与 MDD 相关的预后风险模型成功建立,在预测 NPC 总生存方面有很强的表现。

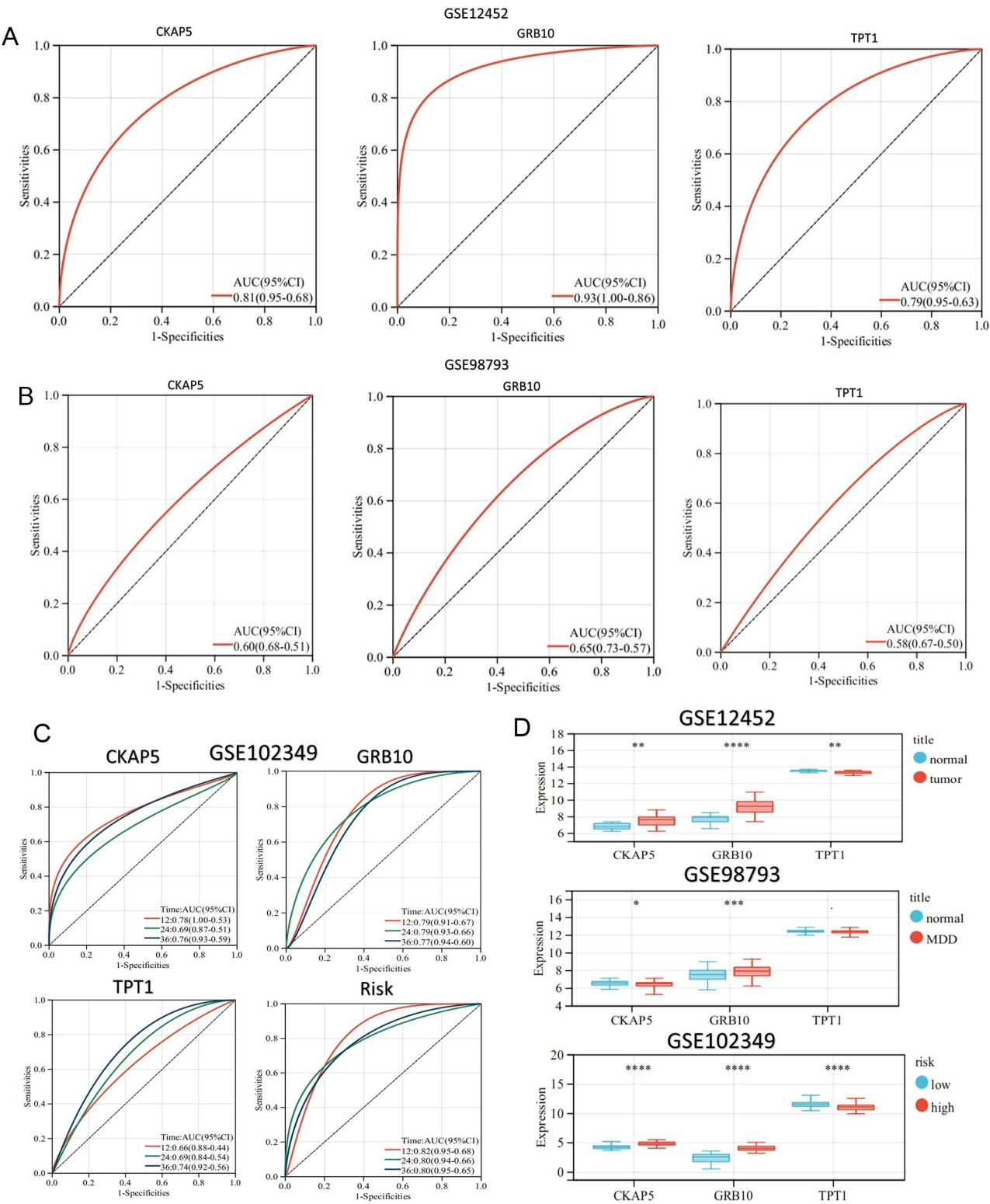


注：A 为 NPC 患者和 MDD 患者相关基因重叠的 Venn 图；B 为系数曲线，不同的颜色代表不同的基因；C 为通过 10 次交叉验证选择 LASSO 模型的最小 Lambda。当偏似然偏差最小时确定 Lambda；D 为数据集中 CKAP5 基因不同风险组的总生存率；E 为数据集中 GRB10 基因不同风险组的总生存率；F 为数据集中 TPT1 基因中不同风险组的总生存率；G 为数据集中高低风险组患者的总体生存图；H 为数据集中高低风险组的风险评分分布图；I 为数据集中高低风险组的生存时间图。

图 4 预测风险模型在 NPC 患者生存信息数据集中的表现

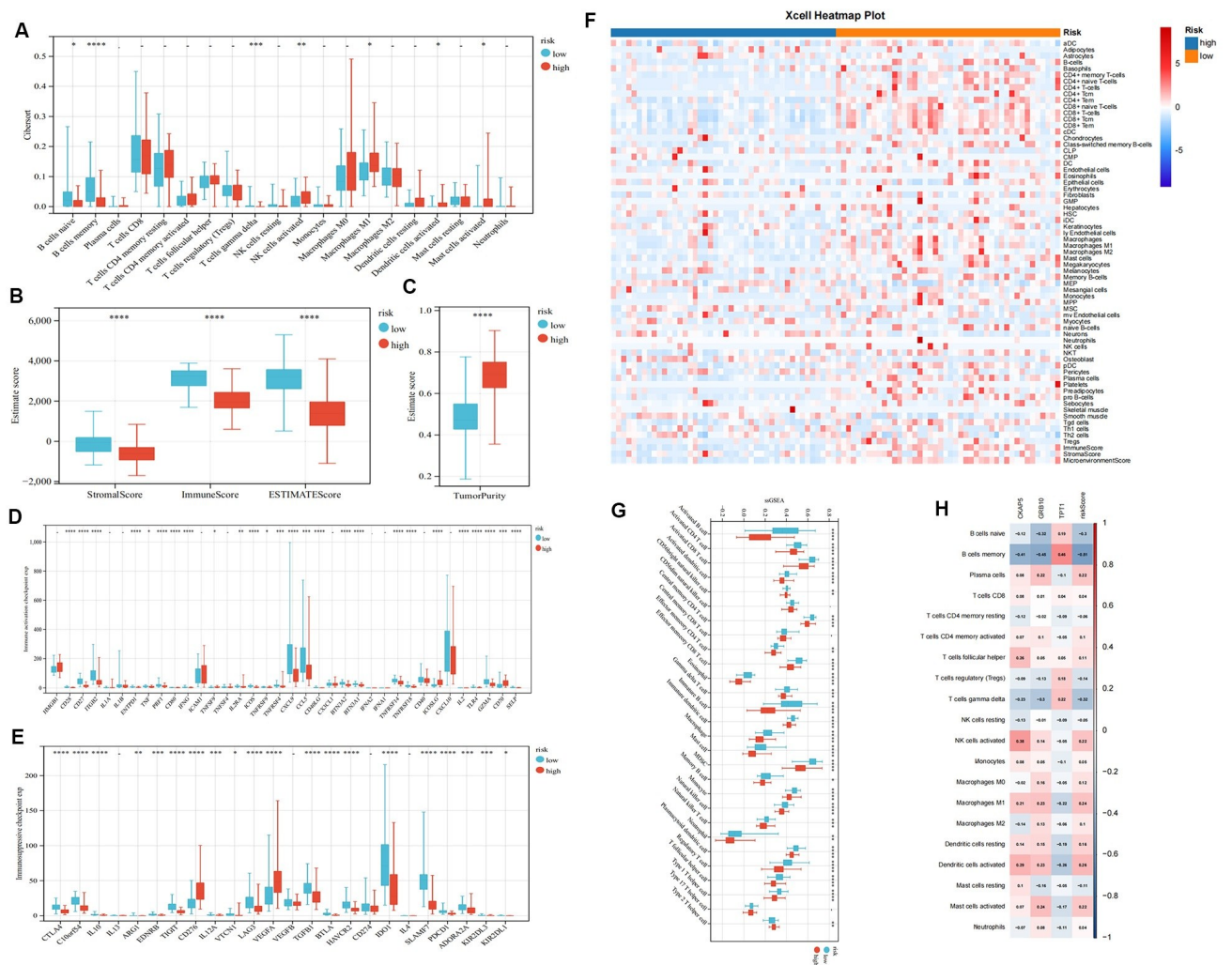
2.5 高风险组与低风险组免疫微环境差异分析 本研究使用 CIBERSORT、ESTIMATE score、ssGSEA、Xcell 算法来探索浸润免疫细胞与高风险、低风险两组患者之间的相关性。CIBERSORT 结果表明，两组风险患者与记忆 B 细胞 ($P < 0.0001$)、 $\gamma\delta$ T 细胞 ($P < 0.001$)、活化 NK 细胞 ($P < 0.01$) 有显著相关(见图 6A)。ESTIMATE score 结果表明，3 种评分均显示与肿瘤纯度负相关。与高风险组患者相比，低风险组患者的肿瘤纯度更低(见图 6B、图 6C)。免疫激活检查

点与免疫抑制检查点分析结果显示，两组风险患者与大多数肿瘤浸润免疫细胞具有相关性，低风险评分患者免疫浸润更强(见图 6D、图 6E)。xcell 分析结果也得知，低风险评分患者免疫浸润更强(见图 6F)。ssGSEA 结果表明，与高风险组患者相比，低风险组患者大多数免疫细胞的表达水平更高，相关基因更富集(除 2 型 T 辅助细胞之外，见图 6G)。相关性分析结果显示，预后基因、风险评分也与大多数免疫细胞高度相关(见图 6H)。



注: A 在 GSE12452 数据集中,CKAP5、GRB10、TPT1 基因的各自预测模型在 1 年的性能随时间变化的 ROC 曲线; B 在 GSE98793 数据集中,CKAP5、GRB10、TPT1 基因的各自预测模型在 1 年的性能随时间变化的 ROC 曲线; C 在 GSE102349 数据集中,CKAP5、GRB10、TPT1 3 个基因以及高风险与低风险患者的预测模型在 1 年、2 年、3 年的性能随时间变化的 ROC 曲线;D 为 CKAP5、GRB10、TPT1 基因在 3 个数据集中的表达水平。

图 5 预测风险模型在 GSE12452、GSE98793 和 GSE102349 这 3 个数据集中的表现



注：A 为高风险与低风险两组患者的 CIBERSORT 分析；B 为高风险与低风险两组患者的 ESTIMATE score 分析；C 为高风险与低风险两组患者的 Tumor purity 分析；D 为高风险与低风险两组患者的免疫激活检查点 exp；E 为高风险与低风险两组患者的免疫激活抑制点 exp；F 为高风险与低风险两组患者的 Xcell 分析；G 为高风险与低风险两组患者的 ssGSEA；H 为免疫细胞浸润与预后基因的关系。

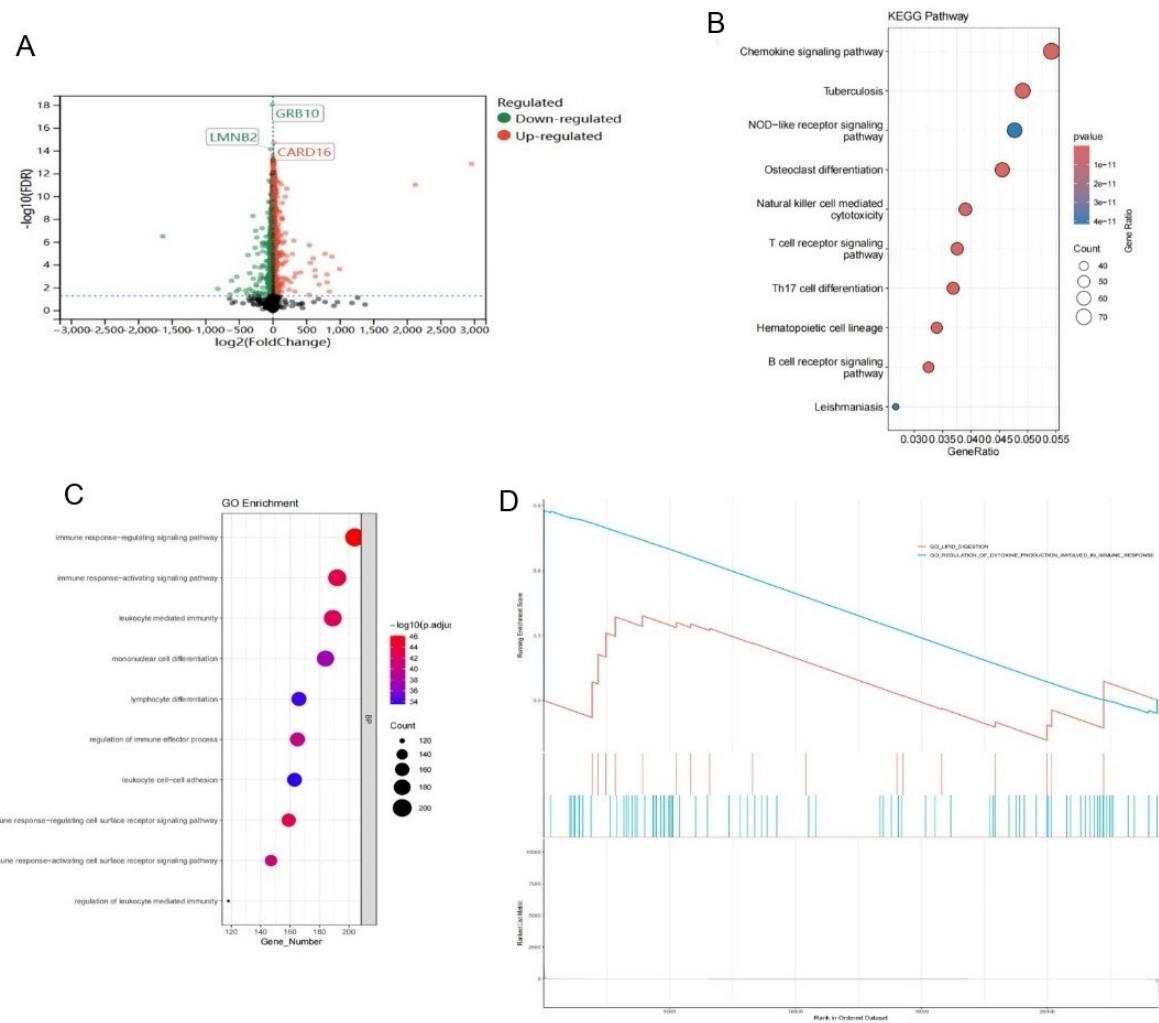
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 高风险与低风险两组免疫细胞浸润的不同特征

2.6 高风险组与低风险组差异分析与功能富集分析

为了鉴定高风险组与低风险两组患者差异表达的相关基因,本研究从 GSE102349 的 exp 文件与两组风险患者评分数据进行差异分析。结果显示,共存在 9 560 个差异表达基因,其中 5 057 个上调基因,4 503 个下调基因(见图 7A)。为探索差异表达基因的生物学功能,本研究将存在差异表达的 9 560 个基因进行了 KEGG 功能富集分析与 GO 分析,选取与 NPC 和 MDD 发生过程中相关的 10 条信号通路进行气泡图展示。KEGG 功能富集分析结果显示,显著富集的标志通路为趋化因子信号、结核、NOD 受体信号、破骨细胞

分化、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号、Th17 细胞分化、造血细胞谱系、B 细胞受体信号、利什曼病(见图 7B)。GO 分析结果显示,显著富集的标志通路为免疫反应调节信号通路、免疫反应激活信号通路、白细胞介导免疫、单核细胞分化、淋巴细胞分化、免疫效应过程调控、白细胞-细胞黏附、免疫反应调节细胞表面受体信号通路、免疫反应激活细胞表面受体信号通路、白细胞介导免疫调控(见图 7C)。还进行 GSEA,结果显示,显著富集的标志通路为脂类的消化与参与免疫应答的细胞因子调控(见图 7D)。



注：A 为高风险与低风险两组患者数据集中差异表达基因的火山图；B 为高风险与低风险两组患者差异基因的 KEGG 通路富集分析；C 为高风险与低风险两组患者差异基因的 GO 分析；D 为 GSEA 显示了高风险与低风险两组患者基因聚类的信号通路。

图 7 高风险组与低风险两组差异分析与富集分析

3 讨论

NPC 患者放疗预后较好,但普遍存在抑郁等心理痛苦情况。抑郁症是一种普遍存在的全球性精神疾病,给患者和社会带来了沉重的经济负担。因此,早期诊断以及寻找有效的治疗靶点对 NPC 患者发生抑郁症的防治具有重要的意义。本研究通过生物信息学分析方法鉴定出 *CKAP5*、*GRB10* 和 *TPT1* 为 NPC 患者发生抑郁过程中的关键基因,为 NPC 患者发生抑郁症的机制研究及诊断治疗提供新的思路。

本研究在 NPC 患者数据集中共筛选出 7 016 个差异表达基因,在 MDD 患者数据集中共筛选出 1 691 个差异表达基因。功能注释和 KEGG 通路富集分析表明,鼻咽癌患者集群中的基因主要参与细胞周期、细胞周期检查点、细胞周期相变等信号通路。而 MDD 患者集群中的基因主要参与细胞骨架组织、胚胎发育、脂质生物合成过程等信号通路。一些研究已经描述了特定基因表达的改变可能影响鼻咽癌的肿瘤行为,包

括增殖能力、受影响细胞的凋亡以及细胞的侵袭和转移^[10-11]。这一结果与肿瘤细胞的侵袭和转移与细胞粘附异常、内胚层细胞增殖和细胞核分裂的关系是一致的^[12]。此外,肿瘤细胞的增殖和凋亡与有丝分裂细胞周期缺陷密切相关^[13]。最近的研究表明,细胞周期通路和 NF- κ B 通路基因的单核苷酸多态性可能预测 NPC 患者对放疗的临床反应^[14]。这些结果与鼻咽癌的发生发展与细胞周期和功能缺陷密切相关的事实相一致,这与本研究的富集功能分析结果基本一致。

本研究发现 3 个基因(*CKAP5*、*GRB10* 和 *TPT1*)与 NPC 患者合并 MDD 的形成、发展和进展密切相关,提示 *CKAP5*、*GRB10* 在 NPC 患者发生抑郁症过程中发挥促进作用,而 *TPT1* 有可能发挥保护作用。*CKAP5* 是一种微管相关蛋白,肿瘤的生长在一定程度上取决于有丝分裂事件的增加。有丝分裂的关键步骤是纺锤体的组装和姐妹染色单体的分离,而微管相关蛋白作用就是正确分离染色单体,促进肿瘤的生长。

此外,CKAP5 在其他癌症类型中也有过临床预测的报道,如乳腺癌^[15]、非小细胞肺癌^[16]、胶质瘤细胞迁移和增殖等^[17]。GRB10 是一种生长因子受体结合蛋白,它已被证明在快速增殖的肿瘤中起促进作用。例如,GRB10 参与前列腺癌的发生^[18],在宫颈鳞癌中表达上调^[19]。TPT1 为翻译控制肿瘤蛋白-1,据报道,TPT1 具有调节细胞增殖的作用,在包括癌细胞在内的许多细胞中发挥包括蛋白质合成、降解与自噬在内的细胞保护作用,还有抗凋亡、抗应激、抗氧化等细胞保护、有丝分裂等事件中的多种作用^[20]。有研究已经报道了 TPT1 也可能支持神经元祖细胞的维持以及干细胞的维持。但 TPT1 具体在 NPC 与 MDD 发挥的保护作用还得经过后续更详细的实验研究确定。这些结果表明,本研究中的 CKAP5、GRB10 与 TPT1 基因的临床应用潜力巨大,能够预测鼻咽癌患者与抑郁症的早期诊断。

本研究利用 CIBERSORT、ssGSEA、xcell、ESTIMATE score 算法对两组风险患者的免疫细胞数据进行量化。结果均显示两组风险患者与大多数免疫细胞相关,低风险评分患者免疫浸润更强。而关于两组风险鼻咽癌患者的治疗研究中^[21-22],高风险组患者适合同步治疗,低风险组患者单独治疗效果不劣于同步放化疗。在本研究中,低风险组的样本同时具有较高的免疫评分、较低的肿瘤纯度评分和较高的免疫检查点抑制剂值。可以合理推测,高风险组患者比低风险组患者更能从免疫治疗中获益。建立的预后模型可以预测 NPC 患者预后不良的风险。对于被分配到高风险组的鼻咽癌患者,放化疗与免疫治疗相结合将是一个合适的选择,以尝试更好的结果。本研究对两组风险患者的富集分析时还发现脂类的消化与参与免疫应答的细胞因子调控通路的富集,这可能是导致高风险患者预后不佳的原因。脂质代谢的改变越来越被认为是癌细胞的标志。癌细胞主要将脂肪酸酯化为磷脂,磷脂是细胞膜的重要组成部分,因此参与这一过程的蛋白质可能是癌症治疗的极好化疗靶点。

本研究一个新颖之处是建立了 NPC 患者与 MDD 相关的风险模型,并取得了良好的 NPC 预后准确性。本研究的模型在高风险与低风险患者 1 年、2 年、3 年的 ROC 曲线下面积(AUCS)分别为 0.82、0.80 和 0.80,具有较高的预测价值,但仍有一些局限性。首先,NPC 患者的生存预后数据例数较少,因此需要更多和更详细的病例数据来预测 1~3 年的生存率。其次,该预测模型需要在未来的多中心、大规模临床试验中得到验证和修正。最后,本研究缺乏证明预后基因在 NPC 患者与 MDD 患者细胞系中表达的基础实验,有待进一步研究。

本研究通过生物信息学分析鉴定了 NPC 患者与 MDD 患者共同的 3 个预后能力最强的基因:CKAP5、GRB10 和 TPT1。CKAP5、GRB10 在 NPC 患者与 MDD 患者中共同发挥促进作用,而 TPT1 有可能发挥保护作用。这可能是 NPC 患者与 MDD 患者之间共同的生物标志物和潜在新治疗靶点。

参考文献:

- [1] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [3] GUAN S Z, WEI J R, HUANG L K, et al. Chemotherapy and chemo-resistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Med Chem, 2020, 207: 112758.
- [4] ALFOUZAN A F. Radiation therapy in head and neck cancer[J]. Saudi Med J, 2021, 42(3): 247-254.
- [5] BUCCIARELLI V, CATERINO AL, BIANCO F, et al. Depression and cardiovascular disease: the deep blue sea of women's heart[J]. Trends Cardiovasc Med, 2020, 30(3): 170-176.
- [6] NOH O K, HEO J. Mental disorders in nasopharyngeal carcinoma patients receiving radiation therapy: a nationwide population-based study [J]. In Vivo, 2021, 35(5): 2901-2908.
- [7] ZHU G L, XU C, YANG K B, et al. Causal relationship between genetically predicted depression and cancer risk: a two-sample bi-directional mendelian randomization [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 353.
- [8] RITCHIE M E, PHIPSON B, WU D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.
- [9] WU T Z, HU E Q, XU S B, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. Innovation (Camb), 2021, 2(3): 100141.
- [10] YI L, OUYANG L, WANG S, et al. Long noncoding RNA PTPRG-AS1 acts as a microRNA-194-3p sponge to regulate radiosensitivity and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via PRC1 [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 19088-19102.
- [11] ZHENG Y Q, CUI Y R, YANG S, et al. Opa interacting protein 5 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by promoting EMT via modulation of JAK2/STAT3 signal [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 613-621.

本文引文格式:陈春春,唐经纬,孙岩峰,等. lncRNA AFAP1-AS1 与 METTL14 对三阴性乳腺癌患者预后的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 301-305.

【论著与临床报道】

lncRNA AFAP1-AS1 与 METTL14 对 三阴性乳腺癌患者预后的影响

陈春春,唐经纬,孙岩峰,张浩,乔梦祥,郭伟

(蚌埠医科大学第一附属医院肿瘤外科,安徽 蚌埠 230032)

摘要:目的 探究三阴性乳腺癌(TNBC)患者甲基转移酶样 14(METTL14)、长链非编码(lncRNA)肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1(AFAP1-AS1)表达水平与预后的关系。方法 对 2020 年 3 月至 2023 年 3 月蚌埠医科大学第一附属医院肿瘤外科收治的 60 例 TNBC 患者进行分析,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测乳腺癌组织及其癌旁组织中的 lncRNA AFAP1-AS1 mRNA、METTL14 mRNA 表达情况。采用多因素 COX 回归分析影响 TNBC 患者预后的相关因素。绘制 Kaplan-Meier 曲线分析 lncRNA AFAP1-AS1 mRNA、METTL14 mRNA 表达与 TNBC 患者 1 年生存率的关系。结果 较癌旁组织,乳腺癌组织中的 lncRNA AFAP1-AS1 mRNA 表达量更高,而 METTL14 mRNA 表达量则更低($P < 0.001$);多因素 COX 回归分析显示,肿瘤直径 > 5 cm、TNM 分期 III 期、lncRNA AFAP1-AS1 mRNA 高表达、METTL14 mRNA 低表达均是 TNBC 患者 1 年内死亡的独立危险因素($P < 0.05$);Kaplan-Meier 曲线结果显示,lncRNA AFAP1-AS1 mRNA 高表达患者 1 年生存率为 58.06%(18/31),低于 lncRNA AFAP1-AS1 mRNA 低表达患者的 89.66%(26/29)($P < 0.05$);METTL14 mRNA 低表达患者 1 年生存率为 45.45%(10/22),低于 METTL14 mRNA 高表达患者的 89.47%(34/38)($P < 0.05$)。结论 在 TNBC 患者癌组织中,lncRNA AFAP1-AS1 mRNA 表达显著升高,而 METTL14 mRNA 则明显下降,且二者异常表达与更短的生存期及更高死亡风险相关,均有望成为 TNBC 患者预后评估的潜在生物学指标。

关键词:三阴性乳腺癌;预后;甲基转移酶样 14;肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0301-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.017

Impact of lncRNA AFAP1-AS1 and METTL14 on prognosis of patients with triple-negative breast cancer

CHEN Chun Chun, TANG Jingwei, SUN Yanfeng, ZHANG Hao, QIAO Mengxiang, GUO Wei

(Department of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of
Bengbu Medical University, Bengbu 230032, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between the expression levels of methyltransferase-like 14 (METTL14) and long non-coding RNA (lncRNA) actin filament associated protein 1-antisense RNA1 (AFAP1-AS1) and prognosis in patients with triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods** A total of 60 TNBC patients admitted to the Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University from March 2020 to March 2023 were analyzed. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of lncRNA AFAP1-AS1 mRNA and METTL14 mRNA in breast cancer tissues and adjacent non-tumor tissues. Multivariate COX regression was used to analyze the related factors affecting the prognosis of TNBC patients. Kaplan-Meier curve was plotted to analyze the relationship between the expression of lncRNA AFAP1-AS1 mRNA and METTL14 mRNA and the 1-year

基金项目:蚌埠医学院自然科学基金重点项目(2022byzd036)

第一作者:陈春春,硕士,主治医师,研究方向:乳腺甲状腺疾病等,E-mail:chunchun200510@163.com

survival rate of TNBC patients. **Results** Compared with adjacent non-tumor tissues, breast cancer tissues exhibited higher expression levels of *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA and lower expression levels of *METTL14* mRNA ($P < 0.001$). Multivariate COX regression analysis indicated that tumor diameter > 5 cm, TNM stage III, high expression of *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA, and low expression of *METTL14* mRNA were all independent risk factors for death within 1 year in TNBC patients ($P < 0.05$). Kaplan-Meier curve results showed that the 1-year survival rate of patients with high expression of *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA was 58.06% (18/31), which was lower than that of patients with low expression of *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 89.66% (26/29) ($P < 0.05$). The 1-year survival rate of patients with low expression of *METTL14* mRNA was 45.45% (10/22), which was lower than that of patients with high expression of *METTL14* mRNA 89.47% (34/38) ($P < 0.05$). **Conclusion** In the cancer tissues of TNBC patients, the expression of *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA is significantly increased, while the expression of *METTL14* mRNA is significantly decreased. The abnormal expression of both is associated with a shorter survival time and a higher risk of death, and both are expected to become potential biological indicators for the prognosis evaluation of TNBC patients.

Key words: triple-negative breast cancer; prognosis; methyltransferase-like 14; actin filament-associated protein 1- antisense RNA1

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TN-BC)是临床较为特殊的一类乳腺癌病理类型,患者病理检查结果通常显示为,雌激素受体、孕激素受体以及人表皮生长因子受体-2 均呈阴性^[1]。乳房内肿块、恶性钙化、乳头回缩是 TNBC 患者典型症状表现,且随病灶增大和转移,还会出现骨痛、病理性骨折、头痛、肝区不适等伴随症状,严重影响患者生命健康。此外,较其他病理类型而言,TNBC 通常更具侵袭性,且患者生存率更差。因此,探寻有关 TNBC 预后更为可靠和精准的靶点,对于提高 TNBC 患者的生存率改善至关重要^[2]。长链非编码(long non-coding RNA, lncRNA)肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1(Actin filament-associated protein 1 antisense RNA1, AFAP1-AS1)位于蛋白质编码基因 AFAP1 的反义链上,最早于食管腺癌和正常组织的测序中发现^[3]。近来研究表明 AFAP1-AS1 在胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤疾病的癌组织和细胞中均表达上调;并认为与肿瘤细胞迁移和侵袭行为密切相关^[4]。甲基转移酶样 14(methyltransferase like 14, METTL14)是 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰过程中的重要调控因子。有研究发现, METTL14 在肿瘤恶性程度更高的乳腺癌患者中表达下调,并在 TNBC 病理分型中表达最低; METTL14 可能参与并调控 TNBC 的发生及进展^[5]。基于此,本研究分析 TNBC 患者 *METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达水平与预后的关系,以期临床 TNBC 诊治及患者预后改善提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 2020 年 3 月至 2023 年 3 月本院收治的 60 例 TNBC 患者进行分析。纳入标准:①年龄 18 岁及以上;②经组织病理学检测确诊为 TN-

BC^[6];③临床及随访资料完整,诊疗数据详实、可靠;④此前未接受过内分泌治疗、放化疗等抗肿瘤相关治疗;⑤依从性良好;⑥自愿参与本研究。排除标准:①无认知障碍或精神类疾病史;②合并血液或免疫系统疾病;③合并其他恶性肿瘤疾病者;④ Luminal 型或 Her-2 型等其他类型乳腺癌患者。本研究经院伦理委员会批准进行(编号:2023 第 488 号)。

1.2 *METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达检测方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)技术检测乳腺癌及其癌旁正常组织中 *METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 的表达情况。①标本采集:收集 TNBC 患者经手术切除的乳腺癌组织及其对应的癌旁正常组织(距离肿瘤组织边缘 ≥ 5 cm,术后病理证实无癌细胞),经液氮速冻后对应标记,并转移至 -80 °C 冰箱储存备检。②检测步骤:以 Trizol 法(上海源叶生物科技有限公司;货号:R30506)提取乳腺癌组织及其对应的癌旁组织中的总 RNA,并逆转录生成 cDNA(日本 TaKaRa 公司;货号:RR036A);收集 cDNA 用于 RT-qPCR 检测反应条件:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 34 s, 62 °C 退火 30 s, 75 °C 延伸 32 s, 总计循环次数 40 次。每个样品设置 3 个重复孔,并进行 3 次实验。以 GAPDH 为内参,每份样本取 3 次检测中间值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。③ *METTL14* 引物序列(5'-3'), F 端:GAGTGTGTTTACGAAAATGGGGT; R 端:CCGTCTGTGCTACGCTTCA。 *lncRNA AFAP1-AS1* 引物序列(5'-3'), F 端:AATGGTGGTAGGAGGGAGGA; R 端:CACACAGGGGAATGAAGAGG。 GAPDH 引物序列(5'-3'), F 端:GAGTGTGTTTACGAA AATGGGGT; R 端:CCGTCTGTGCTACGCTTCA。引物合成以及 DNA 测序服务均由南京金斯瑞生物科

技有限公司提供。

1.3 预后和资料收集 所有患者出院后均定期接受门诊复查或电话随访,时间截止至 2024 年 10 月或患者期间出现死亡。依据随访期间是否发生癌因死亡,将患者分为生存组($n=44$)与死亡组($n=16$)。收集可能影响 TNBC 患者生存预后的相关资料,包括年龄、淋巴结转移、肿瘤直径、TNM 分期以及 *METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达情况。

1.4 统计学方法 数据应用 SPSS 22.0 处理分析。*METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 等符合正态分布的计量资料均以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用配对 t 检验;淋巴结转移、TNM 分期等计数资料均以[$n(\%)$]描述,行 χ^2 检验;采用 COX 回归分析影响 TNBC 患者预后的相关因素;绘制 Kaplan-Meier 曲线分析 *METTL14* mRNA、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达与 TNBC 患者 1 年生存率的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNBC 患者乳腺癌组织及其癌旁组织中的 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA、*METTL14* mRNA 表达情况 与癌旁组织比较,乳腺癌组织中的 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达量更高,而 *METTL14* mRNA 表达量则更低($P<0.001$)。见表 1。

表 1 TNBC 患者乳腺癌组织及其癌旁组织中的 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA、*METTL14* mRNA 表达情况 ($n=60$)

组织	<i>lncRNA AFAP1-AS1</i> mRNA	<i>METTL14</i> mRNA
乳腺癌组织	1.58±0.10	0.52±0.05
癌旁组织	1.01±0.04	1.03±0.07
t	40.472	-48.364
P	<0.001	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2.2 影响 TNBC 患者预后的单因素分析 随访期间,60 例 TNBC 患者的 1 年生存率为 73.33%(44/60)。以表 1 中 TNBC 患者乳腺癌组织 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA、*METTL14* mRNA 相对表达量的均值 1.58 及 0.52 为临界值,分别分为高表达组和低表达组;单因素分析结果显示,生存组和死亡组在肿瘤直径、TNM 分期、*METTL14* mRNA 以及 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达方面比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 TNBC 患者预后不良的单因素分析

因素	n	生存组 ($n=44$)	死亡组 ($n=16$)	χ^2	P
年龄/岁					
<60	34	24(54.55)	10(62.50)	0.302	0.582
≥60	26	20(45.45)	6(37.50)		
肿瘤直径/cm					
≤5	36	32(72.73)	4(25.00)	11.136	0.001
>5	24	12(27.27)	12(75.00)		
TNM 分期					
I~II 期	35	30(68.18)	5(31.25)	6.584	0.010
III 期	25	14(31.82)	11(68.75)		
淋巴结转移					
有	24	16(36.36)	8(50.00)	0.909	0.340
无	36	28(63.64)	8(50.00)		
<i>METTL14</i> mRNA					
低表达组	22	10(22.73)	12(75.00)	13.806	<0.001
高表达组	38	34(77.27)	4(25.00)		
<i>lncRNA AFAP1-AS1</i> mRNA					
低表达组	29	26(59.09)	3(18.75)	7.646	0.006
高表达组	31	18(40.91)	13(81.25)		

注:表内计数资料数据用[$n(\%)$]表示。

2.3 影响 TNBC 患者预后的多因素 COX 回归分析 以 TNBC 患者随访期间内是否死亡为因变量,行多因素 COX 回归分析。结果显示,肿瘤直径>5 cm、TNM 分期 III 期、*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 高表达、*METTL14* mRNA 低表达均是 TNBC 患者 1 年内死亡的独立危险因素($P<0.05$)。见表 3。

表 3 影响 TNBC 患者预后的多因素 COX 回归分析

因素	变量赋值	b	SE	Wald χ^2	HR	95% CI	P
临床分期	I~II 期=0, III 期=1	1.333	0.587	5.162	3.793	1.201~11.977	0.023
肿瘤直径	≤5 cm=0, >5 cm=1	1.633	0.594	7.563	5.118	1.599~16.386	0.006
<i>METTL14</i> mRNA	高表达=0,低表达=1	1.399	0.589	5.640	4.051	1.277~12.853	0.018
<i>lncRNA AFAP1-AS1</i> mRNA	低表达=0,高表达=1	1.300	0.650	3.997	3.670	1.026~13.126	0.046

2.4 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA、*METTL14* mRNA 表达与 TNBC 患者 1 年生存率的关系 Kaplan-Meier 曲线结果显示,*lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 高表达患者 1 年生存率为 58.06%(18/31),低于 *ln-*

cRNA AFAP1-AS1 mRNA 低表达患者的 89.66%(26/29),Log-rank 检验, $\chi^2=6.818$, $P<0.05$; *METTL14* mRNA 低表达患者 1 年生存率为 45.45%(10/22),低于 *METTL14* mRNA 高表达患者的 89.47%

(34/38), Log-rank 检验, $\chi^2 = 15.248$, $P < 0.05$ 。见图 1~图 2。

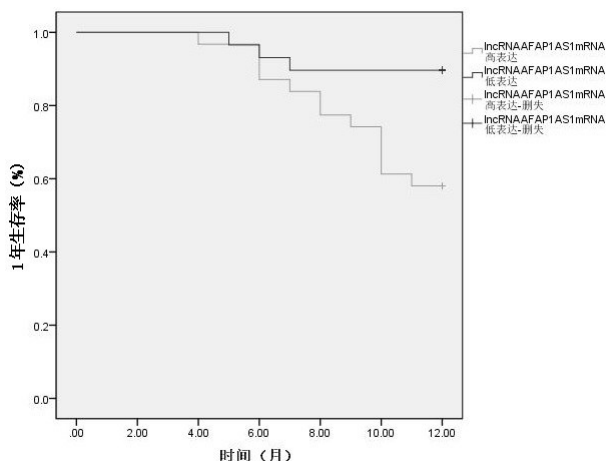


图 1 TNBC 患者 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 高表达/低表达 Kaplan-Meier 曲线分析

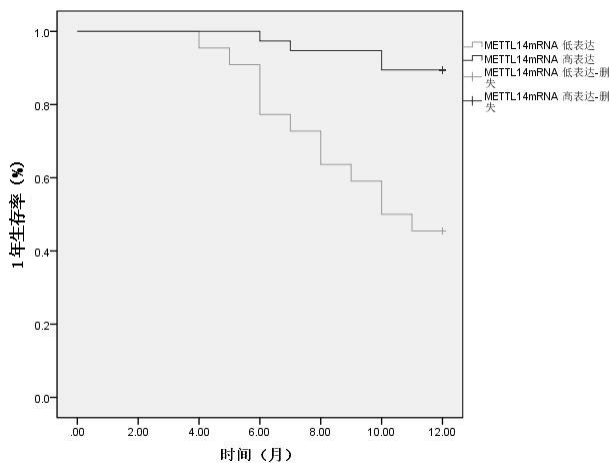


图 2 TNBC 患者 *METTL14* mRNA 高表达/低表达 Kaplan-Meier 曲线分析

3 讨论

尽管乳腺癌疾病的筛查和治疗取得了进展,但其目前仍然是全球女性癌症死亡的主要原因^[7]。尤其是病理分型为 TNBC 的患者,因具备特殊的生物学行为和病理特征,而对临床常用的治疗手段不太敏感,故在临床上预后更差,死亡风险也更高。因此,迫切需要更好地了解 TNBC 的分子基础并探寻和鉴定更多有效生物学指标,以制定针对 TNBC 诊治的有效策略。

本研究结果显示, TNBC 患者乳腺癌组织中的 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达量较癌旁组织更高,而 *METTL14* mRNA 表达量较癌旁组织则更低,提示 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 及 *METTL14* mRNA 的异常表达可能与 TNBC 的发生及进展密切相关。*lncRNA* 是一类长度约在 200 个核苷酸以上的非编码 RNA,尽管 *lncRNA* 几乎不参与蛋白的编码过程,但它们可通过 RNA 干扰、基因沉默以及 DNA 去甲基化

等机制参与染色质修饰、转录、翻译以及蛋白质活性等多种分子生物学过程,进而调控基因的表达^[8]。近来研究表明^[9], *lncRNA* 在多种恶性肿瘤疾病的诊治中表现出较高潜在价值。其中, *AFAP1-AS1* 作为一种由 *AFAP1* 基因反义链编码的 *lncRNA*, 被认为与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭等恶性生物学行为密切相关;且 *AFAP1-AS1* 还被发现在包含乳腺癌、宫颈癌等多种人类癌症细胞中,表达显著上调^[10]。研究显示^[11], 在 TNBC 中, *AFAP1-AS1* 过表达可通过靶向抑制 *miR-145* 表达,上调 *MTH1* 蛋白表达,进而促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭;而 *MTH1* 作为一种核苷酸焦磷酸酶,其在肿瘤细胞中的高水平表达被证实可减少活性氧诱导的细胞损伤,并促进肿瘤细胞逃避细胞凋亡。此外, *AFAP1-AS1* 还被证明可与 *miR-2110* 竞争性结合,以降低后者对转录因子特异性蛋白 1 (Specificity protein 1, Sp1) 的抑制作用,从而增强乳腺癌细胞的增殖、转移和侵袭能力并促进体内肿瘤生长^[12]。*METTL14* 是一种甲基转移酶,可与去甲基化酶、N6-甲基腺苷(m6A)结合蛋白等,共同参与和调控 m6A 甲基化的起始及进行过程^[13]。其中,以 m6A 为代表的 RNA 修饰是转录后表观遗传修饰的重要类型之一,且 m6A 甲基化修饰在近来研究中被证明广泛参与了肿瘤细胞的恶性生物学行为^[14]。有研究发现, *METTL14* 表达在患有更高级别肿瘤分期的女性中显著下调;并且 *METTL14* 通过调节 m6A 依赖性初级 *miRNA* 的加工,进而抑制癌细胞的生长和转移^[15]。同时,过表达 *METTL14* 还被证实可显著抑制乳腺癌细胞活力,并阻碍癌细胞的集落形成和迁移^[16]。另有研究发现^[17], *METTL14* 可通过促进肿瘤抑制基因 *APC* mRNA m6A 修饰过程和水平,以提高 *APC* mRNA 的稳定性并防止其降解。在 TNBC 中, *METTL14* 的低表达使得这一过程发生逆转,并最终导致 *APC* 蛋白水平降低以及乳腺癌中 Wnt 信号通路异常激活;而 Wnt 通路过度激活被认为可积极调节肿瘤细胞的各种特性,并诱发肿瘤免疫抑制和免疫逃逸等肿瘤恶性事件的发生^[18]。可见, *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 与 *METTL14* mRNA 均是 TNBC 发生及进展过程中的关键调控因子,在 TNBC 临床诊治中均具备较高潜在价值。

此外,本研究多因素回归分析显示, *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 高表达、*METTL14* mRNA 低表达均是影响 TNBC 患者 1 年内死亡的独立危险因素,提示 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA、*METTL14* mRNA 的异常表达还可能与 TNBC 患者的不良预后结局有关。分析原因可能是, *AFAP1-AS1* 及 *METTL14* 的异常紊乱促进了 TNBC 的增殖和侵袭能力,

并抑制了相关抑癌基因的活性,使得 TNBC 病情进一步加剧,增大疾病治疗难度的同时,患者预后复发及死亡风险也显著上升^[19]。且本研究进一步应用 Kaplan-Meier 曲线分析不同 AFAP1-AS1 及 METTL14 表达情况 TNBC 患者的 1 年内预后生存率,结果显示高 *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达和低 *METTL14* mRNA 表达组的 1 年内生存率显著更低。另外,多因素分析还表明,肿瘤直径>5cm、TNM 分期Ⅲ期也均与 TNBC 预后 1 年内死亡相关。分析原因可能是,高级别临床分期及大肿瘤体积的患者,病情进展及肿瘤恶化程度更为严重,更易出现局部浸润或合并远处转移,故预后死亡风险也更高^[20]。

综上所述,在 TNBC 患者癌组织中, *lncRNA AFAP1-AS1* mRNA 表达显著升高,而 *METTL14* mRNA 则明显下降,且二者异常表达与更短的生存期及更高死亡风险相关,均有望成为 TNBC 患者预后评估的潜在生物学指标。但本研究存在样本小、随访时长短等不足,这可能导致试验数据偏倚,故后续需扩大试验规模,进一步完善研究设计,以获取更精准结论。

参考文献:

[1] MERRILL N M, LACHACZ E J, VANDECAN N M, et al. Molecular determinants of drug response in TNBC cell lines[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 179(2):337-347.

[2] FABBRI F, SALVI S, BRAVACCINI S. Know your enemy: Genetics, aging, exposomic and inflammation in the war against triple negative breast cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60:285-293.

[3] RODRIGUES DE BASTOS D, NAGAI M A. In silico analyses identify lncRNAs: WDFY3-AS2, BDNF-AS and AFAP1-AS1 as potential prognostic factors for patients with triple-negative breast tumors[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5):e0232284.

[4] XI Y X, SHI J J, LI W Q, et al. Histone modification profiling in breast cancer cell lines highlights commonalities and differences among subtypes [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):150.

[5] 胡桂女,王超群,赵梁英,等. 乳腺癌中甲基转移酶样 14 蛋白表达及其临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(10):1789-1789.

[6] 国家卫生健康委员会医政医管局. 乳腺癌诊疗指南(2022 年版)[J]. *中华肿瘤杂志*, 2023, 45(10):803-833.

[7] GOUGIS P, CARTON M, TCHOKOTHE C, et al. Ciné Breast-factors influencing the time to first metastatic recurrence in breast cancer: analysis of real-life data from the French ESME MBC database[J]. *Breast*, 2020, 49:17-24.

[8] PENG W, WU J Z, FAN H, et al. LncRNA EGOT pro-

motes tumorigenesis via hedgehog pathway in gastric cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2019, 25(3):883-887.

[9] LV P W, QIU X G, GU Y T, et al. Long non-coding RNA SNHG6 enhances cell proliferation, migration and invasion by regulating miR-26a-5p/MAPK6 in breast cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110:294-301.

[10] 李志明, 龙凤, 何建新, 等. 长链非编码 RNA AFAP1-AS1 在癌症中作用及其机制的研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(4):350-360.

[11] ZHANG X H, ZHOU Y D, MAO F, et al. lncRNA AFAP1-AS1 promotes triple negative breast cancer cell proliferation and invasion via targeting miR-145 to regulate MTH1 expression[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):7662.

[12] ZHANG X H, LI F Y, ZHOU Y D, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 promotes tumor progression and invasion by regulating the miR-2110/Sp1 axis in triple-negative breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7):627.

[13] 钱晓芬,曾平,刘金富,等. m6A RNA 甲基化修饰相关酶的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(5):1073-1084.

[14] WU H, JIAO Y L, GUO X Y, et al. METTL14/miR-29c-3p axis drives aerobic glycolysis to promote triple-negative breast cancer progression through TRIM9-mediated PKM2 ubiquitination[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(3):e18112.

[15] DONG X F, WANG Y, HUANG B F, et al. Downregulated METTL14 expression correlates with breast cancer tumor grade and molecular classification[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:8823270.

[16] ALASAR A A, SAĞLAM B, VATANSEVER İE, et al. Expression patterns of m6A RNA methylation regulators under apoptotic conditions in various human cancer cell lines[J]. *Turk J Biol*, 2023, 48(1):24-34.

[17] GONG P J, SHAO Y C, YANG Y, et al. Analysis of N6-methyladenosine methyltransferase reveals METTL14 and ZC3H13 as tumor suppressor genes in breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:578963.

[18] ZHANG X, WANG L, QU Y. Targeting the β -catenin signaling for cancer therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160:104794.

[19] SHI Y, ZHENG C L, JIN Y, et al. Reduced expression of *METTL3* promotes metastasis of triple-negative breast cancer by m6A methylation-mediated *COL3A1* up-regulation[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:1126.

[20] 王雅娟,王媛,任新瑜. 三阴性乳腺癌患者 CD117、DOG1 表达水平与临床病理特征及预后的相关性[J]. *协和医学杂志*, 2024, 15(3):616-623.

收稿日期:2024-11-06;修回日期:2025-01-23

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:唐燕燕,童鑫.炎症调节因子对子宫内膜异位症风险的影响:一项孟德尔随机化研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):306-312.

【论著与临床报道】

炎症调节因子对子宫内膜异位症风险的影响: 一项孟德尔随机化研究

唐燕燕¹, 童鑫²

(1. 江苏省中医院药学部, 江苏 南京 210029;
2. 南京医科大学附属妇产医院, 江苏省南京市妇幼保健院药学部, 江苏 南京 210004)

摘要:目的 基于大规模人群的全基因组关联研究(GWAS),应用孟德尔随机化(MR)方法分析探讨炎症调节因子与子宫内膜异位症是否存在因果关系。方法 采用 GWAS 作为双样本孟德尔随机化的基础,以测试 41 种炎症调节因子与子宫内膜异位症的因果关系。采用逆方差加权(IVW)、MR-Egger、加权中位数(WM)、简单模型和加权模型进行 MR 分析。以优势比(OR)评估因果关联,采用留一法鉴定单核苷酸多态性(SNPs)、MR-Egger 截距测试和 MR-PRESSO 全局检验来检测水平多效性、MR-Steiger 检测方向性、Cochran Q 检测异质性。利用 GEO 数据库查询与疾病相关的数据集,进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)进行验证。结果 课题组对 FinnGen 数据库中 41 种炎症调节因子进行的双样本 MR 分析表明,基因预测的 IL-9 与子宫内膜异位症的风险呈正因果关系(IVW: $OR = 1.15$, 95% $CI: 1.01 \sim 1.30$, $P = 0.03$),基因预测的 MCSF 与子宫内膜异位症的风险呈负因果关系(IVW: $OR = 0.92$, 95% $CI: 0.85 \sim 0.99$, $P = 0.024$)。此外,留一法敏感性分析结果稳定,MR-Egger 截距测试和 MR-PRESSO 全局检验无水平多效性,MR-Steiger 检测无反向性,Cochran Q 检验不存在异质性。通过对 GSE141549 数据集中的模块与临床性状关联性分析发现,MCSF 基因在 Brown 模块与患者子宫内膜样本呈负相关关系,IL-8 基因在 Purple 模块与肠道子宫内膜异位症呈正相关关系,此结果与孟德尔随机化研究结果一致。结论 IL-9、MCSF 等因子与子宫内膜异位症之间存在因果关系,这些炎症调节因子可能是子宫内膜异位症重要的治疗靶点。

关键词:孟德尔随机化分析;子宫内膜异位症;炎症因子;GWAS 数据库

中图分类号:R711.71 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2025)02-0306-07
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.018

The impact of inflammatory regulators on the risk of endometriosis: a Mendelian randomization study

TANG Yanyan¹, TONG Xin²

(1. Department of Pharmacy, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Department of Pharmacy, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Women and Children's Healthcare Hospital, Nanjing 210004, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether there is a causal relationship between inflammatory regulators and endometriosis using Mendelian randomization (MR) methods based on genome-wide association studies (GWAS) of large-scale populations. **Methods** GWAS was used as the basis for two-sample Mendelian randomization to test the causal relationship between 41 inflammatory regulators and endometriosis. MR analy-

基金项目:南京药学会—常州四药医院药学科研基金(2023YX020)

第一作者:唐燕燕,主管中药师,研究方向:中药化学研究,E-mail:13951679396@139.com

通讯作者:童鑫,硕士,副主任中药师,研究方向:中药化学研究,E-mail:toxin1984@139.com

sis was performed using inverse variance weighted (IVW), MR-Egger, weighted median (WM), simple model, and weighted model. Causal associations were assessed using odds ratios (OR). Leave-one-out method was used to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), MR-Egger intercept test and MR-PRESSO global test were used to detect horizontal pleiotropy, MR-Steiger test was used for directionality detection, and Cochran Q test was used for heterogeneity detection. The GEO database was used to query disease-related datasets, and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was performed for verification. **Results** The two-sample MR analysis of 41 inflammatory regulators from the FinnGen database showed a positive causal relationship between genetically predicted IL-9 and the risk of endometriosis (IVW: $OR = 1.15$, 95% $CI : 1.01$ to 1.30 , $P = 0.03$), and a negative causal relationship between genetically predicted MCSF and the risk of endometriosis (IVW: $OR = 0.92$, 95% $CI : 0.85$ to 0.99 , $P = 0.024$). Additionally, leave-one-out sensitivity analysis results were stable, and there was no horizontal pleiotropy detected by MR-Egger intercept tests and MR-PRESSO global tests, no reverse directionality was detected by MR-Steiger, and no heterogeneity was detected by Cochran Q tests. Analysis of module-clinical trait associations in the GSE141549 dataset revealed that the MCSF gene was negatively correlated with endometrial samples in the Brown module, and the IL-8 gene was positively correlated with intestinal endometriosis in the Purple module, consistent with the results of the Mendelian randomization study. **Conclusion** There is a causal relationship between factors such as IL-9 and MCSF and endometriosis, and these inflammatory regulators may be important therapeutic targets for endometriosis.

Key words: Mendelian randomization analysis; endometriosis; inflammatory factors; GWAS database

流行病学数据显示,子宫内膜异位症在全球育龄女性中的患病数已达 2 亿^[1]。子宫内膜异位症患者经常有痛经、性交困难和心理健康问题,对该人群的生活质量产生了负面影响^[2]。据统计,子宫内膜异位症发病率,亚洲人群高于欧洲人群,占有女性的 15%^[3-4]。本病因复杂、发病机制不明,诊断滞后。因此,探讨子宫内膜异位症的病因尤为重要^[5]。目前主流观点认为子宫内膜异位症是一种炎症性疾病,而异位的子宫内膜碎片可能是致病原因。有证据支持正是慢性炎症促进了子宫内膜异位症的发展^[6]。多种生长因子、前列腺素、趋化因子和炎症调节因子在子宫内膜异位症的启动、维持和进展中发挥关键作用^[7-8]。炎症调节因子作为控制炎症的小分子蛋白,可能是治疗女性生殖相关疾病的关键靶点^[9]。为了推断暴露和结果之间的因果关系,孟德尔随机化(MR)是一种有效的策略,它使用与暴露密切相关的遗传变异作为工具变量(IVs)。鉴于其强有力的证据基础,MR 可以看作是自然的随机对照试验(RCT)^[10]。因此,MR 已成为解决人类生物学和流行病学相关问题的有效方法之一。在本研究中,MR 分析利用了来自芬兰数据库(FinnGen 联盟)的 GWAS 总结级数据来调查炎症调节因子和子宫内膜异位症之间的潜在因果关系。

1 材料和方法

1.1 孟德尔随机化的研究设计 通过两样本 MR 方法探究炎症调节因子与子宫内膜异位症间的因果联系,暴露因素为炎症调节因子,工具变量为单核苷酸多

态性(SNP),结局变量为子宫内膜异位症。与实验研究相比,MR 分析的主要优点是避免了反向因果关系,减少了其他混杂因素的影响。MR 分析中,为了得到有效的结果,必须满足 3 个核心假设^[11]:①遗传变异与暴露密切相关;②遗传变异与暴露和结局的混杂因素无关;③遗传变异不会通过暴露以外的途径影响结果(见图 1)。首先,课题组在本研究中评估了 41 个炎症调节因子作为可能的暴露因素^[12],使用与这些调节因子密切相关的 SNPs 作为工具变量。与此同时,将子宫内膜异位症作为本研究中的因变量,进行 MR 分析。通过敏感性分析,评估异质性和多效性,以确保本研究发现的稳健性(见图 2)。由于 GWAS 的炎症调节因子和子宫内膜异位症的汇总数据均来源已发表的研究,因此不需要进一步的伦理批准。可以通过 GWAS 目录服务(<https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>)访问完整的 GWAS 摘要统计信息。

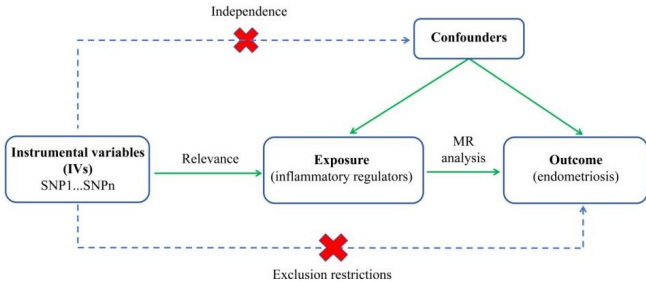


图 1 孟德尔研究的 3 个假设

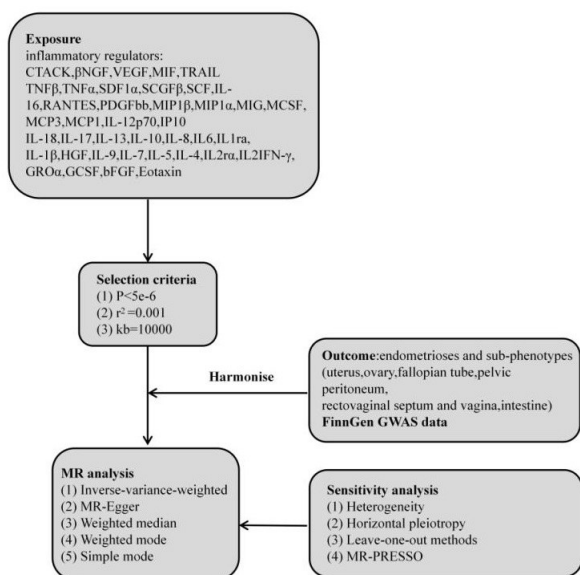


图 2 孟德尔分析流程图

1.2 数据来源 细胞因子包括生长因子、免疫调节因子、趋化因子、凋亡因子和炎症调节因子,已知炎症调节因子与自身免疫和代谢紊乱有关,而且是炎症疾病的关键中间表型^[13]。课题组首先从 8 293 个个体中收集循环细胞因子的数据,总共包括 41 个炎症调节因子:CTACK、 β NGF、VEGF、MIF、TRAIL、TNF β 、TNF α 、SDF1 α 、SCGF β 、SCF、IL-16、RANTES、PDGF-bb、MIP1 β 、MIP1 α 、MIG、MCSF、MCP3、MCP1、IL-12p70、IP10、IL-18、IL-17、IL-13、IL-10、IL-8、IL-6、IL1ra、IL-1 β 、HGF、IL-9、IL-7、IL-5、IL-4、IL2 α 、IL-2、IFN- γ 、GRO α 、GCSF、bFGF、Eotaxin^[12]。基于 GWAS 的汇总数据,课题组选择每个炎症调节因子作为工具因子。与此同时,为了评估炎症调节因子和子宫内膜异位症之间的因果关系,课题组进行了两样本 MR 分析。FinnGen 是芬兰一个大规模的公私合作计划,旨在促进人口健康和识别各种疾病病因^[14]。FinnGen 数据集拥有高质量的表型和基因型数据,为本研究提供了坚实的基础。课题组建立了几种子宫内膜异位症亚表型与风险之间的因果关系,包括卵巢、肠道、盆腔腹膜、输卵管、子宫、直肠阴道间隔和阴道。课题组使用 R 4.3.1 中的 TwoSampleMR 包(v0.5.6)系统地分析了来自 FinnGen 队列(<https://MRcieu.github.io/TwoSampleMR/index.html>)的子宫内膜异位症 GWAS 汇总水平数据^[15]。GWAS 的 ID 为“fnn-b-N14-ENDOMETRIOSIS”,均来自国际基因组学研究所(IEU)OpenGWAS 数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>)^[16]。在 FinnGen GWAS 汇总统计中,有 8 288 例子宫内膜异位症和 68 969 例对照。此外,从 FinnGen 队列中获取了各种子宫内膜异位症亚表型(68 969 例对照)的总结水平 GWAS 数据,包括:

子宫(2 372 例)、卵巢(3 231 例)、输卵管(116 例)、盆腔腹膜(2 953 例)、直肠阴道间隔和阴道(1 360 例)和肠(177 例)。

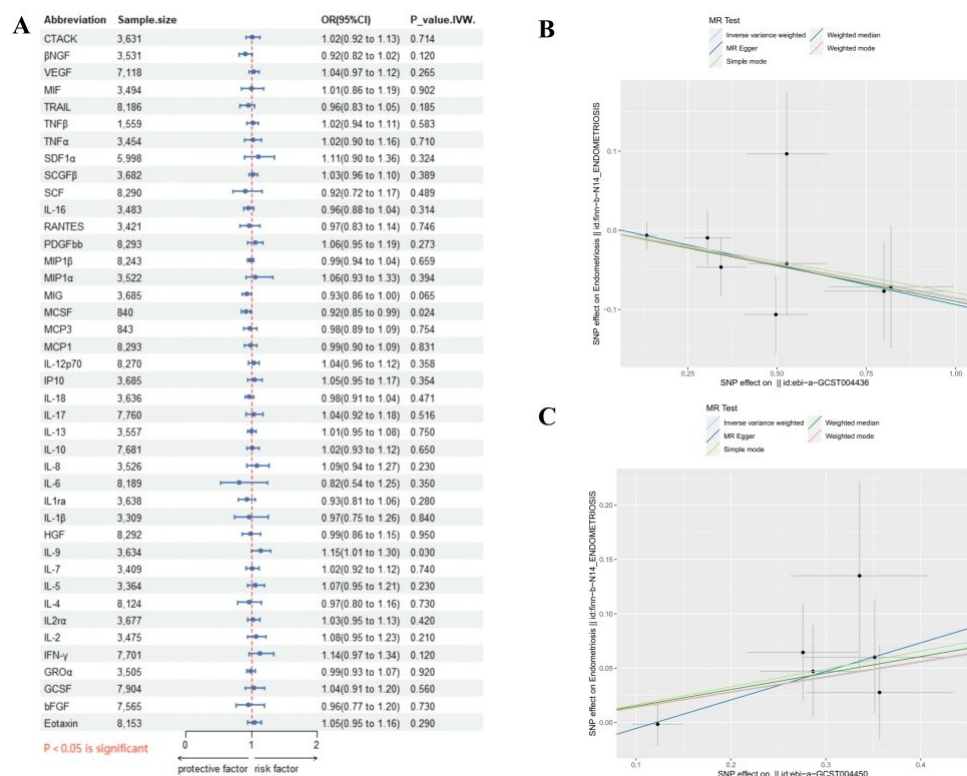
1.3 工具变量(IVs)的选择 课题组采用以下标准选择 SNPs 作为有效的工具变量:①选择与系统性炎症调节因子($P < 5e-06$)相关的 SNPs,确保它们在 10 000 kb 的总距离($r^2 < 0.001$)内是独立的;②与子宫内膜异位症密切相关的 SNPs($P < 5e-06$)被排除在分析之外;③从暴露和结果数据集中删除回文 SNPs,以防止等位基因影响炎症调节因子和子宫内膜异位症之间的关联;④MR-PRESSO 检验确定为潜在异常值或发挥水平多效性的 SNPs 被排除,并估计矫正后的结果,以确保分析的稳定性。

1.4 统计学分析 分析采用逆方差加权(IVW)方法来估计每个 SNP 的累积因果效应, $P < 0.05$ 则确定其差异有统计学意义。同时,采用 MR-Egger 检验、加权中位数检验、简单模式和加权模式作为补充方法^[17]。此外,课题组进行了留一分析,并使用 MR-PRESSO 分析作为失真检验,以确定 MR 分析中潜在的异常值^[18],使用 MR-Steiger 方向性检验排除反向因果关系。

1.5 加权基因共表达网络验证分析 本研究以 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库为基础,以“endometriosis”和“Homo sapiens”为关键词进行检索,下载与子宫内膜异位症相关的表达矩阵。根据如下标准:①子宫内膜异位症和正常对照的人群样本;②数据集类型为 gene 类型;③样本含量 ≥ 15 ,对相关矩阵进行筛选最终获得 GSE141549 数据集。利用 R 软件读取原始的基因表达数据,并进行基因探针转换、数据归一化等预处理。利用 R 软件的 WGCNA 程序包对 DEGs 和 GSE141549 数据集分别构建不同样本的重要基因模块,并筛选出与子宫内膜异位症各种亚型关联最大的基因模块作为靶标进行后续分析。

2 结果

2.1 炎症调节因子对子宫内膜异位症的因果影响 结果表明,基因预测的巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)与子宫内膜异位症的风险呈负相关的因果关系(IVW: $OR = 0.92$, 95% $CI : 0.85 \sim 0.99$, $P = 0.024$)。此外,研究结果显示,基因预测的白细胞介素-9(IL-9)与子宫内膜异位症的风险之间存在正相关的因果关系(IVW: $OR = 1.15$, 95% $CI : 1.01 \sim 1.30$, $P = 0.030$)。在初步分析中,Cochran Q 检验或 MR-Egger 截距分析均未检测到异质性或水平多效性($P > 0.05$),见图 3。



注:A 为炎症调节因子与子宫内膜异位症关系的森林图;B 为 MCSF 与子宫内膜异位症的因果关系散点图;C 为 IL-9 与子宫内膜异位症的因果关系散点图。

图 3 炎症调节因子与子宫内膜异位症因果关系的森林图与散点图

2.2 炎症调节因子对子宫内膜异位症不同亚表型的因果效应 结果显示了几种炎症调节因子与基因预测的子宫内膜异位症亚表型之间的联系: ① MIF、SDF1α、IL-12p70 和 IL-8 与肠道子宫内膜异位症的风险呈正相关(IVW: OR = 2.18, 95% CI : 1.08~4.39, P = 0.02; IVW: OR = 3.97, 95% CI : 1.32~11.89, P = 0.01; IVW: OR = 1.65, 95% CI : 1.02~2.64, P = 0.03; IVW: OR = 2.75, 95% CI : 1.00~7.58, P = 0.04); GCSF 与肠道子宫内膜异位症的风险呈负相

关(IVW: OR = 0.30, 95% CI : 0.11~0.83, P = 0.02)。② IL-9 与盆腔腹膜子宫内膜异位症的风险呈正相关(IVW: OR = 1.22, 95% CI : 1.00~1.48, P = 0.04)。③ SDF1α 与直肠阴道隔子宫内膜异位症的风险呈正相关(IVW: OR = 1.71, 95% CI : 1.04~2.81, P = 0.03); MIG 与直肠阴道隔子宫内膜异位症的风险呈负相关(IVW: OR = 0.80, 95% CI : 0.68~0.95, P = 0.01)。见图 4。

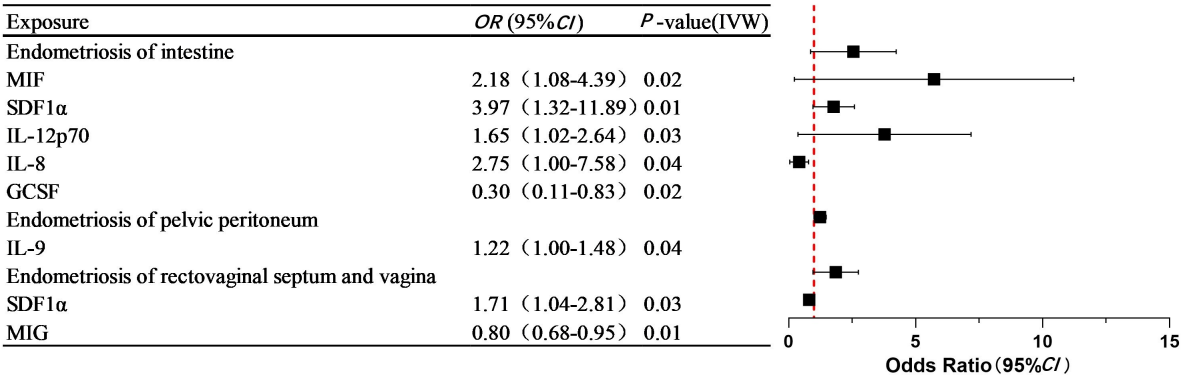


图 4 炎症调节因子与子宫内膜异位症亚表型关系的森林图

2.3 敏感度分析 Cochran Q 检验结果显示 SNP 之间没有显著的异质性。MR-Egger 截距试验表明,水平多效性并不影响 MR 分析的结果。MR-PRESSO 的分析结果可以加强阳性结果的稳健性;MR-Steiger 方

向性检验表明,本研究不存在反向性。此外,留一敏感性分析没有发现任何驱动因果关联信号的单一 SNP。

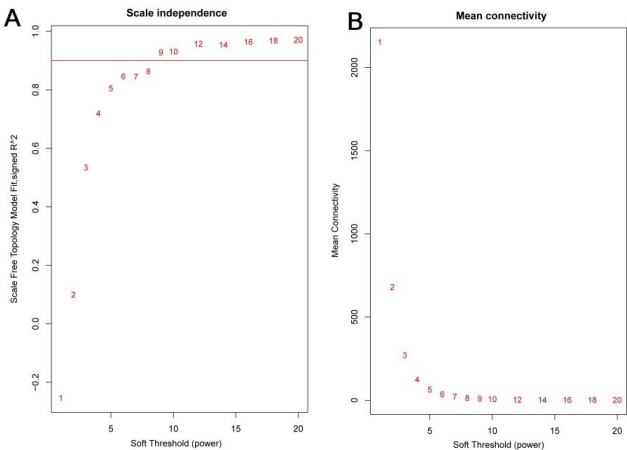
2.4 加权基因共表达网络验证分析

2.4.1 样本聚类分析 基于 WGCNA 方法,对 GSE141549 数据集中 331 个 DEGs 进行共表达网络构建,并基于 R 语言中的 hclust 函数对数据集分别进行聚类分析,未发现存在离群样本。

2.4.2 确定软阈值 对纳入研究的 331 个 DEGs 进行每对基因之间的 Pearson 相关系数计算,设置拟合指数 $R^2=0.90$,选择合适的软阈值 β ,使构建的网络满足无尺度分布假设。结果显示当 β 为 8 时, $R^2=0.90$ 达到水平,见图 5。

2.4.3 网络构建与模块划分 对 GSE141549 数据集中 331 个 DEGs 进行网络模块构建,以 8 为软阈值 β ,通过计算模块间的差异,构建基因模块树状图,最终得到 27 个模块。模块树状图中不同颜色矩形代表不同的基因模块,树状图的每一条分支对应于各个基因模块,每一片叶子代表一个基因,见图 6A。

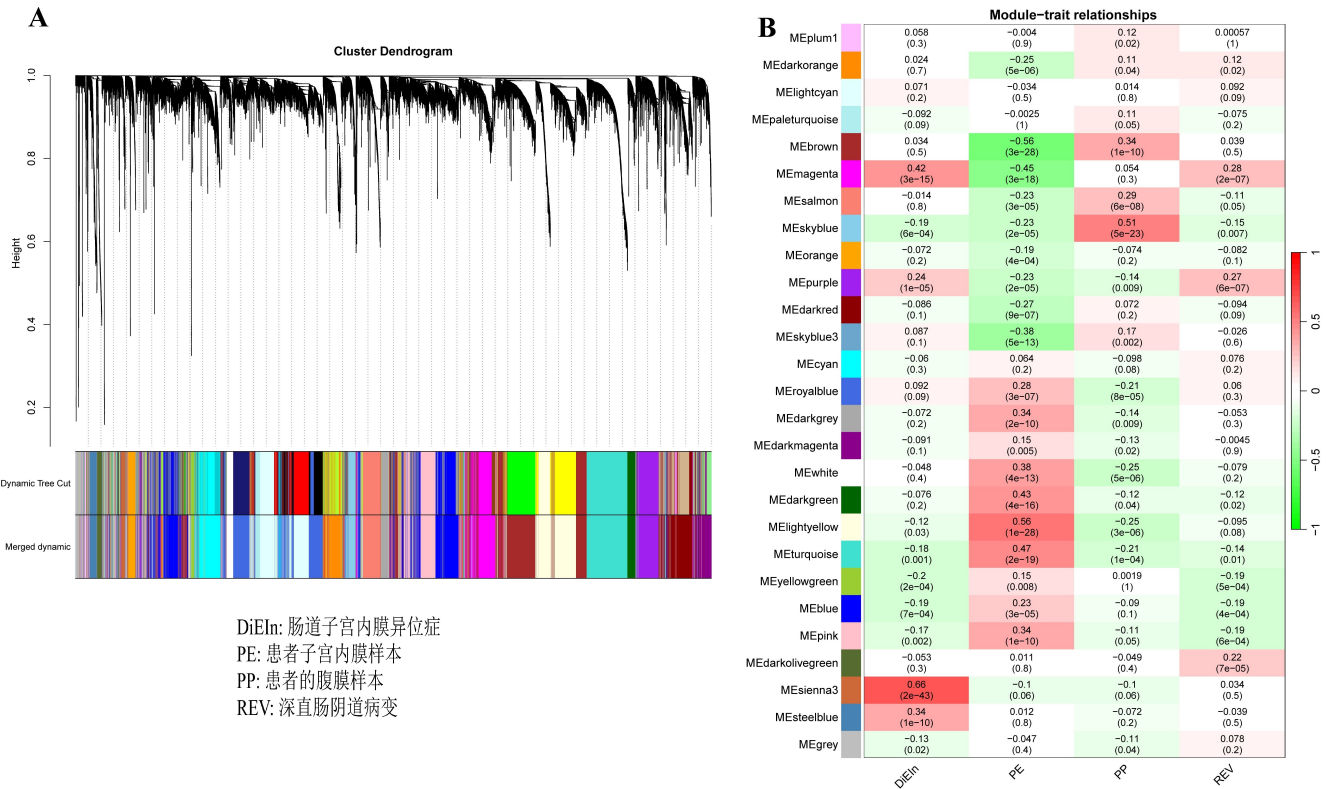
2.4.4 识别与临床性状相关的关键模块 对数据集 GSE141549 进行模块与表型性状关联分析,计算模块



注:A 为 Scale independence;B 为 Mean connectivity。

图 5 不同软阈值下的网络拓扑结构

特征值与某一性状的相关系数,筛选与性状关联度最高的模块。本研究中最为关注的临床性状为子宫内膜异位症,通过对 GSE141549 数据集中的模块与临床性状关联性分析可以得到图 6B,其中 MCSF 基因在 Brown 模块与患者子宫内膜样本呈负相关关系,IL-8 基因在 Purple 模块与肠道子宫内膜异位症(DiEn)呈正相关关系,此结果与孟德尔随机化研究结果一致。



注:A 为模块树状图;B 为模块与性状关联性分析。

图 6 模块树图与关联图

3 讨论

子宫内膜异位症是一种病因不明的复杂疾病,关

于该病的致病原因有几种理论。根据植入理论,月经期间子宫内膜组织通过输卵管进入腹腔植入^[19]。正

常月经涉及子宫内膜细胞、中性粒细胞和巨噬细胞之间的炎症过程^[20]。因此,子宫内膜异位症很可能与局部免疫和炎症过程的变化有关^[21-23]。根据课题组的研究结果,基因预测的 IL-9 与子宫内膜异位症的风险呈正因果关系,可见监测诊断为盆腔腹膜子宫内膜异位症的患者 IL-9 血浆水平很有必要。然而,子宫内膜异位症的风险与基因预测的 MCSF 呈负因果关系。此外,MR 研究还证实了炎症调节因子与几种子宫内膜异位症亚表型之间的因果关系:肠道子宫内膜异位症的风险与 MIF、SDF1 α 、IL-12p70 和 IL-8 之间存在正因果关系;GCSF 与阴道和直肠阴道隔子宫内膜异位症的风险呈正相关;GCSF 与肠道子宫内膜异位症的风险呈负因果关系;MIG 与阴道和直肠阴道隔子宫内膜异位症的风险呈负因果关系。然而,还有许多炎症调节因子显示与子宫内膜异位症的风险没有显著的因果关系。例如,NGF、VEGF、TNF、IL-6 和 IL-10 的 IVW 值均未达到显著性水平。这些结果表明,这些因素可能在子宫内膜异位症的发生和发展中没有发挥主要作用,或者它们的作用可能通过其他复杂的途径和机制来实现。

有研究发现妊娠患者中干细胞相关的促炎免疫介质和生长因子(如 GCSF、IL-6、IL-9、MCP-1、MCSF、MIG 和 SDF-1 α)的表达轻度增加。这一观察结果并不一定表明有活动性炎症,而是提示了一种以增殖活性增强为特征的促炎表型,这些因素在评估子宫内膜参数中具有重要作用^[24-25]。IL-9、MCSF 和 GCSF 是血液生长因子。IL-9 由辅助型 T 细胞 2 产生,在各种过敏反应和炎症过程中发挥作用,它们促进 b 细胞产生 IgE,并有助于肥大细胞的增殖和成熟。IL-8 是一种众所周知的循环和介导全身炎症反应的炎症调节因子^[26]。IL-8 在各种组织中释放以响应损伤和炎症,吸引中性粒细胞,并促进血管生成。大量研究表明,子宫内膜异位症与腹膜内的炎性改变有关^[27-28]。

MCSF 是主要的巨噬细胞生长因子,造血干细胞被 MCSF 刺激发展成巨噬细胞。研究结果表明,MCSF 直接影响子宫内膜细胞的增殖及其与腹膜间皮细胞的附着^[29-30]。虽然 MCSF 浓度升高与子宫内膜异位症之间的确切关系尚未确定,但研究结果表明,这两者之间存在密切关系。细胞因子 GCSF 和 MCSF 可能促进子宫内膜的生长和成熟,这也是受精卵成功着床的必要条件^[30-32]。尽管确定了子宫内膜异位症的几个危险因素,但该病的病理生理学原因至今尚不明确。因此,子宫内膜异位症的治疗选择仍然存在争议^[33-34]。即使采用了 FinnGen 队列,也需要独立确认这些因果关系。本研究也存在一些局限:①由于亚洲人群数据较少,该研究最终只选用芬兰数据开展分析,

欧洲人群与亚洲人群存在一定差异,无法将结论推广至其他种族人群;②本研究虽然确定了多种炎症调节因子与子宫内膜异位症以及亚型之间存在因果关联,然而考虑到这种疾病的潜在病理生理学原因,还需要进一步开展相关实验进行验证,以更深入地了解这些炎症调节因子在子宫内膜异位症发病机制中的分子过程和功能。

参考文献:

- [1] ELLIS K, MUNRO D, CLARKE J. Endometriosis is undervalued; a call to action [J]. *Front Glob Womens Health*, 2022, 3:902371.
- [2] GIUDICE L C. Endometriosis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362:2389-2398.
- [3] KVASKOFF M, MU F, TERRY K L, et al. Endometriosis: a high-risk population for major chronic diseases? [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(4):500-516.
- [4] YAMAMOTO A, JOHNSTONE E B, BLOOM M S, et al. A higher prevalence of endometriosis among Asian women does not contribute to poorer IVF outcomes [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(6):765-774.
- [5] PARAZZINI F, ESOSTIO G, TOZZI L, et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2017, 209:3-7.
- [6] PROTIC O, TOTI P, ISLAM M S, et al. Possible involvement of inflammatory/repairative processes in the development of uterine fibroids [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 364(2):415-427.
- [7] JING X X, LI C, SUN J T, et al. Systemic inflammatory response markers associated with infertility and endometrioma or uterine leiomyoma in endometriosis [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2020, 16:403-412.
- [8] MCKINNON B D, BERTSCHI D, BERSINGER N A, et al. Inflammation and nerve fiber interaction in endometriotic pain [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(1):1-10.
- [9] FOLKERSEN L, GUSTAFSSON S, WANG Q, et al. Genomic and drug target evaluation of 90 cardiovascular proteins in 30,931 individuals [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(10):1135-1148.
- [10] LIANG Y, ZENG W H, HOU T, et al. Gut microbiome and reproductive endocrine diseases: a Mendelian randomization study [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:1164186.
- [11] DAVIES N M, HOLMES M V, DAVEY SMITH G. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians [J]. *BMJ*, 2018, 362:k601.
- [12] AHOLA-OLLI A V, WÜRTZ P, HAVULINNA A S, et al. Genome-wide association study identifies 27 loci influencing concentrations of circulating cytokines and growth

factors[J]. *Am J Hum Genet*,2017,100(1):40-50.

[13] AKDIS M,BURGLER S,CRAMERI R,et al. Interleukins,from 1 to 37,and interferon- γ ;receptors,functions,and roles in diseases[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2011,127(3):701-721. e1-70.

[14] SUN B B,KURKI M I,FOLEY C N,et al. Genetic associations of protein-coding variants in human disease[J]. *Nature*,2022,603(7899):95-102.

[15] SKRIVANKOVA V W,RICHMOND R C,WOOLF B A R,et al. Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology using mendelian randomisation (STROBE-MR): explanation and elaboration[J]. *BMJ*,2021,375:n2233.

[16] ELSWORTH B,LYON M,ALEXANDER T,et al. The MRC IEU OpenGWAS data infrastructure[J]. Cold Spring Harbor Laboratory,2020. DOI: 10. 1101/2020. 08. 10. 244293.

[17] LARSSON S C,SCOTT R A,TRAYLOR M,et al. Type 2 diabetes, glucose, insulin, BMI, and ischemic stroke subtypes:mendelian randomization study[J]. *Neurology*,2017,89(5):454-460.

[18] HEMANI G,TILLING K,DAVEY SMITH G. Orienting the causal relationship between imprecisely measured traits using GWAS summary data[J]. *PLoS Genet*,2017,13(11):e1007081.

[19] VINATIER D,ORAZI G,COSSON M,et al. Theories of endometriosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*,2001,96(1):21-34.

[20] EVANS J,SALAMONSEN L A. Inflammation, leukocytes and menstruation[J]. *Rev Endocr Metab Disord*,2012,13(4):277-288.

[21] BEDAIWY MA,FALCONE T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. clinicopathological implications [J]. *Minerva Ginecol*,2003,55(4):333-345.

[22] GAZVANI R,TEMPLETON A. Peritoneal environment,cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis[J]. *Reproduction*,2002,123(2):217-226.

[23] WITZ C A. Pathogenesis of endometriosis[J]. *Gynecol Obstet Invest*,2002,53(Suppl 1):52-62.

[24] GRANOT I,GNAINSKY Y,DEKEL N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome[J]. *Reproduction*,2012,144(6):661-668.

[25] JIN X H,LI Y,LI D. Intrauterine interventions for women with two or more implantation failures;a systematic review and network meta-analysis [J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*,2022,13:959121.

[26] ZHOU J X,TONG J,RU X,et al. Placental inflammatory cytokines mRNA expression and preschool children's cognitive performance;a birth cohort study in China[J]. *BMC Med*,2023,21(1):449.

[27] HSIAO K Y,CHANG N,LIN S C,et al. Inhibition of dual specificity phosphatase-2 by hypoxia promotes interleukin-8-mediated angiogenesis in endometriosis[J]. *Hum Reprod*,2014,29(12):2747-2755.

[28] KASHANIAN M,SARIRI E,VAHDAT M,et al. A comparison between serum levels of interleukin-6 and CA125 in patients with endometriosis and normal women[J]. *Med J Islam Repub Iran*,2015,29:280.

[29] ALIGETI S,KIRMA N B,BINKLEY P A,et al. Colony-stimulating factor-1 exert direct effects on the proliferation and invasiveness of endometrial epithelial cells[J]. *Fertil Steril*,2011,95(8):2464-2466.

[30] BUDRYS N M,NAIR H B,LIU Y G,et al. Increased expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in patients with endometriosis[J]. *Fertil Steril*,2012,97(5):1129-1135. e1.

[31] ROCHA M N C,FLORENCIO R S,ALVES R R F. The role played by granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on women submitted to in vitro fertilization associated with thin endometrium;systematic review[J]. *JBRA Assist Reprod*,2020,24(3):278-282.

[32] JINDAL P C,SINGH R,SINGH M. O-026 RCT of INTRA-Uterine administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) before embryo-transfer in resistant thin endometrium in IVF-ICSI cycles[J]. *Hum Reprod*,2022,37(Supplement-1):deac104. 026.

[33] WANG Y,NICHÓLES K,SHIH I M. The origin and pathogenesis of endometriosis [J]. *Annu Rev Pathol*,2020,15:71-95.

[34] SAUNDERS P T K,HORNE A W. Endometriosis:etiology,pathobiology, and therapeutic prospects [J]. *Cell*,2021,184(11):2807-2824.

收稿日期:2024-09-18;修回日期:2024-12-27

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:夏亚楠,金锐,耿亚,等. 1 例免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退的个案报道并文献分析[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 313-318.

【论著与临床报道】

1 例免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退的个案报道并文献分析

夏亚楠^{1,2}, 金锐¹, 耿亚², 赵宁¹

(1. 中国中医科学院西苑医院药学部, 北京 100091;
2. 漯河医学高等专科学校第二附属医院药学部, 河南 漯河 462300)

摘要:目的 分析免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退引起心肌酶升高的临床特点, 为临床安全用药提供参考。方法 梳理临床药师参与的 1 例特瑞普利单抗致甲状腺功能减退引起心肌酶升高的治疗过程, 并采用计算机检索中国知网、万方、维普、PubMed、ScienceDirect 数据库(截至 2024 年 5 月), 收集关于免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退症的个案报道, 对纳入病例的临床资料、用药情况、不良反应的临床表现、发生时间、处置及转归等进行统计分析。结果 纳入免疫检查点抑制剂致甲状腺功能减退的个案报道 67 篇, 共计 81 例患者, 其中男性 56 例, 女性 25 例; 年龄 31~85 岁, 平均年龄为 (62.64 ± 11.18) 岁, 经对症治疗后, 79 例患者好转, 1 例患者未用药, 转归情况不明, 1 例患者死亡。结论 应提高对临床使用免疫检查点抑制剂时相关不良反应的关注, 保证临床用药安全。

关键词: 特瑞普利单抗; 免疫检查点抑制剂; 甲状腺功能减退症; 心肌酶; 文献分析

中图分类号: R979.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2025)02-0313-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.019

A case report of hypothyroidism induced by immune checkpoint inhibitors with literature analysis

XIA Yanan^{1,2}, JIN Rui¹, GENG Ya², ZHAO Ning¹

(1. Department of Pharmacy, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462300, Henan, China)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical characteristics of myocardial enzyme elevation induced by hypothyroidism caused by immune checkpoint inhibitors (ICIs) and to provide a reference for safe clinical medication. **Methods** The treatment process of a case of myocardial enzyme elevation secondary to hypothyroidism caused by Toripalimab, with the participation of clinical pharmacists, was reviewed. Computer-based searches were conducted in databases including CNKI, Wanfang, VIP, PubMed, and ScienceDirect (up to May 2024) to collect case reports of hypothyroidism induced by ICIs. The clinical data, medication situation, clinical manifestations of adverse reactions, occurrence time, management, and outcomes of the included cases were statistically analyzed. **Results** A total of 67 case reports of hypothyroidism induced by ICIs were included, involving 81 patients. Among them, 56 were male and 25 were female, aged 31 to 85 years, with a mean age of (62.64 ± 11.18) years. After symptomatic treatment, 79 patients showed improvement, 1 patient did not receive medication with an unclear outcome, and 1 patient died. **Conclusion** Attention should be paid to the relevant adverse reactions during the clinical use of ICIs to ensure safe clinical medication.

Key words: Toripalimab; immune checkpoint inhibitors; hypothyroidism; myocardial enzymes; literature analysis

基金项目: 中国中医科学院西苑医院中医药临床科研一体化平台建设专项(XYZX0404-17)

第一作者: 夏亚楠, 主管中药师, 研究方向: 临床药学, E-mail: 1039870028@qq.com

通讯作者: 赵宁, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, E-mail: zhaoning0606@126.com

免疫检查点 (immune checkpoint) 是一类免疫抑制性分子, 由于其表达于免疫细胞上, 故可抑制免疫细胞功能, 使机体无法产生有效的抗肿瘤免疫应答。免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 主要通过阻断免疫检查点通路, 重新激活 T 细胞介导的抗肿瘤免疫, 逆转免疫逃逸现象, 从而促进肿瘤细胞死亡^[1]。ICIs 已成为肿瘤治疗领域最具前景的疗法之一, 但其在抗肿瘤的同时也会产生某些严重的、偏离目标的免疫和炎症反应, 即免疫相关不良反应 (immune-related adverse events, irAEs)。常见的内分泌系统 irAEs 是甲状腺毒性, 且出现时间较其他毒性较晚, 通常发生在治疗的早期, 中位发病时间大多发生在首次用药后 6 周左右^[2]。目前 ICIs 致甲状腺功能减退的案例报道较多, 少见 ICIs 致心肌酶升高的案例报道, 笔者对 1 例 ICIs-特瑞普利单抗治疗腮腺鳞癌致甲状腺功能减退进而引起心肌酶升高的病例进行分析, 并针对国内已上市 ICIs 致甲状腺功能减退的个案报道进行归纳整理, 总结分析 ICIs 致甲状腺功能减退的特点, 以期为临床用药安全提供参考。现报道如下:

1 临床资料

1.1 病例资料 患者男, 35 岁, 身高 182 cm, 体重 88 kg, 以腮腺鳞癌伴颈部淋巴结转移术后 6 周为主诉于 2023 年 11 月 27 日至中国中医科学院西苑医院肿瘤科就诊。既往体健, 无药物、食物过敏史。患者 2019 年发现右侧颈部包块, 2023 年 3 月因肿物增大于北京大学第一医院行穿刺活检, 病理结果为低分化鳞癌。2023 年 7 月 PET-CT 结果提示右颈部及右腮腺多发软组织灶, 颈部 II 区淋巴结代谢增高, 考虑转移。2023 年 7 月于北京大学口腔医院行腮腺穿刺活检, 病理示腮腺鳞癌。2023 年 7 月至 2023 年 9 月行 3 周期新辅

助治疗, 方案如下: 特瑞普利单抗 240 mg, 西妥昔单抗 1 000 mg, 白蛋白紫杉醇 400 mg, 顺铂 70 mg。2023 年 10 月 9 日行右腮腺肿物切除术与右侧颈部淋巴结清扫术。术后病理倾向于鳞癌。2023 年 10 月检查甲状腺功能, 结果提示甲状腺功能减退, 考虑可能为特瑞普利单抗的不良反应。给予左甲状腺素钠片, 每次 100 μg , 每日 1 次口服, 患者出院后自行停药。

1.2 治疗经过 入院第 1 天, 完善相关检查指标, 结果示甲状腺功能减退, 心肌酶升高, 肝酶升高, 肌酐升高, 医师予左甲状腺素钠片 100 μg 每日 1 次口服, 予注射用谷胱甘肽 1.8 g 每日 1 次静脉滴注, 双环醇片 25 mg 每日 3 次, 金水宝片 1.68 g 每日 3 次口服。入院第 8 天, 心肌酶持续升高, 超声心动图结果示左室舒张功能减低。入院第 10 天, 心梗相关检测指标升高, 遂请心血管科医师会诊, 考虑为化疗引起的心肌损伤或甲减性心肌损伤, 患者心电图、心脏彩超未见明显异常, 无心慌胸闷等不适, 临床医师予辅酶 Q10 片 10 mg 每日 3 次口服, 肌昔注射液 600 mg 每日 1 次静脉滴注。入院第 14 天, 肝肾功能、心肌酶相关指标降低, 甲功等指标有改善。入院第 23 天, 心梗指标、肝肾功能指标正常, 心肌酶相关指标中肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶指标正常, 肌酸激酶和 α -羟丁酸脱氢酶稍高于正常值, 患者整体好转, 准予出院; 出院带药辅酶 Q10 片、左甲状腺素钠片, 用法用量同前。临床药师嘱定期复查生化及甲功指标, 并电话随访, 截至 2024 年 1 月 8 日, 患者心肌酶指标无明显异常。截至 2024 年 2 月 27 日, 甲功 7 项中只有促甲状腺激素、三碘甲状腺原氨酸和甲状腺过氧化物酶抗体指标异常。患者规律服用左甲状腺素钠片中。相关检测结果见表 1~表 3。

表 1 患者甲功 7 项指标

检查时间	FT ₃ / (pmol · L ⁻¹)	FT ₄ / (pmol · L ⁻¹)	TSH/ (uIU · mL ⁻¹)	T ₃ / (nmol · L ⁻¹)	T ₄ / (nmol · L ⁻¹)	TGAb/ (IU · mL ⁻¹)	TPOAb/ (IU · mL ⁻¹)
2023 年 11 月 27 日	0.96	0.50	100.00	0.30	5.40	27.10	600.00
2023 年 12 月 10 日	3.28	9.83	100.00	0.81	44.10	29.90	600.00
2023 年 12 月 18 日	4.90	15.50	39.90	1.28	66.70	21.50	600.00
2024 年 1 月 3 日	4.18	15.00	25.10	1.08	56.70	23.90	600.00
2024 年 2 月 27 日	4.86	20.40	5.25	1.18	72.80	17.50	529.00

注: FT₃ 为血清游离三碘甲状腺原氨酸, FT₄ 为血清游离甲状腺素, TSH 为促甲状腺激素, T₃ 为血清三碘甲状腺原氨酸, T₄ 为血清甲状腺素, TGAb 为甲状腺球蛋白抗体, TPOAb 为甲状腺过氧化物酶抗体。

表 2 患者生化指标

检查时间	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)	肌酐/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CK/ (U · L ⁻¹)	CK-MB/ (U · L ⁻¹)	α -HBDH/ (U · L ⁻¹)	LDH/ (U · L ⁻¹)
2023 年 11 月 27 日	58.90	118.00	136.00	2918.10	77.77	399.00	419.67
2023 年 12 月 4 日	58.00	138.40	120.00	3827.80	104.01	528.00	536.67

表 2(续) 患者生化指标

检查时间	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	肌酐/ (μmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	CK-MB/ (U·L ⁻¹)	α-HBDH/ (U·L ⁻¹)	LDH/ (U·L ⁻¹)
2023 年 12 月 10 日	35.00	45.90	105.00	1360.30	28.14	385.00	417.01
2023 年 12 月 18 日	13.00	19.60	100.00	386.81	13.03	195.00	220.24
2024 年 1 月 3 日	7.40	14.80	80.00	183.61	9.58	110.00	147.23
2024 年 1 月 8 日	7.40	12.60	84.00	143.14	10.18	92.00	125.24
2024 年 2 月 27 日	12.50	12.70	85.00	70.06	8.06	99.00	130.67

注:AST 为丙氨酸氨基转移酶,ALT 为天门冬氨酸氨基转移酶,CK 为肌酸激酶,CK-MB 为肌酸激酶同工酶,α-HBDH 为 α-羟丁酸脱氢酶,LDH 为乳酸脱氢酶。

表 3 患者心梗 3 项及 BNP、D-D 指标

检查时间	cTn/ (ng·mL ⁻¹)	CK-MB/ (ng·mL ⁻¹)	Myo/ (ng·mL ⁻¹)	BNP/ (ng·mL ⁻¹)	D-D/ (mg·L ⁻¹)
2023 年 11 月 27 日	—	—	—	—	0.59
2023 年 12 月 4 日	0.020	23.49	181.10	13.70	0.51
2023 年 12 月 10 日	0.021	11.20	124.00	—	0.44
2023 年 12 月 18 日	0.013	4.10	55.10	34.30	0.50
2024 年 1 月 3 日	0.011	1.99	41.00	45.60	0.59
2024 年 1 月 8 日	0.009	1.43	34.30	44.90	0.35
2024 年 2 月 27 日	0.010	1.58	27.40	42.50	0.66

注:cTn 为肌钙蛋白,CK-MB 为肌酸激酶同工酶,Myo 为肌红蛋白,BNP 为 B 型钠尿肽,D-D 为 D-二聚体。

1.3 案例分析

1.3.1 心肌酶升高与特瑞普利单抗的相关性 研究表明 PD-1 抑制剂单药在首次用药第 10~24 周容易发生相关内分泌毒性^[3]。常见的 ICI 致内分泌毒性包括甲状腺功能异常和急性垂体炎。ICI 相关心肌炎是一种少见的 irAEs,但是病死率高达 39.7%~50%^[4-6],位居所有 irAEs 的第一位。典型心肌炎临床症状综合征包括心悸、胸痛、肌痛、呼吸困难、头晕,心肌标志物如 BNP 或 n-末端 proBNP(NT-proBNP)、肌钙蛋白和肌酸激酶同工酶升高,心电图异常等一系列特征^[7-9]。特瑞普利单抗说明书中明确指出发生甲状腺功能减退的不良反应发生率>10%,属于十分常见的不良反应,而心肌炎的发生频率为偶见。患者使用特瑞普利单抗 3 个周期后出现甲状腺功能减退症状,继发心肌酶升高,但心电图、BNP 未见异常,综合考虑,该患者为特瑞普利单抗致甲状腺功能减退后引起心肌酶升高,可排除特瑞普利单抗引起心肌炎。

1.3.2 甲减治疗药物分析 该患者被诊断甲状腺功能减退后,给予 100 μg 左甲状腺素钠片口服治疗,但其出院后自行停药,导致再次入院时甲减症状加重,并引发肝肾功能异常、心肌酶升高。患者再次服用左甲状腺素钠片 100 μg,指南推荐服用左甲状腺素钠片时应从小剂量开始,逐渐增加至治疗剂量,用药过量或者剂量增加过快可能引起甲状腺功能亢进症状,临床药师应注意患者直接服用至治疗剂量的左甲状腺素钠片

时是否有不适,监测可能出现的不良反应。临床药师根据 8 项 Morisky 用药依从性量表^[10]对该患者的用药依从性进行评价,结果得出该患者的用药依从性较差,针对该结果临床药师对患者着重进行了用药教育,以提高其用药依从性,为临床治疗效果奠定基础。

2 文献分析

根据对该病例分析的结果可知,该患者心肌酶升高为甲状腺功能减退所致。检索国内外有关 ICI 致甲状腺功能减退报道的文献,总结 ICI 致甲状腺功能减退的临床特点,为其防治提供参考。

2.1 资料来源 截止 2024 年 1 月,在中国上市 18 个 ICI,具体见表 4。

表 4 国内上市 ICI

序号	药品名称	靶点	序号	药品名称	靶点
1	特瑞普利单抗	PD-1	11	舒格利单抗	PD-L1
2	信迪利单抗		12	恩沃利单抗	
3	卡瑞利珠单抗		13	阿得贝利单抗	
4	替雷利珠单抗		14	阿替利珠单抗	
5	赛帕利单抗		15	度伐利尤单抗	
6	派安普利单抗		16	索卡佐利单抗	
7	斯鲁利单抗		17	伊匹木单抗	CTLA-4
8	普特利单抗		18	卡度尼利单抗	PD-1/CTLA-4
9	帕博利珠单抗				
10	纳武利尤单抗				

这些药物已被证明在治疗晚期肺癌、恶性黑色素

瘤、泌尿系统肿瘤、胃肠道肿瘤等多种恶性肿瘤中有效。在中文数据库中国知网、万方医学、维普,以中国已上市的 18 个 ICI 名称、“甲状腺功能减退”“例”为检索词;在外文数据库(PubMed、ScienceDirect)中,以相应的药物名称英文、“hypothyroidism”“case”为检索词,检索时间从建库至 2024 年 5 月,收集 ICI 致甲状腺功能减退的病例报告类文献。

2.2 纳入和排除标准 纳入国内外公开发表的文献

记载相关信息完整的个案报道文献,剔除综述性文献、重复文献及病例记载不完整的文献。

2.3 方法 对纳入的文献进行整理分析,记录患者的性别、年龄、主要诊断、用法用量、不良反应甲状腺功能减退的发生时间、处置与治疗 and 转归等有效信息。

2.4 结果 共收集到符合标准的文献 67 篇,涉及病例 81 例,筛选典型的临床病例 24 例^[11-34],见表 5。

表 5 ICI 致甲状腺功能减退的患者情况

序号	药物名称	性别	年龄	用药原因	每次用量	发生时间	临床表现	处置及治疗	转归	参考文献
1	特瑞普利单抗	男	52	右鼻咽神经内分泌瘤	240 mg	首次用药 9 个月(7 个月用药周期后)	乏力、厌食、交谈反应迟钝、表情淡漠	左甲状腺素钠片 50 μg/d,好转后给予治疗	好转	[11]
		男	60	右肺腺癌	200 mg	首次用药 97 d(2 个月用药周期后)	畏寒、头晕、乏力、眼睑浮肿、体重增加	左甲状腺素钠片 100~150 μg/d	好转	[12]
		男	38	肺癌	240 mg	首次用药 11 个月后	疲劳、怕冷、食欲下降	停药,左甲状腺素 25 μg/d	好转	[13]
2	纳武利尤单抗	女	70	肺腺癌	140 mg	首次用药 1 个月(3 个月用药周期后)	乏力、腹痛、精神状态差、嗜睡等	未停药,予左甲状腺素钠片 25 μg/d	好转	[14]
		女	78	肠癌	140 mg	首次用药 4 个月	乏力、头晕及皮肤变黄、眼睑浮肿等	停药,左甲状腺素钠片 100 μg/d	好转	[15]
		女	71	黑色素瘤	2 mg/kg	首次用药 6 个月	全身不适	未停药,予左甲状腺素钠片 75 μg/d	好转	[16]
		男	62	肺腺癌	3 mg/kg	首次用药 5 个月(11 个月用药周期后)	头晕、步态不稳、疲劳、厌食、戒断、周期性意识模糊、警觉性降低等	停药,予左甲状腺素钠片 100 μg/d	好转	[17]
		男	56	肺癌	180 mg	首次用药 75 d	疲劳、眼睑水肿	左甲状腺素钠片 25 μg/d	好转	[18]
		男	62	肺癌	3 mg/kg	首次用药 2 个月	疲劳、食欲不振	停药,泼尼松龙 0.5 mg/kg 和左甲状腺素 25 μg/d	好转	[19]
		男	42	黑色素瘤	480 mg	首次用药 4 个月后	全身性关节痛和间歇性失衡发作	暂时停药,甲状腺激素替代治疗	好转	[20]
		男	51	肾癌	3 mg/kg	首次给药 49 d	心率和血压降低、虚弱和嗜睡	停药,左甲状腺素钠片 50~125 μg/d	好转	[21]
		男	46	肾癌	不明	首次用药 4 个月后	未提及	停药,左甲状腺素钠片 100~300 μg/d	死亡	[22]
3	帕博利珠单抗	女	56	肺癌	200 mg	首次给药 3 个月	乏力,畏寒	未停药,左甲状腺素钠片 25~75 μg/d	好转	[23]
		女	69	乳腺癌	200 mg	首次给药 2 个月	乏力,纳差	停药,左甲状腺素钠片 50 μg/d	好转	[24]
		女	66	食管癌	100 mg	首次给药 5 个月	乏力,厌食,便秘	未停药,左甲状腺素钠片 50 μg/d	好转	[25]
4	信迪利单抗	男	69	食管癌	200 mg	首次给药 4 个月	乏力纳差	未停药,左甲状腺素钠片 75 μg/d	好转	[26]
		男	55	肾癌	200 mg	首次给药 1 个月	首次给药 6 个月(1 年后)出现乏力,体重增加,声音嘶哑	未停药,左甲状腺素钠片 25~50 μg/d	好转	[27]
		女	77	肝内胆管癌	200 mg	首次给药 2 个月后	乏力,面部及双下肢水肿	停药,左甲状腺素钠片 25~50 μg/d	好转	[28]
5	卡瑞利珠单抗	男	63	肺癌	200 mg	首次给药 3 个月	乏力,嗜睡	未停药,左甲状腺素钠片 25~50 μg/d	好转	[29]
6	替雷利珠单抗	男	49	肝癌	200 mg	首次给药 4 个月	睡眠增加,反应迟钝	停药,左甲状腺素钠片 12.5~100 μg/d	好转	[30]
		男	59	胃癌	200 mg/m ²	首次给药 6 个月	虚弱	未停药,左甲状腺素钠片 0.05 mg/d	好转	[31]
7	度伐利尤单抗	女	65	肾癌	不明	首次给药 8 周期	疲劳,上肢无力	未停药,甲状腺激素	好转	[32]
8	阿替利珠单抗	男	63	肝癌	1200 mg	首次给药 19 周	未提及	暂停药,左甲状腺素钠片 25 μg/d	好转	[33]
9	伊匹木单抗	男	64	黑色素瘤	3 mg/kg	首次给药 2 个月	疲劳	未停药,左甲状腺素钠片 50 μg/d	好转	[34]

2.4.1 患者性别与分布 检索到符合标准的 81 例病例报道中男性有 56 例(占 69.14%),女性有 25 例(占 30.86%),男女比例为 2.24 : 1,年龄在 31~85 岁,平

均年龄为(62.64±11.18)岁,其中 40 岁以上患者占比最多(占 97.53%)。

2.4.2 甲状腺功能减退发生时间 在 81 例患者中,

甲状腺功能减退发生时间最短的为首次接受免疫检查点抑制剂治疗后 21 d(1 个用药周期),最长为首次给药 17 个月后。

2.4.3 甲状腺功能减退治疗与转归 在 81 例患者中,只有 1 例患者因无症状未用药治疗,其余 80 例均采用左甲状腺素钠片治疗甲状腺功能减退。在报道病例中,只有 1 例患者死亡,不排除自身肿瘤进展导致,未用药患者未提及转归情况,其余患者甲状腺功能减退症状给予对症治疗后均有好转。

2.5 结论与分析 查阅已上市的 ICIs 说明书,均易导致甲状腺功能减退,联合治疗发生甲状腺功能减退的概率更高。ICIs 导致甲状腺功能减退的发生时间不一,常见的症状有乏力、疲劳等,以甲状腺激素替代治疗后甲减的症状可有明显改善,甲功也可恢复正常。本文报道的病例为患者应用 ICIs 治疗后出现甲状腺功能减退,但患者未遵医嘱治疗导致甲减加重致心肌酶升高,提示在临床应用 ICIs 治疗中,要密切关注患者的甲功情况,若出现甲减建议积极治疗。指南^[3]推荐在 ICIs 治疗前进行基线检查;治疗期间,建议每 4~6 周复查 1 次垂体泌乳素,然后根据症状,每 12 周复查 1 次。无症状的甲状腺功能减退无须治疗,每 4~6 周 1 次监测 TSH 及游离 T₄,有症状的甲状腺功能减退需要行甲状腺激素替代疗法。

3 讨论

ICIs 最常见的不良反应为甲状腺功能障碍,甲状腺功能减退又是最常见的 ICIs 相关甲状腺疾病。目前对 ICIs 引起甲状腺功能减退的作用机制研究较少,ICIs 所致相关的内分泌不良反应发生发展的潜在机制还有待进一步研究。

甲状腺功能减退症是 ICIs 常见内分泌系统不良反应,甲状腺功能减退会引起心肌酶升高。目前,文献报道大多为 ICIs 引起甲状腺功能减退的病例,暂无 ICIs 引起心肌酶升高的报道。本研究报道了 1 例使用特瑞普利单抗引起甲状腺功能减退,继而引发心肌酶升高的病例,提示临床使用 ICIs 时应关注甲状腺功能减退等常见内分泌不良反应,同时也要关注甲状腺功能减退患者的心肌酶水平,若患者出现心肌酶升高,可考虑是否为甲状腺功能减退所致。

在临床实际工作中,肿瘤科医生和临床药师应密切协作,加强对患者的用药教育。对于接受新型抗肿瘤药物治疗的患者,临床医生和临床药师应对患者治疗的前期、中期和后期应做到全程化评估和密切监测,以避免严重危及生命的不良反应发生,使患者在抗肿瘤治疗中得到最大程度的受益。

参考文献:

- [1] HOOS A. Development of immuno-oncology drugs-from CTLA4 to PD1 to the next generations[J]. Nat Rev Drug Discov,2016,15(4):235-247.
- [2] 牛志成,王雷,汪治宇.免疫检查点抑制剂相关不良反应的管理专家共识[J].河北医科大学学报,2021,42(3):249-255.
- [3] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会组织.中国临床肿瘤学会(CSCO)免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南(2023 版)[M].北京:人民卫生出版社,2023:46-47.
- [4] SALEM J E,MANOUCHEHRI A,MOEY M,et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors:an observational,retrospective,pharmacovigilance study[J]. Lancet Oncol,2018,19(12):1579-1589.
- [5] WANG D Y,SALEM J E,COHEN J V,et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors;a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Oncol,2018,4(12):1721-1728.
- [6] MOSLEHI J J,SALEM J E,SOSMAN J A,et al. Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis[J]. Lancet,2018,391(10124):933.
- [7] 中国医师协会呼吸医师分会,中国医师协会肿瘤多学科诊疗专业委员会.免疫检查点抑制剂相关毒性防治与管理建议[J].中华医学杂志,2022,102(24):1811-1832.
- [8] 汪星辉,王凤玲,胡娟,等.特瑞普利单抗致免疫性心肌炎 1 例报道[J].现代医药卫生,2022,38(1):176-178.
- [9] 冯惠平,解俊敏,张靖.特瑞普利单抗致免疫相关性心肌炎 1 例[J].中国新药与临床杂志,2020,39(9):574-576.
- [10] 俞吉,冉烁,徐玲. Morisky 用药依从性量表 8 条目在老年慢性病患者用药评价中的应用[J].临床药物治疗杂志,2020,18(11):63-66.
- [11] 张冠英,黄立峰,徐银丽,等.特瑞普利单抗致肝损伤伴甲状腺功能减退的处理及监护[J].中国药业,2023,32(24):145-149.
- [12] 王春晖,吴薇,李晓宇,等.特瑞普利单抗致免疫相关性甲状腺功能异常[J].药物不良反应杂志,2021,23(3):158-160.
- [13] WANG Y N,ZHAO P,ZHAO Z Y,et al. Primary multiple endocrine insufficiency during immune checkpoint inhibitor treatment: a case report [J]. Medicine (Baltimore),2024,103(3):e36998.
- [14] 姜彩虹,王利.纳武利尤单抗致甲状腺功能减退 1 例[J].药物流行病学杂志,2019,28(9):624-625.
- [15] 林常松,郭梓,莫朝晖. Nivolumab 致甲状腺功能减退症 1 例[J].中南大学学报(医学版),2019,44(2):222-224.
- [16] TAKENO A,YAMAMOTO M,MORITA M,et al. Late-onset isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency caused by nivolumab;a case report[J]. BMC Endocr Disord,2019,19(1):25.
- [17] KASTRISIOU M,KOSTADIMA FL,KEFAS A,et al. Nivolumab-induced hypothyroidism and selective pituitary

ry insufficiency in a patient with lung adenocarcinoma; a case report and review of the literature[J]. *ESMO Open*, 2017,2(4):e000217.

[18] OKI T,INOUE A,NAGATANI Y,et al. Computed tomography imaging findings of nivolumab-induced thyroid dysfunction[J]. *J Clin Imaging Sci*,2022,12:22.

[19] FIORE R,ROSA S L,UCCELLA S,et al. Consumptive hypothyroidism in a patient with malignant rhabdoid tumor of the kidney;case report on a newly found association[J]. *Eur Thyroid J*,2022,11(5):e220006.

[20] JOTATSU T,ODA K,YAMAGUCHI Y,et al. Immune-mediated thrombocytopenia and hypothyroidism in a lung cancer patient treated with nivolumab[J]. *Immunotherapy*,2018,10(2):85-91.

[21] JOHNSON E D,KERRIGAN K,BUTLER K,et al. Nivolumab-induced hypothyroidism with consequent hypothyroid related myopathy[J]. *J Oncol Pharm Pract*,2020,26(1):224-227.

[22] LIGUORI L,LUCIANO A,POLCARO G,et al. Prior anti-angiogenic TKI-based treatment as potential predisposing factor to nivolumab-mediated recurrent thyroid disorder adverse events in mRCC patients:a case series[J]. *Biomedicines*,2023,11(11):2974.

[23] 谭飞龙,夏洪颖,王重娟,等. 1 例帕博利珠单抗致甲状腺功能减退的病例分析[J]. *药物流行病学杂志*,2023,32(2):227-232.

[24] 钱石静,张岩,祝德秋. 1 例帕博利珠单抗致甲状腺功能减退的病例分析与药学监护[J]. *药物流行病学杂志*,2021,30(8):552-555.

[25] 王英南,张风宾,张韶辰,等. 帕博利珠单抗致食管癌患者甲状腺功能减退合并心肌损害一例报告[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2020,27(9):1068-1069.

[26] 张高山,刘彦,朱华,等. 信迪利单抗致孤立性 ACTH 缺乏症合并原发性甲状腺功能减退症 1 例[J]. *实用药物与临床*,2023,26(12):1148-1152.

[27] 刘全义. 信迪利单抗联合阿昔替尼治疗晚期肾癌致甲状腺功能减退症 1 例[J]. *临床合理用药*,2023,16(35):171-173,177.

[28] 宇文利霞,时绘绘,王瑞玲,等. 临床药师参与 1 例信迪利单抗致免疫相关性甲状腺功能减退患者治疗的药学实践[J]. *中国临床药学杂志*,2023,32(9):701-703.

[29] 陈刚,闫丽荣,王哲,等. 1 例卡瑞利珠单抗致甲状腺功能减退不良反应分析[J]. *肿瘤药学*,2020,10(1):125-128.

[30] HUO L M,WANG C,DING H X,et al. Severe thyrotoxicosis induced by tislelizumab:a case report and literature review[J]. *Front Oncol*,2023,13:1190491.

[31] BAEK J H. Adrenal insufficiency development during chemotherapy plus anti-programmed death receptor-1 monoclonal antibody (tislelizumab) therapy in patients with advanced gastric cancer:case series[J]. *J Yeungnam Med Sci*,2022,39(1):62-66.

[32] SINGH V,CHU Y,GUPTA V,et al. A tale of immune-related adverse events with sequential trials of checkpoint inhibitors in a patient with metastatic renal cell carcinoma[J]. *Cureus*,2020,12(6):e8395.

[33] HAYASHI H,SAWADA K,HASEBE T,et al. A successful case of hepatocellular carcinoma treated with atezolizumab plus bevacizumab with multisystem immune-related adverse events[J]. *Intern Med*, 2022, 61 (23): 3497-3502.

[34] BARNABEI A,CARPANO S,CHIEFARI A,et al. Case report:ipilimumab-induced panhypophysitis;an infrequent occurrence and literature review[J]. *Front Oncol*,2020,10:582394.

收稿日期:2024-10-23;修回日期:2024-12-06
(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:赵龙,黄龙坚.中国医疗资源配置研究热点及演进趋势分析[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):319-324.

【论著与临床报道】

中国医疗资源配置研究热点及演进趋势分析

赵龙,黄龙坚

(右江民族医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 通过对我国近 20 余年医疗资源配置相关研究进行可视化分析,了解当前研究的进展,进而提供理论建议。**方法** 以中国知网与万方数据库检索的文献为研究样本,运用 CiteSpace 软件绘制共现网络与关键词演变等知识图谱。**结果** 相关研究发文量呈波动上升趋势;各大高校是研究的中坚力量,作者群之间合作较少,科研机构之间的合作地域性较强;高频关键词包括“资源配置”“公平性”等,“耦合协调”“动态演进”等是当前研究的热点。**结论** 未来研究数量仍会增加,且研究热度不减;作者群之间应加深交流与合作;建议进一步优化协同体系,提升医疗机构的公众满意度,引导群众合理就医。

关键词:医疗资源配置;知识图谱;可视化分析

中图分类号:R195

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0319-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.020

Analysis of research hotspots and evolution trends in the allocation of medical resources in China

ZHAO Long, HUANG Longjian

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the current research progress in medical resource allocation in China over the past two decades through visual analysis and provide theoretical recommendations. **Methods** Literature retrieved from CNKI and Wanfang databases was used as the research sample, and CiteSpace software was employed to construct knowledge maps such as co-occurrence networks and keyword evolution. **Results** The volume of relevant publications showed a fluctuating upward trend; universities were the backbone of the research, with limited collaboration among author groups and strong regional collaboration among research institutions; high-frequency keywords included “resource allocation” “equity” among others, whereas “coupling coordination” and “dynamic evolution” were current research hotspots. **Conclusion** The number of future studies will likely continue to rise, with sustained research hotspots; Deeper exchanges and collaboration among author groups should be fostered; It is recommended to further optimize the coordination system, enhance public satisfaction with medical institutions, and guide the public to seek appropriate medical treatment.

Key words: medical resource allocation; knowledge graph; visual analysis

随着社会经济的快速发展和人口老龄化的加剧,如何实现医疗资源的优化配置、保障全民健康,已成为政府和学术界亟待解决的问题。在当前政策鼓励与健

康中国战略不断推进的社会背景下,针对医疗资源配置的研究也不断演变出了丰富的发展脉络。众多学者通过不同的切入点进行了研究,如:探究不同区域医疗

第一作者:赵龙,在读硕士研究生,研究方向:卫生管理与政策研究,E-mail:1595686489@qq.com

通讯作者:黄龙坚,教授,硕士研究生导师,研究方向:卫生管理与政策研究,E-mail:huanglongjian@ymun.edu.cn

资源配置的公平性^[1-2]与时空变化^[3-4];基于不同的事件背景或理论机制探究配置效率及其影响因素^[5-7];探究不同系统与医疗资源配置的协同发展^[8-9]与提升路径等^[10-11]。这些研究不仅丰富了医疗资源配置的理论体系,也为实际的政策制定和资源配置方案提供了科学依据。然而,医疗资源配置不仅是卫生部门的问题,也是社会整体发展、区域协调以及财政收入等多方面的综合性课题,单从医疗卫生角度出发只会深陷“卫生看卫生”的思维模式而固步自封。因此,探讨医疗资源配置问题,关键在于从宏观视角审视医疗的角色和意义,整合各方资源,关注长远的社会健康和公平发展,这就需要对研究领域进行整体把握。本研究利用 CiteSpace 的可视化功能,通过探究相关文献的时空分布特征、知识群分布等内容,来揭示新世纪以来我国医疗资源配置领域的研究热点及其演进趋势,并从多中心治理的视角进行思考,提供改进方向与理论建议。

1 数据来源与研究方法

1.1 数据来源 以中国知网(CNKI)数据库、万方数据知识服务平台为数据来源,检索式为:主题=医疗资源配置,时间跨度限定为:2000 年 1 月 1 日至 2024 年 12 月 1 日,限定类型为学术期刊,为保证纳入文献质量,期刊类型限定为北大核心、中国科学引文数据库(CSCD)和中文社会科学引文索引(CSSCI)。检索相关文献,并排除卷首语、征稿启事等非研究型文献,初步获取 1 044 篇文献。接着将检索获得的文献导入 NoteExpress 3. 9. 0 软件进行去重与人工复核,最终选定 491 篇有效文献作为研究样本。最后以 ref-works-CiteSpace 的格式导入 CiteSpace 6. 3. R1 软件

进行分析。

1.2 研究方法 利用 CiteSpace 6. 3. R1 软件对文献进行可视化分析,具体操作设置如下:首先将时间划分(Time Slicing)设置为 2000 年 1 月至 2024 年 12 月,时间切片(Years Per Slice)设置为 1 年;其次节点类型(Node Types)分别选择合作作者(Author)、机构(Institution)和关键词(Keyword);接着采用 g-index 算法设定阈值,比例参数 k 设定为 18,阈值设置为 Top N=50,关联强度(Links)选择为 Cosine 算法,网络裁剪方法(Pruning)选择寻径网络(Pathfinder Network),其余参数保持默认。同时多中心治理理论认为除政府以外的组织或团体都应参与到公共事务治理中来^[12],能够适配于多角度对医疗资源配置问题进行分析的需求,因此结合多中心治理理论对不同主体进行分析并提出相应建议。

2 研究结果

2.1 文献发表年份分布情况 发文量可以反映出一个领域的研究热度与发展情况。结果如图 1 所示。新世纪以来近 20 余年发文量虽呈波动起伏状,但总体上仍呈上升趋势。纵观研究的时间脉络,大致可分为 4 个阶段:①2000—2004 年为起步阶段,此时期发文量多为个位数,整体呈低迷态势;②2005—2008 年为发展阶段,此时期文献数量开始呈现增加趋势;③2009—2015 年为稳定发展阶段,发文数量于 2009 年达到了第一次高峰,期间发文量稳定在 20 篇上下;④2016—2024 年为快速发展阶段,发文数量于 2016 年达到了第二次高峰,随后 2023 年达到第三次研究高峰。

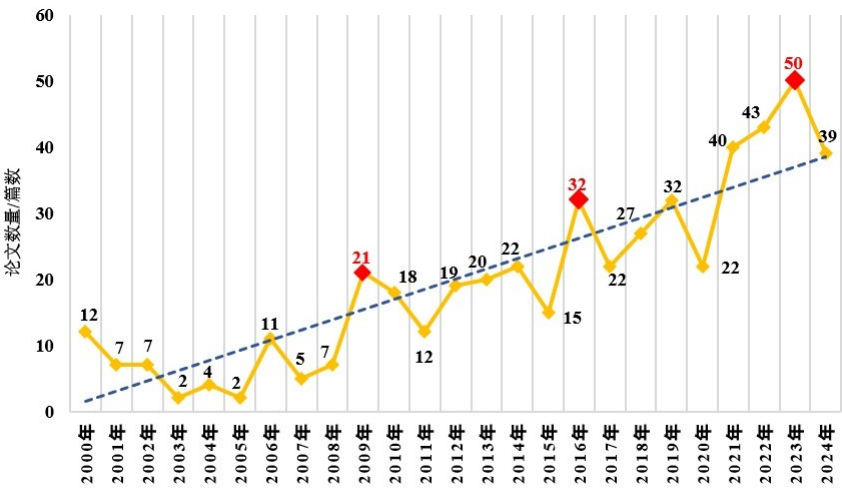


图 1 医疗资源配置相关研究的发表情况

2.2 作者合作网络分析 作者间的合作是保证研究高效产出的关键因素。在图 2 中,每个节点代表一位作者,不同颜色代表着不同发文时期,节点越大代表该

作者发文数量越多,节点之间的连线代表作者之间有合作关系。由下图可知节点数(N)=283,连线数(E)=233,图谱密度(Density)=0. 0058。早期较为活跃

的作者为张鹭鹭、胡善联等,近年来较为活跃的作者为李丽清、卢祖洵、罗勇军等。并且从图形分布与连线关系来看研究多数为机构内部学者的合作,作者群与群之间的联系较少,分布较为分散。

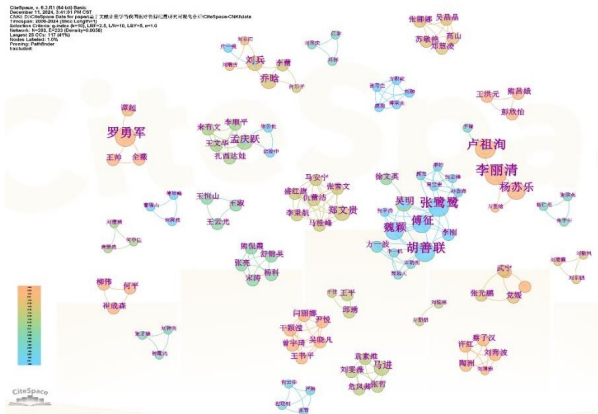


图 2 医疗资源配置相关研究的作者合作网络

2.3 机构网络分析 各大机构的发文情况能反映其在当前领域的学术水平。491 篇文献涵盖了 292 家科研机构,包括高等院校、医院与政府部门等主体。其中华中科技大学发文量最多(21 篇),发文量 ≥ 5 篇机构分别是华中科技大学(21 篇)、国家卫生健康委卫生发展研究中心(10 篇)、重庆医科大学(8 篇)、复旦大学(7 篇)、中国人民大学(6 篇)、北京大学(6 篇)、南京中医药大学(6 篇)、南京医科大学(5 篇)。就发文量而言,各大高校占据绝对优势,具有研究主体地位,是医疗资源配置领域的研究主力。如图 3 可知,节点数=292,连线数=163,图谱密度=0.0038,连线数较少,节点密度较低,体现出各机构之间合作较少,多为小团体分布。

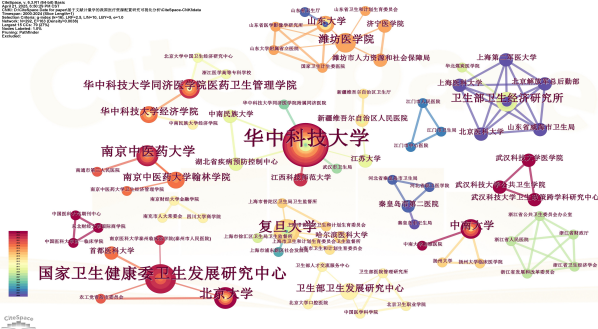


图 3 医疗资源配置相关研究的机构合作网络

2.4 研究热点可视化分析

2.4.1 关键词共现分析 关键词是对文献研究方向的高度凝炼,能反映出当前领域的研究热点与发展趋势。如图 4 呈现,节点数=293,连线数=335,节点密度=0.0078,其中中介中心性 >0.1 的节点为关键节

点^[13],表明该关键词为研究领域内的关键枢纽,在网络结构中占据重要位置。结合图 4 与关键词共现分析结果可知(见表 1),“资源配置(0.42)”“医疗资源(0.37)”“医疗机构(0.29)”“公平性(0.24)”“效率(0.23)”等为中介中心性较高的关键词。这些关键词在研究样本中占据核心位置,以它们为研究起点,各自产生了十分广泛的辐射状连线,形成了复杂的结构网络,包括“动态演进”“耦合协调”“弱势群体”等内容,反映出相关研究的涵盖面较为广泛,已形成了多方向的内容体系。

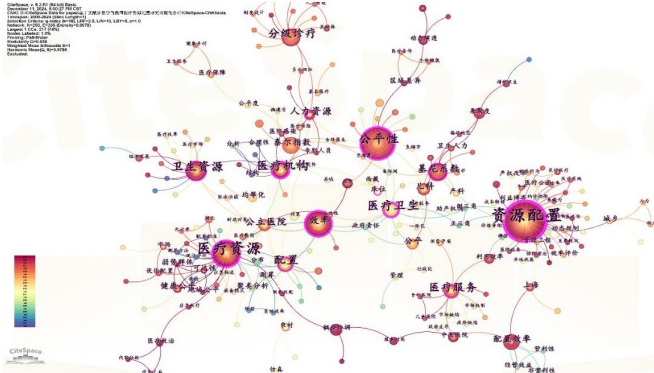


图 4 医疗资源配置相关研究的关键词共现图谱

表 1 医疗资源配置相关研究前十关键词

序号	频次	中心性	年份	关键词
1	83	0.42	2000	资源配置
2	57	0.37	2001	医疗资源
3	15	0.29	2000	医疗机构
4	59	0.24	2008	公平性
5	24	0.23	2004	效率
6	11	0.23	2005	医疗卫生
7	7	0.19	2009	人力资源
8	30	0.15	2007	基尼系数
9	34	0.13	2000	卫生资源
10	26	0.12	2010	床位

2.4.2 关键词聚类分析 为进一步了解当前领域的知识体系与研究结构,在关键词共现的基础上进行聚类图谱分析,关键指标包括模块值(Modularity,Q 值)和平均轮廓值(Weighted Mean Silhouette,S 值)。如果 Q 值 >0.3 ,则表示各聚类结构是显著性的;而 S 值则表示聚类的同质程度,当 S 值 >0.7 时,表明聚类的高效率是令人信服的^[14]。本研究中 Q 值为 0.8079,S 值为 0.9561,说明该聚类效果显著,结构良好,信度较高。最终形成#0~#10 共 11 个聚类,具体如图 5 所示。在此基础之上结合表 1,将各聚类中的相似标识词进行合并归纳,最终总结出医疗资源配置相关研究的主要知识群,如表 2 所示,共形成了 4 大研究主题,

分别为:医疗资源配置机制、医疗机构配置效率、医疗服务均等公平、医疗水平区域协同发展。

2.5 演进趋势分析 对研究样本进行关键词实现呈现,能够清楚理顺研究的发展历程。结果如图 6 所示,可发现:首先,从起始年份来看,“卫生资源”“配置”“医疗卫生”相关研究起始年份较早,是发展初期的研究热点;其次,从持续时间来看,“医疗卫生”于 2005—2016 年期间一直保持研究热度,时间长达 11 年,此区间正值新医改推行时期,符合时代发展的大方向;最后,2022 年是领域关键词突现的爆发期。共产生了“配置效率”“耦合协调”“集聚度”“动态演进”4 个热词,也表明了当前领域内的热点与研究趋势。

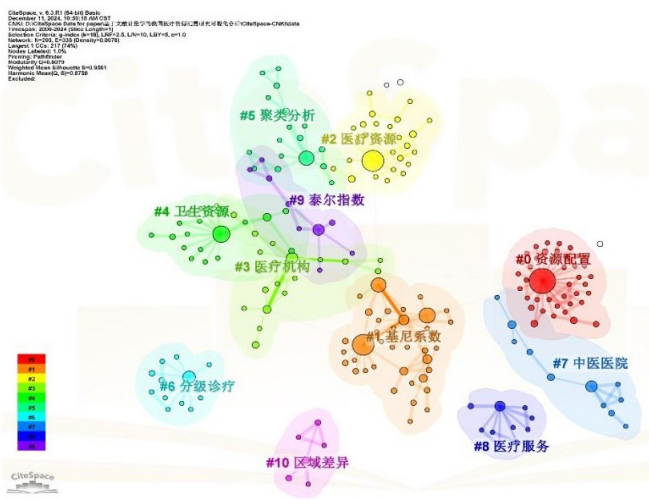


图 5 医疗资源配置相关研究的关键词聚类图谱

表 2 医疗资源配置相关研究的主要知识群

序号	研究主题	主要聚类标识词
1	医疗资源配置机制	资源配置;优化配置;嵌套模式;消费制约机制;制度设计;分级诊疗
2	医疗机构配置效率	医疗机构;人力资源;床位;县域医疗服务价格;中医医院;医疗服务
3	医疗服务均等公平	基尼系数;公平性;泰尔指数;医疗保障;均衡度;健康乡村
4	医疗水平区域协同发展	聚类分析;协同发展;区域差异;耦合协调;动态演进

结合相关政策文件来看,自迈入新世纪以来国家对于医疗资源配置的政策注意力呈现出不断加强的特点。2000 年《关于城镇医药卫生体制改革的指导意见》提出了加强卫生资源配置宏观管理、转变公立医疗机构运行机制等目标,政策注意力主要分配在“让群众享有价格合理、质量优良的医疗服务”之上;2009 年《关于深化医药卫生体制改革的意见》将宏观方向放在“如何实现人人享有基本医疗卫生服务的目标”之上,此时政策注意力集中于医疗资源配置的公平性研究上,研究热点也随即演变到引入多种衡量差距的方法测算城乡区域差异、资源配置效率与公平性上;而 2015 年《关于推进分级诊疗制度建设的指导意见》、2024 年《深化医药卫生体制改革 2024 年重点工作任务》等重要文件进一步提出了“合理配置医疗资源、促进基本医疗卫生服务的公平可及”的目标,相关研究的关注点也朝着产生的社会效应、探索分级诊疗与区域协同动态发展等内容进行不断探索。不同时期政策注意力分配带来的变化在表 1 中的关键词词频与图 6 中的关键词出现时间上也有所体现。从发展历程上可发现研究的整体方向以解决当时的实际问题为主,与宏观政策和国家战略保持同步发展。



图 6 医疗资源配置相关研究的关键词突现图

3 讨论与建议

3.1 发文量总体呈波动上升趋势,阶段性特征明显 近 20 余年期间我国医疗资源配置相关研究的发展经历了起步阶段、发展阶段、稳定发展阶段与快速发展阶段,整体呈现数量起伏但持续上涨的趋势;2000—2004 年,此时正处于“旧医改”时期,公费医疗逐渐淡出历史舞台,医疗机构开始自负盈亏,加之 2003 年 SARS 疫情的蔓延,城乡资源分配不均的问题开始浮现,缺乏有力的宏观指导使得研究增速缓慢;2005—2008 年,“实现医疗资源优化配置”这一宏观目标的提出,让相关研究逐渐开始受到重视^[15];2009—2015 年是研究的转折点,新一轮医改方案的出台使得国内众多学者围绕医

疗资源配置问题展开了更为丰富的讨论,相关研究数量稳定增加;2016—2024 年,伴随“十三五”规划的提出,《“健康中国 2030”规划纲要》等政策文件强调了要改善中国医疗资源布局不合理、基层服务能力薄弱的现状。随后 2020 年新冠疫情的暴发更是暴露出了中国当前医疗资源配置失衡的问题^[16],使得研究数量进一步跃升,如何合理配置医疗资源也成为了我国卫生领域的核心任务。结合当前国家围绕“健康中国”战略做出的各项重大部署,可以判断未来我国医疗资源配置相关研究数量仍会增加,且研究热度不减。

3.2 作者与机构间合作不够紧密 研究领域内作者群之间互动较少,尚未形成稳定、权威的研究团队。发文量 ≥ 3 篇的作者仅有 50 名,仅占作者总量的 3.33%,且同一篇文献有多名作者,即同一篇文献会被归属于不同作者名下,因此实际多发文量的作者理论上占比应更少,这也体现了当前领域缺乏核心作者,更缺乏专研固定方向的作者与团队。研究机构之间合作较少,合作机制匮乏,且呈现出了明显的地域性,各地高校多选择与当地高校、医院或政府部门进行合作,大多呈小团体分布,更多机构选择独立发文。综上表明各机构间的合作不够充分,跨区域的合作有待加强。建议区域内优势高校与相关机构加强合作,联合主办学术交流平台,构建学术合作网络,增强相互间的联系,发挥各自的学术优势,取长补短,缩小信息鸿沟,从而保证医疗资源配置相关研究的持续发展与进步。

3.3 未来发展趋势研究与判断 结合关键词共现图谱、聚类图谱等分析,可以发现当前的医疗资源配置研究呈多元化趋势,但始终围绕效率与公平性展开。从效率角度来看,研究逐步扩大到区域和全国范围,方法也从 DEA-Malmquist 等模型扩展到空间技术与组态分析,重点分析卫生支出、床位利用率、人口因素等指标。有学者从动静视角提出,提升医疗资源配置效率需缩小地区差距,确保资源有效利用^[7];也有学者从组态视角出发,梳理了内外要素对配置效率水平的影响过程,提出了医疗资源配置效率的提升路径等^[11]。为优化医疗资源配置的格局,针对分级诊疗、DRG 付费模式等的探讨是当前乃至未来研究的热点;从公平性角度来看,当前研究主要关注城乡差异与区域协调,多采用洛伦兹曲线、基尼系数等方法,耦合协调度、集聚度等方法的使用也在逐渐增多。研究内容上主要讨论卫生人力的配置、城乡间分配、对弱势群体的投入等方面的时空演变特征。有学者就从时间与空间维度探究优质医疗资源配置的变化情况,提出应构建系统发展路径,推进医疗资源扩容与区域均衡布局的建议^[4]。通过利用跨学科的方法与模型,从定量分析到定性路径的演化,是未来研究的方向。

结合上述,如何在确保城乡医疗资源配置公平均等的同时,又能照顾到弱势群体与卫生人员的切身利益,协调好区域之间经济、环境、公共服务等与医疗的发展是未来亟待解决的难题。医疗资源配置问题错综复杂,不能简单地将任务归于单个主体,需要社会各层的共同努力来探寻破局之法。因此基于我国医疗资源配置研究的现状,结合多中心治理理论,分别从政府机关、医疗机构和社会群众层面展开探讨并提出相应建议。

政府机关是医疗资源配置发展方向的指引,对引导优质医疗资源流向基层起着关键作用。但其作为经济主体与公共主体,始终面临着财政预算的约束^[17]。公平与效率是相互依赖的,过度关注弱势群体,意味着需要通过高税收或者政府补贴来支撑卫生支出,这在短期内会增加社会成本;同样,过度追求效率,意味着减少对弱势群体医疗资源的重复投入,又会加剧社会不公平。因此面对当前城乡医疗资源差距过大、区域医疗水平发展不均等的现状,需要政府与医疗市场和社会机构协同建立完整的体系,避免“各自为政”带来的医疗服务供给碎片化。通过推动紧密型、区域性的协同医疗服务,减少宏观政策、基层医疗、健康预防相分离的现象^[18],从而淡化资源投入不均对整体效率的影响,进而实现均等化。

医疗机构是医疗资源配置的核心载体,确保医疗资源高效用之于民是医疗机构的职责所在。如何利用有限的卫生资源最大限度地提升自身服务质量进而提高公众满意度是医疗机构贯彻始终的话题。对此应积极参与医联体建设,促进优势互补、资源共享的医疗服务网络构建。医疗机构之间应打破行政壁垒,加深城镇与基层医疗机构的合作,通过专科医生的分级合作和远程诊疗,让患者能够接受到更专业、更有针对性的治疗^[19];同时要重视人才队伍培养,提高自身基础医疗水平,避免推诿患者,充分利用基层医院的空闲资源,改善大医院人满为患的现状,进而提高患者对基层医疗的信任度和满意度^[20]。相较于让患者被动转诊,通过提升公众满意度使群众主动到基层就医,对实现分级诊疗的落实更为高效。

社会群众是医疗资源合理配置的受益群体,在寻求医疗服务的过程中起到主动选择与评判的作用。社会群众作为医疗资源配置的直接受益者,一方面要明确普通群众的声音更能代表广大弱势群体的心声这一原则,重视其需求与反馈意见。可以构建相关服务平台,收集社会群众的就医满意度与批评建议,也可以通过意见座谈会、议题咨询等形式让社会群众间接地参与决策过程,提高群众的参与感;另一方面要进一步推行家庭医生签约制度,丰富社区健康宣讲的形式^[12],

提升对社会群众普及分级诊疗流程与相关政策措施的效果,引导其合理就医。通过加强各主体之间的合作,进而建立适用于中国的特色医疗资源配置体系。

参考文献:

[1] 谢金亮,方鹏骞.我国医疗卫生资源省际间的配置公平性和利用效率研究[J].中国卫生经济,2013,32(1):60-62.

[2] 杨展,胡晓,陈饶,等.我国基层医疗卫生资源配置公平性研究[J].中国卫生资源,2017,20(2):106-109,122.

[3] 赵雪雁,王晓琪,刘江华,等.基于不同尺度的中国优质医疗资源区域差异研究[J].经济地理,2020,40(7):22-31.

[4] 孙瑜,吴爽,曹志辉.我国优质医疗资源配置公平性的区域差异及时空演进研究[J].中国医院,2024,28(12):29-35.

[5] 李中凯,李金叶.中国医疗资源配置效率测度及影响因素分析[J].统计与决策,2021,37(19):84-87.

[6] 续晓方,李文瑾,唐立岷,等.我国卫生资源配置效率研究——基于三阶段 DEA 模型[J].卫生经济研究,2021,38(6):23-27.

[7] 俞郑,张翔.“十四五”规划下黄河经济带医疗资源效率测度研究——基于 DEA 和 SFA 方法[J].中国卫生事业管理,2022,39(2):81-84,143.

[8] 宋之杰,张丽平,郭燕平,等.医疗资源地理配置视角下的京津冀区域分级诊疗协同发展研究[J].中国卫生经济,2018,37(3):50-53.

[9] 李继宏,劳颖谦,谢福生,等.广西临桂医共体建设中资源-医疗-医保系统协同发展研究——基于复合系统协同度模型[J].中国卫生事业管理,2024,41(6):641-644.

[10] 胡宁宁,侯冠宇.地区间医疗卫生机构资源配置公平性及影响路径分析[J].中国卫生经济,2022,41(11):48-52.

[11] 李丽清,杨苏乐,万里哈,等.基于 fsQCA 组态视角的我国医疗资源配置效率提升路径分析[J].中国全科医学,2024,27(4):413-419.

[12] 吕朋朋,杨风,罗光强,等.多中心治理理论视角下我国县域医共体建设发展研究[J].中国医院,2022,26(8):21-23.

[13] 闫伟娜.我国科普期刊研究的进展、热点与趋势——基于 CiteSpace 知识图谱的可视化分析[J].中国科技期刊研究,2024,35(2):163-170.

[14] 陈悦,陈超美,刘则渊,等.CiteSpace 知识图谱的方法论功能[J].科学学研究,2015,33(2):242-253.

[15] 贾婉文,王俊豪.基于文献计量的医疗卫生资源研究动态与重点分析[J].东北财经大学学报,2023(4):30-40.

[16] BARRON G C, LARYEA-ADJEI G, VIKE-FREIBERGA V, et al. Safeguarding people living in vulnerable conditions in the COVID-19 era through universal health coverage and social protection[J]. Lancet Public Health, 2022,7(1):e86-e92.

[17] 王清波,傅虹桥.中国卫生筹资转型的主要逻辑——一个探索性的分析框架[J].中国卫生政策研究,2024,17(6):72-79.

[18] 吴素雄,余潇,杨华.医疗卫生服务体系整合的过程、结构与治理边界:中国实践[J].浙江学刊,2022(3):54-63.

[19] 孙树学,蒋晓庆,李维昊,等.松散型医联体赋能基层医疗服务体系——组织竞合、政策激励与动态能力提升[J].公共管理学报,2021,18(3):139-151,175.

[20] 曾华堂,杜芳,巩英杰,等.广东省医疗卫生机构及其人力资源配置公平性分析[J].中国卫生经济,2021,40(8):50-55.

收稿日期:2024-12-30;修回日期:2025-01-28

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:白欣玉,梁文杰,李佳颖,等. 2020—2022 年广西疾病预防控制中心人员
流动情况分析[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 325-328.

【论著与临床报道】

2020—2022 年广西疾病预防控制中心人员流动情况分析

白欣玉¹, 梁文杰², 李佳颖², 黄倩薇², 张欣梅², 张菲谊², 马贞玉², 陈国湘²

(1. 广西医学科学院, 广西壮族自治区人民医院, 广西 南宁 530021;

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 掌握广西全区疾病预防控制中心人员流入和流出情况, 了解广西医学院培养医学人才就职于区内疾控中心的现状, 以期为未来广西疾控人才队伍建设提供科学的依据。方法 向全区 122 个疾控中心和 19 所开设医学专业的高校发放调查问卷, 对广西疾控中心人员流动情况和医学院校毕业生区内就业状况进行统计分析。结果 2020—2022 年全区疾控中心流入人数大于流出人数, 但是流入人员的人力综合素质评分低于流出人员, 仅有 23.33% 流出人员仍留在疾控机构。医学院校方面, 高职学历毕业生就业于县级疾控中心占比最大(54.48%); 本科学历毕业生就业于市级疾控中心占比最大(50.35%), 硕士和博士毕业生就职于疾控中心的数量较少。在区内疾控中心就业医学学生的专业中, 医学技术类占比最大(29.59%), 其次是公共卫生与预防医学类(26.56%)。结论 广西疾控中心人才流失状况较为严峻, 地方医学院校毕业生在区内疾控中心就业的高层次人才较少。疾控中心和地方医学院校培养单位应建立长期的合作机制, 为稳定疾控中心人才队伍建设共同努力。

关键词:疾病预防控制中心; 人力资源; 流动; 医学院校

中图分类号: R192

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0325-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.021

Analysis of staff mobility in Guangxi Center for Disease Control and Prevention from 2020 to 2022

BAI Xinyu¹, LIANG Wenjie², LI Jiaying², HUANG Qianwei², ZHANG Xinmei²,
ZHANG Feiyi², MA Zhenyu², CHEN Guoxiang²

(1. *Guangxi Academy of Medical Sciences, The People's Hospital of
Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, China;*

2. *Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China*)

Abstract: **Objective** To assess the inflow and outflow of staff at Center for Disease Control and Prevention (CDC) in Guangxi, and to understand the current employment situation of medical graduates from local colleges and universities in regional CDC, so as to provide a scientific basis for the future construction of the talent team of disease control in Guangxi. **Methods** Questionnaires were distributed to 122 CDC and 19 universities offering medical majors across the region, and statistical analyses were conducted on the staff mobility at CDC in Guangxi and the employment status of graduates from medical colleges and universities within the region. **Results** From 2020 to 2022, the number of inflow staff at CDC across the region exceeded the number of outflow staff, and the overall human resource quality scores of inflow staff was lower than that of outflow staff, with only 23.33% of outflow staff remaining in disease control institutions. Regarding medical colleges and universities, graduates with junior college degrees had the largest proportion of employment in county-level

基金项目: 广西教育科学规划 2021 年度广西大学生就业研究专项课题重点项目(2021ZJY1117)

第一作者: 白欣玉, 硕士, 公共卫生医师, 研究方向: 社会医学, E-mail: bai_xinyu2020@163.com

通讯作者: 陈国湘, 副教授, 研究方向: 社会医学, E-mail: chenguoxiang@gxmu.edu.cn

CDC (54.48%); graduates with bachelor's degrees had the largest proportion of employment in municipal CDC (50.35%), while the number of master's and doctoral graduates employed in CDC was relatively small. Among the majors of medical students employed in CDC within the region, medical technology accounted for the largest proportion (29.59%), followed by public health and preventive medicine (26.56%). **Conclusion** The brain drain situation at CDC in Guangxi is relatively severe, with a small number of high-level talents from local medical colleges and universities employed in CDC within the region. CDC and local medical colleges and universities should establish long-term cooperation mechanisms to jointly strive for the stabilization of the talent team at CDC.

Key words: Center for Disease Control and Prevention; human resources; mobility; medical colleges and universities

疾病预防控制中心 (Center for Disease Control and Prevention, CDC) 是政府设置的从事公共卫生服务的公益性事业单位, 通过对疾病、残疾和伤害的预防控制, 创造健康环境, 维护社会稳定, 保障国家安全, 促进人民健康^[1]。在全国各类医疗卫生机构人员流失情况调查中发现, CDC 的人员流失率、转行率等指标均持续处于高位, 且逐渐上升^[2], 这将可能造成疾控中心人才梯队建设损失, 影响我国公共卫生事业的发展^[3]。CDC 的人员配置决定当地公共卫生服务能力和服务水平, 2023 年国务院办公厅印发《关于推动疾病预防控制事业高质量发展的指导意见》^[4] 提出要加强各地疾控机构的人才队伍建设。地方医学院校肩负着为地方培养专业技术人才的重任, 关系到地方人群健康和社会的持续发展^[5], 地方医学院校培养的医学生对当地 CDC 的人才队伍建设至关重要。为了进一步掌握广西全区 CDC 人员流入和流出状况, 了解广西医学院校培养医学人才就职于区内 CDC 的情况开展本次研究, 以期对未来广西 CDC 人才队伍建设提供科学的依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本次调查研究涉及广西全区 CDC 122 个, 其中自治区级 1 个, 市级 14 个, 县(区)级 107 个。调查 19 所开设有医学专业的高校, 其中公办高校 13 所, 民办高校 6 所。

1.2 资料来源 向全区 122 个疾控中心发放自制调查问卷, 共回收 732 份问卷, 包括《疾病预防控制中心人员流入情况调查表》(2020—2022 年) 366 份, 《疾病预防控制中心人员流出情况调查表》(2020—2022 年) 366 份, 回收率 100%, 合格率为 100%。通过问卷调查广西开设医学专业高校, 获得医学类高校毕业生就业情况。

1.3 研究方法 参考以往研究, 人力素质综合评分得分越高代表综合素质越高, 人力素质综合评分(W)=α×教育程度得分(E)+β×职称得分(T), 受教育程度的权重 α 为 0.71, 职称的权重 β 为 0.29^[6-8]。受教育

程度标准转化: 研究生及以上 12 分, 大学本科 9 分, 大专 6 分, 中专及以下 3 分; 职称标准化转化: 高级 15 分, 中级 10 分, 初级 5 分, 无职称 0 分。

2 结果

2.1 广西 CDC 人才流动基本情况 2020—2022 年全区 CDC 流入人数 1 944 人, 流出人数 643 人, 流入人员数多于流出人员数。流入和流出人员均为女性、年轻人(35 岁以下)、本科学历、公共卫生与预防医学类专业、初级及以下职称、有编制、卫生专技岗占比较大。见表 1。根据人力素质综合评分法计算, 2020—2022 年流入人员人力素质综合评分为 6.89, 流出人员人力素质综合评分为 7.53。流入来源主要是应届毕业生(27.93%), 其次是医疗机构(24.38%)和社会招聘(19.80%)。人才流出去向主要是医疗卫生机构, 占 36.39%; 其次是疾控机构(23.33%)、公务员和其他事业单位(21.46%)。如表 2 所示。

表 1 2020—2022 年全区 CDC 人才流动及构成情况

分类	流入人数 (n=1944)	构成 比/%	流出人数 (n=643)	构成 比/%
年份				
2020	535	27.52	211	32.81
2021	621	31.94	211	32.81
2022	788	40.53	221	34.37
性别				
男	554	28.50	209	32.50
女	1390	71.50	434	67.50
年龄/岁				
<25	511	26.29	45	7.00
25~34	1075	55.30	361	56.14
35~44	269	13.84	168	26.13
45~54	73	3.76	59	9.18
≥55	16	0.82	10	1.56
学历				
博士	2	0.10	6	0.93
硕士	71	3.65	50	7.78
本科	1366	70.27	412	64.07
大专	470	24.18	159	24.73
中专及以下	35	1.80	16	2.49

表 1(续) 2020—2022 年全区 CDC 人才流动及构成情况

分类	流入人数 (<i>n</i> = 1944)	构成 比/%	流出人数 (<i>n</i> = 643)	构成 比/%
专业				
公共卫生与预防医学类	725	37.29	210	32.66
医学技术类	383	19.70	104	16.17
护理学类	226	11.63	73	11.35
临床医学类	175	9.00	91	14.15
中医学类	15	0.77	5	0.78
其他	420	21.60	160	24.89
职称				
高级	44	2.26	67	10.42
中级	236	12.14	110	17.11
初级	759	39.04	285	44.32
无职称	905	46.55	181	28.15
是否有编制				
否	506	26.03	265	41.21
是	1438	73.97	378	58.79
岗位				
卫生专技岗	1618	83.23	541	84.14
管理岗	127	6.53	52	8.09
其他专技岗	199	10.24	50	7.78

表 2 2020—2022 年全区 CDC 人才流入来源和流出去向

项目	人数	构成比/%
流入来源	1944	
应届毕业生	543	27.93
医疗卫生机构	474	24.38
社会招聘	385	19.80
其他疾控机构	253	13.01
机关、企业、其他事业单位	134	6.89
人才引进	68	3.50
军转	8	0.41
其他	79	4.06
流出去向	643	
医疗卫生机构	234	36.39
其他疾控机构	150	23.33
公务员或其他事业单位	138	21.46
继续深造	16	2.49
企业	13	2.02
其他	22	3.42
不清楚	70	10.89

2.2 广西医学类院校毕业生在区内 CDC 就业情况
广西医学院校培养毕业生在区内 CDC 就业占区内就业的 3.15%(1 024/32 518),就业层次是本科毕业生(83.79%,858/1 024)占比最大。高职学历毕业生就业于县级疾控中心占比最大(54.48%,79/145);本科学历毕业生就业于市级疾控中心占比最大(50.35%,

432/858),硕士和博士毕业生就职于疾控中心的数量较少,见表 3。广西医学院校培养毕业生在区内 CDC 就业专业中,医学技术类(29.59%,303/1 024)占比最大,其次是公共卫生与预防医学类(26.56%,272/1 024),见表 4。2020—2022 年公共卫生与预防医学就业人数共计 1 393 人,19.53%就业于区内 CDC。

表 3 2020—2022 年广西医学类院校不同层次毕业生在区内 CDC 就业情况

年份	高职毕业生				本科毕业生				硕士毕业生				博士毕业生
	县级	市级	省级	合计	县级	市级	省级	合计	县级	市级	省级	合计	
2020	23	15	3	41	60	100	50	210	0	3	1	4	0
2021	23	20	1	44	115	157	43	315	0	6	2	8	0
2022	33	22	5	60	84	175	74	333	0	6	1	7	2
合计	79	57	9	145	259	432	167	858	0	15	4	19	2

表 4 2020—2022 年广西医学类院校毕业生在区内 CDC 就业情况

专业	县级 (<i>n</i> = 338)	市级 (<i>n</i> = 504)	省级 (<i>n</i> = 182)	合计 (<i>n</i> = 1024)
公共卫生与预防医学	71	190	11	272
医学技术	109	151	43	303
护理学	31	45	26	102
中医学	67	55	55	177
其他	60	63	47	170

3 讨论

人力资源是提升疾病预防控制中心机构服务能力的关键因素,而年龄、学历和职称是评价人力资源质量的重要指标^[9-10]。以往研究显示,在新冠疫情发生前全国 CDC 人员的数量下降,年均增长率出现负值^[11-12]。本次调查 2020—2022 年 CDC 的流入人员数

大于流出人员数,与其他新冠期间的研究结果相似^[13]。这主要可能是因为在新冠疫情期间,政府和社会高度重视公共卫生人才队伍建设的问题,不断扩大 CDC 的人才队伍。流入和流出人员均以本科学历、年龄在 35 岁以下和有编制的占比最大。这可能是因为部分年轻人因编制的原因而选择去 CDC 工作,而受过高层次教育的年轻人有较高的职业发展目标和收入预期,在进入 CDC 工作后因面临工资水平和社会地位较低,职业发展机会不清晰等原因而辞职^[12,14]。另外,本研究中流入人员人力综合素质评分低于流出人员,与陈浩等^[14]对全国 CDC 人员流动调查的结果一致。这提示在未来 CDC 人才队伍建设中,除了扩大人员队伍的数量,同时要考虑人员队伍的质量。留住人才和稳定队伍是 CDC 发展不容忽视的问题^[14]。CDC 流出人

员去向为医疗机构的占比最大,仅有 23.33%流出人员仍留在疾控机构。与以往研究结果相似,这可能是因为 CDC 薪酬待遇偏低,留不住人才,导致骨干人才流失严重^[3]。

2020—2022 年,广西 CDC 流入人员以应届毕业生占比最大,高职学历医学院校毕业生就业于县级的疾控中心占比最大,本科学历就业于市级占比最大,硕士和博士毕业生就职数量较少。县级 CDC 承担最基础也是最具体的疾病预防控制任务^[15],但是医学本科及以上学历的医学毕业生就业于县级疾控中心的占比较小,未来应重点加强基层 CDC 现有人才培训和进行继续教育^[16],不断提高基层机构的人才队伍素质。针对硕士和博士毕业生就职于 CDC 数量较少的问题,应建立高层次、急需紧缺人才待遇保障机制^[17],吸引高层次人才就职,保证队伍的人才储备。公共卫生与预防医学专业的医学生是从事公共卫生相关工作的主力军,但是仅 19.53%的公共卫生与预防医学专业的医学生就业于 CDC。李佳迪等^[18]对 357 名公共卫生与预防医学的研究生进行调查发现,接受学校就业指导工作较充分的研究生在 CDC 就业意愿越高,就业薪资期望较高的学生去 CDC 就业的意愿相对较低。医学院校作为人才培养的基地,在医学生选择就业方向时也发挥着关键作用。学校在开展就业指导时,应增加公共卫生相关专业学生对 CDC 机构及相关工作的了解。另一方面,地方政府部门应积极落实《关于推动广西疾病预防控制事业高质量发展实施方案》文件精神,按照“两个允许”要求,适当突破现行绩效工资总量调控水平,结合本地实际和考核结果按一定比例提高疾控机构绩效工资基准线^[17],切实提高和保障 CDC 人员的薪酬待遇。

广西 CDC 人才流失状况较为严峻,地方医学院校毕业生在区内 CDC 就业的高层次人才较少。为了未来更好的应对突发公共卫生事件和全球卫生挑战,需要加大公共卫生人才培养力度,优化人才结构^[19]。疾控中心用人单位和医学院校培养单位应建立长期的合作机制,为稳定 CDC 人才队伍建设共同努力。本研究调查时间为新冠疫情流行期间,相关结果的推广有一定的局限性。

参考文献:

[1] 郭利娜,丁凡,席晶晶.全国疾病预防控制机构人力资源发展现状分析[J].中国公共卫生管理,2020,36(2):158-161.

[2] 段博珩,张光鹏,曾献军.我国医疗卫生机构人员流失情况分析[J].中华医院管理杂志,2022,38(6):425-428.

[3] 郭利娜,李南南,席晶晶.我国疾病预防控制中心人员流

出情况分析[J].中国公共卫生,2021,37(5):860-864.

[4] 国务院办公厅.国务院办公厅关于推动疾病预防控制事业高质量发展的指导意见[EB/OL]. [2024-11-16]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202312/content_6922484.htm.

[5] 曹有容,梁文杰,白欣玉,等.基于灰色模型的广西高等医学院校研究生培养规模预测分析[J].广西医科大学学报,2022,39(12):2026-2030.

[6] 张春华,肖义夫,张华东.2016—2021 年重庆市疾控系统人力资源配置及公平性评价[J].中国农村卫生事业管理,2024,44(6):403-407.

[7] 汪华,于竞进,苏海军,等.2002—2005 年中国疾病预防控制体系人力流动特征分析[J].中国公共卫生管理,2007,23(2):101-105.

[8] 刘昆仑,高燕,晋灿瑞,等.中国疾病预防控制中心某直属事业单位人员流动情况分析[J].中国公共卫生管理,2015,31(3):327-329.

[9] 单莹,刘广文,李士雪.2009—2019 年我国疾病预防控制中心人员配置时空分析[J].中国卫生经济,2022,41(3):46-50.

[10] 刘洪霞,傅毅青,董莉薇,等.1998—2018 年上海市疾病预防控制中心人力资源动态分析[J].中国卫生资源,2019,22(4):290-294,299.

[11] 陈浩,豆晓丽,闫丽娜,等.我国疾病预防控制中心人员流动情况分析[J].上海预防医学,2017,29(1):8-10.

[12] 闫丽娜,史言菲,安佰悦,等.基于人才集聚效应的疾病预防控制中心机构人才队伍配置现状分析[J].中国公共卫生管理,2023,39(2):165-169.

[13] 陆盛华,周信,唐恺,等.新冠疫情背景下某地市级疾控机构人才队伍建设调查与研究[J].江苏卫生事业管理,2023,34(4):457-460.

[14] 陈浩,熊勇超,王园,等.2011—2015 年全国省级疾病预防控制中心人员流动情况分析[J].中国公共卫生管理,2018,34(2):185-188.

[15] 金雅玲,王子军,张一平,等.全国区县级疾病预防控制中心 2014—2018 年基本情况分析[J].中国公共卫生管理,2020,36(3):289-292.

[16] 陈少锋.某省级疾控中心 2018 年—2022 年人力资源流动分析[J].江苏卫生事业管理,2023,34(10):1339-1341,1349.

[17] 广西壮族自治区人民政府.广西壮族自治区人民政府办公厅印发《关于推动广西疾病预防控制事业高质量发展实施方案》的通知[EB/OL]. [2024-11-16]. <http://www.gxzf.gov.cn/zfwj/zxwj/t18623082.shtml>.

[18] 李佳迪.公共卫生与预防医学研究生就业意愿现状及影响因素研究[D].长春:吉林大学,2022.

[19] 吴群红.我国新质公共卫生人才需求、培养困境及应对策略[J].广西医科大学学报,2025,42(2):163-167.

收稿日期:2024-12-12;修回日期:2025-01-17

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:黄麟荣,黄衍强.百色市某医院女性生殖道沙眼衣原体、解脲支原体和淋病奈瑟菌感染的分析[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):329-334.

【论著与临床报道】

百色市某医院女性生殖道沙眼衣原体、解脲支原体和淋病奈瑟菌感染的分析

黄麟荣¹, 黄衍强²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 分析广西百色市就诊及健康体检女性生殖道沙眼衣原体(CT)、解脲支原体(UU)和淋病奈瑟菌(NG)感染流行情况及感染特征,并为女性生殖道感染防控提供参考依据。方法 在右江民族医学院附属医院收集 2021 年 9 月至 2024 年 9 月 4 181 例阴道分泌物标本,用 RT-PCR 方法检测 CT、UU 和 NG 的 DNA,分析女性生殖道感染构成和临床特征。结果 4 181 例患者中 CT、UU 和 NG 检出率分别为 7.87%(329/4 181)、53.89%(2 253/4 181)和 1.41%(59/4 181);CT 和 NG 感染主要集中在<25 岁前年龄段,UU 主要分布集中在<25 岁前和 25~50 岁的年龄段;CT 和 UU 感染人群主要为妊娠和阴道炎,NG 感染主要见于尿道炎患者。结论 本研究育龄妇女 CT、NG 和 UU 检出率较高,应加强青少年女性性传播疾病防治工作,且感染与妊娠和阴道炎关系较为密切,应加强育龄妇女的生殖健康教育。

关键词:生殖道;沙眼衣原体;解脲支原体;淋病奈瑟菌

中图分类号:R691.3;R446.5

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0329-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.022

Analysis of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in the female genital tract at a hospital in Baise City

HUANG Linzhu¹, HUANG Yanqiang²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Youjiang Medical

University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To analyze the epidemiological situation and infection characteristics of *Chlamydia trachomatis* (CT), *Ureaplasma urealyticum* (UU), and *Neisseria gonorrhoeae* (NG) infections in the genital tract of women who visited hospitals for medical treatment or underwent health check-ups in Baise City, Guangxi, and to provide a reference basis for the prevention and control of genital tract infections in females.

Methods A total of 4 181 vaginal secretion specimens were collected from September 2021 to September 2024 at the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities. The DNA of CT, UU, and NG was detected using the RT-PCR method, and the composition and clinical characteristics of female genital tract infections were analyzed.

Results Among the 4 181 patients, the detection rates of CT, UU, and NG were 7.87% (329/4 181), 53.89% (2 253/4 181), and 1.41% (59/4 181), respectively; CT and NG infections

基金项目:国家自然科学基金项目(32060018)

第一作者:黄麟荣,在读硕士研究生,研究方向:临床流行病学,E-mail:852738103@qq.com

通讯作者:黄衍强,教授,博士,硕士研究生导师,研究方向:耐药微生物感染的防治研究,E-mail:hyq77615@163.com

were mainly concentrated in the age group <25 years, while UU was mainly distributed in the age groups <25 years and 25 to 50 years. The population infected with CT and UU was mainly composed of pregnant women and those with vaginitis, whereas NG infection was mainly seen in patients with urethritis. **Conclusion** The detection rates of CT, NG, and UU are relatively high among women of childbearing age in this study. Therefore, efforts should be strengthened to prevent and treat sexually transmitted diseases in adolescent females. Additionally, since the infections are closely related to pregnancy and vaginitis, genital health education for women of childbearing age should be enhanced.

Key words: genital tract; *Chlamydia trachomatis*; *Ureaplasma urealyticum*; *Neisseria gonorrhoeae*

生殖道感染是影响生育期女性生殖健康的常见疾病,性传播及不良卫生行为可引起生殖道多种病原微生物的感染。沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)、解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)是较常见的性传播疾病的病原体,其单独或者混合感染均可引起不同程度的女性生殖系统各器官炎症。作为条件致病菌可在育龄妇女的阴道内广泛存在,在生育年龄妇女身体抵抗力较低时诱发炎症反应,进而导致早产、死胎、异位妊娠及流产等不良妊娠结局^[1]。病原体核酸检测具有较高灵敏性和特异性,检测便捷、快速,已广泛用于呼吸道、宫颈、尿液等标本的病原体检测。本研究对百色市某医院 CT、NG、UU 女性生殖道感染进行核酸检测,了解该地区女性生殖道感染流行及分布特点,分析相关临床特征,为女性生殖道感染疾病的有效筛查及防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 调查对象 收集 2021 年 9 月至 2024 年 9 月就诊于右江民族医学院附属医院,疑是生殖道感染的住院、门诊及健康查体人群的阴道分泌物样本 4 181 例,最小年龄 14 岁、最大年龄 78 岁,使用阴道拭子法收集标本(将拭子放置于阴道后穹隆 10~15 s,采集阴道分泌物,将拭子从阴道中取出并放入病毒培养基中)。同时收集患者是否妊娠以及诊断其它疾病等临床资料进行研究分析,所有研究对象均进行 CT、UU 和 NG 三项病原体检测。纳入标准:①患者及家属知情同意;②所有检测患者均有性生活史;③标本收集处于非月经期;④标本收集前 3 日内无阴道冲洗或置药。排除标准:①有自身免疫性疾病或肝肾功能不全;②意识障碍或精神病患者;③检测前两周内使用抗生素治疗者;④临床资料不全者。

1.2 标本 PCR 检测 使用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对所收集的阴道拭子标本进行检测,实验设置如下:37 ℃×2 min;94 ℃×15 s→60 ℃×60 s,循环 40 次,每次试验均按试剂盒提供的定量阳性标准品做标准曲线,同时设置阴性、空白对

照;单点荧光检测在 60 ℃反应体系为 40 μL,荧光通道选用 FAM 通道。根据收集的实时荧光曲线和扩增循环阈值(Cycle Threshold, Ct)判定结果,检测样本低于检测限为阴性;样本检测 Ct 值≤38,且扩增曲线呈典型 S 型为阳性;样本 Ct 栏显示在 38~40 之间,需重复测定,如仍在 38~40 之间,且扩增曲线呈典型的 S 型,则判断为阳性,非典型 S 型曲线,则判为阴性。

1.3 统计学方法 数据管理使用 Microsoft Excel 2019 进行,包括数据的录入、清理和初步整理。所有数据均进行了严格的核对,以确保准确性和完整性。统计分析使用 R 语言(版本 4.4.0)进行,计数资料数据用百分比(%)表示,计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。对计数资料进行 χ^2 检验。对小样本或预期频数<5 的分类变量进行 fisher 精确检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。韦恩图使用 VennDiagram 包(版本 1.6.0),其他图形使用 ggplot2 包(版本 3.5.1)绘制。

2 结果

2.1 不同临床诊断病例构成比及 CT、NG、UU 的检出率 4 181 例检测病例中 3 592 例为妊娠或伴有宫颈炎、宫颈上皮内病变、宫颈癌、阴道炎、盆腔炎等妇科相关疾病,查体健康 183 例、尿路感染 17 例、其他非妇科疾病 389 例。CT 检出率 7.87%(329/4 181)、NG 检出率为 1.41%(59/4 181)、UU 检出率为 53.89%(2 253/4 181),CT 和 UU 双重感染率为 10.38%、CT、UU 和 NG 三重感染率为 0.55%。在 329 例 CT 感染中,妊娠占比最高为 34.35%(113/329),其次为阴道炎 22.80%(75/329)和盆腔炎 11.55%(38/329);在 59 例 NG 感染中,妊娠占 27.12%(16/59),其次为阴道炎 18.64%(11/59)和盆腔炎 13.56%(8/59);在 2 253 例 UU 感染中,妊娠占 26.94%(607/2 253),其次为阴道炎 23.88%(538/2 253)和子宫肌瘤 10.87%(245/2 253),3 种病原体感染的共同临床特征主要见于妊娠和阴道炎的病例(见表 1 和图 1)。其中,3 种病原体发生共感染的 13 例患者中,包括 4 例妊娠和 4 例阴道炎病例;UU 感染率最高且主要分布于妊娠和阴道炎病例(见图 2)。

表 1 不同年份的感染与临床特征

特征	合计(<i>n</i> =4181)	CT(<i>n</i> =329)	NG(<i>n</i> =59)	UU(<i>n</i> =2253)
年份				
2021 年	291(6.96)	19(5.78)	7(11.86)	162(7.19)
2022 年	917(21.93)	58(17.63)	15(25.42)	451(20.02)
2023 年	2178(52.09)	197(59.88)	27(45.76)	1195(53.04)
2024 年	795(19.01)	55(16.72)	10(16.95)	445(19.75)
年龄/岁	37.84±10.92	32.55±10.50	35.32±11.80	37.06±10.01
诊断结果				
宫颈癌	109(2.61)	5(1.52)	2(3.39)	47(2.09)
宫颈上皮内病变	8(0.19)	2(0.61)	0(0.00)	4(0.18)
宫颈炎	153(3.66)	18(5.47)	4(6.78)	86(3.82)
健康查体	183(4.38)	13(3.95)	1(1.69)	105(4.66)
流产	94(2.25)	6(1.82)	0(0.00)	39(1.73)
尿路感染	17(0.41)	0(0.00)	1(1.69)	9(0.40)
盆腔炎	377(9.02)	38(11.55)	8(13.56)	217(9.63)
其他	389(9.30)	26(7.90)	6(10.17)	199(8.83)
妊娠	1133(27.10)	113(34.35)	16(27.12)	607(26.94)
阴道炎	974(23.30)	75(22.80)	11(18.64)	538(23.88)
子宫肌瘤	441(10.55)	17(5.17)	5(8.47)	245(10.87)
子宫内膜癌	35(0.84)	1(0.30)	1(1.69)	8(0.36)
子宫内膜异位症	20(0.48)	3(0.91)	0(0.00)	13(0.58)
子宫内膜增生	172(4.11)	10(3.04)	3(5.08)	97(4.31)
子宫腺肌症	76(1.82)	2(0.61)	1(1.69)	39(1.73)

注:表内计数资料数据用[*n* (%)]表示,计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

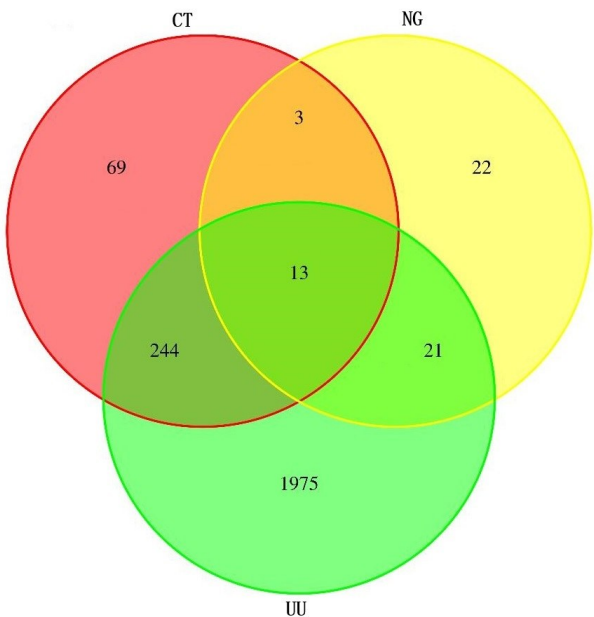


图 1 3 种病原体阴道共感染情况分布

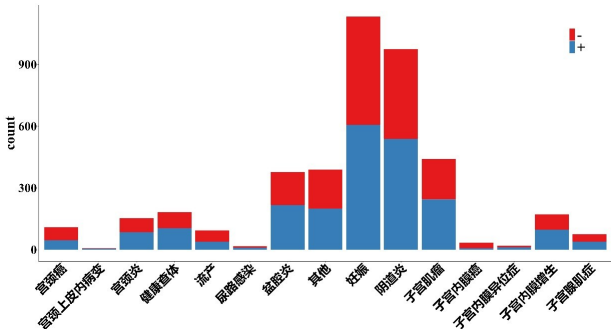


图 2 不同类型患者群体 UU 体感染情况

2.2 不同年份生殖道感染的情况 2021 年、2022 年、2023 年和 2024 年 CT 的检出阳性率比较差异具有统计学意义(*P* <0.05),其中 2023 年的阳性检出率更高;NG 检出率各年份阳性检出率差异无统计学意义(*P* >0.05);UU 阳性检出率差异有统计学意义(*P* <0.05),在 2022 年阳性检出率更低,见表 2 和图 3。

表 2 不同年份女性生殖道病原体感染情况

感染情况	合计(<i>n</i> =4181)	2021 年(<i>n</i> =291)	2022 年(<i>n</i> =917)	2023 年(<i>n</i> =2178)	2024 年(<i>n</i> =795)	χ^2	<i>P</i>
CT						8.882	0.031
—	3852(92.13)	272(93.47)	859(93.68)	1981(90.96)	740(93.08)		
+	329(7.87)	19(6.53)	58(6.32)	197(9.04)	55(6.92)		
NG						2.995	0.392
—	4122(98.59)	284(97.59)	902(98.36)	2151(98.76)	785(98.74)		
+	59(1.41)	7(2.41)	15(1.64)	27(1.24)	10(1.26)		

表 2(续) 不同年份女性生殖道病原体感染情况

感染情况	合计 (<i>n</i> = 4181)	2021 年 (<i>n</i> = 291)	2022 年 (<i>n</i> = 917)	2023 年 (<i>n</i> = 2178)	2024 年 (<i>n</i> = 795)	χ^2	<i>P</i>
UU						10.777	0.013
—	1928(46.11)	129(44.33)	466(50.82)	983(45.13)	350(44.03)		
+	2253(53.89)	162(55.67)	451(49.18)	1195(54.87)	445(55.97)		

注:表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

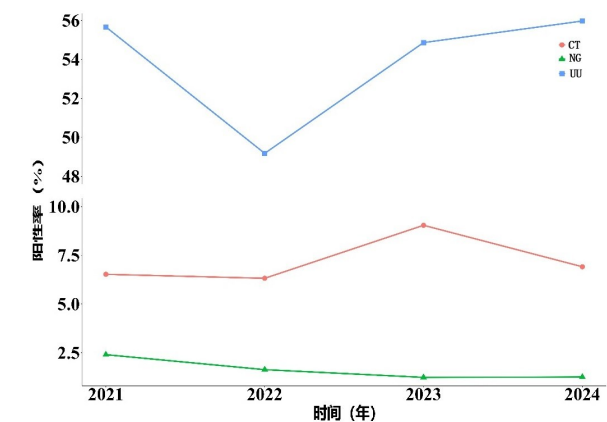


图 3 不同年份女性生殖道病原体感染情况

3.3 不同年龄段病原体感染分布情况 CT 和 NG 在 <25 岁年龄段阳性检出率明显高于 25~50 岁和 50 岁以上年龄段人群,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),说明 CT 和 NG 感染主要集中于 25 岁前年龄段青少年女性;UU 分别在 25 岁前、25~50 岁、50 岁以上年龄段检出率,25 岁前和 25~50 岁年龄段 UU 感染率明显高于 50 岁以上年龄段女性,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),提示 UU 感染女性主要集中于 14~50 岁的年龄段,50 岁以后年龄段女性感染率明显降低(见表 3 和图 4)。

表 3 不同年龄段病原体生殖道感染情况

感染情况	合计 (<i>n</i> = 4181)	<25 岁 (<i>n</i> = 426)	25~50 岁 (<i>n</i> = 3177)	50 岁~ (<i>n</i> = 578)	χ^2	<i>P</i>
CT					122.952	<0.001
—	3852(92.13)	336(78.87)	2958(93.11)	558(96.54)		
+	329(7.87)	90(21.13)	219(6.89)	20(3.46)		
NG					15.908	<0.001
—	4122(98.59)	411(96.48)	3142(98.90)	569(98.44)		
+	59(1.41)	15(3.52)	35(1.10)	9(1.56)		
UU					31.861	<0.001
—	1928(46.11)	178(41.78)	1422(44.76)	328(56.75)		
+	2253(53.89)	248(58.22)	1755(55.24)	250(43.25)		

注:表内计数资料数据用[*n*(%)]表示。

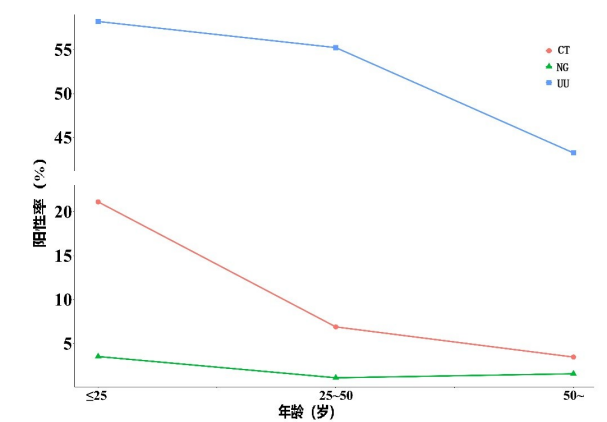


图 4 不同年龄段病原体生殖道感染情况

之间的解剖特点,易受各种病原体的侵入而发生感染,尤其育龄妇女感染是诱发阴道炎、宫颈炎、盆腔炎等多种妇科疾病,并可导致女性不孕症和不良的妊娠结局。CT 是一种细胞内寄生的原核细胞型微生物,根据其主 要外膜蛋白分为不同血清型,其中 A-C 血清型主要引起眼部感染,而 D-K 血清型可感染生殖道且多达 70% 的女性感染者无症状,感染后易合并多重感染而引起子宫内膜炎、输卵管炎、盆腔炎等,表现为下腹痛、腰痛、性交痛、阴道异常出血、分泌物异常等。UU 是一类没有细胞壁、具有高度多形性和自主复制的病原微生物,女性感染后主要寄居于阴道及宫颈黏膜上皮细胞表面,引起阴道炎、宫颈炎、盆腔炎和不孕等,而孕妇感染也可导致流产、胎儿发育迟缓等不良后果。淋病奈瑟菌是一种致病性强的革兰阴性双球菌,感染率高,约 60% 女性淋病无症状或症状轻微,严重感染者表现

为宫颈炎和阴道流脓,化脓性输卵管炎、盆腔炎,可导致不孕或宫外孕。吴满武等^[2]在不孕不育症与健康夫妇的生殖道 CT、UU 和 NG 感染的对照研究中发现,不孕不育组 UU 感染率明显高于对照组,提示生殖道 UU 感染可能与不孕不育的发生密切相关。研究发现,UU 可分泌磷酸脂酶 A,进而分解胎膜的花生四烯酸,诱使子宫平滑肌异常收缩,而 CT 可促进巨噬细胞释放溶酶体酶并降解胎膜组织,妊娠期 CT、UU 的生殖道感染可引起胎儿早产、发育停滞、胎儿窘迫和新生儿窒息等不良妊娠结果,对已感染孕妇积极治疗,预防和改善不良妊娠结局^[3-4]。

国内报道女性生殖道 CT、UU 和 NG 感染率存在较大差异,据李瑞等^[5]统计分析,我国广东 CT 感染率为 9.89/1 000,人口密度高、人口流动性大的区域感染率越高。浙江台州地区女性 CT、UU 和 NG 感染率分别为 6.40%、63.61%和 2.36%,青壮年阳性检出率较高,随着年龄增加 CT 检出率逐渐降低,CT 感染人群主要集中在 16~24 岁年龄段,是人群筛查的重点,进行青少年早期教育和系统筛查很有必要^[6]。许志定等^[7]对广东罗定地区检测,结果为 CT 10.2%、UU 41.7%、NG 4.8%,CT 感染无季节性,而 UU 感染以冬季最高,NG 感染以秋季最高,有明显季节性。

本研究通过对本院 4 181 例疑似生殖道感染就诊和体检女性进行阴道分泌物 CT、UU 和 NG 实时荧光 PCR 核酸检测,结果发现 UU 检出率最高,其次为 CT,NG 最低,这与彭契六等^[8]对广西南宁地区的感染研究结果较为接近。这可能与女性生殖道缺乏胆固醇和尿素,UU 更易于感染和复制,且女性感染者大多无明显症状,易于造成感染持续和反复感染。进一步分析发现,CT 和 UU 在阴道炎和妊娠病例检出率最高,这可能与生育期性生活频繁,感染机会大有关,妊娠期女性由于激素的变化、生殖道分泌物增多而局部免疫功能下降,有利于病原体生长繁殖。这提示对有阴道分泌物增多或异常以及妊娠的女性是临床重点筛查的人群,做到早发现、早诊断和及早干预治疗。NG 则在尿道炎患者检测率最高,可能与女性阴道与尿道口邻近的解剖特点有关,提示临床医生对于以尿路感染为主要症状就诊的女性,应同时进行阴道分泌物 NG 的检测,以免生殖道淋球菌感染患者漏诊。

对不同年龄段人群的感染情况分析显示,CT、UU 和 NG 检出率最高的均为 25 岁前年龄段,提示青少年性行为趋于低龄化,缺乏性病防治知识和自我保护意识,应加强对青少年健康知识的宣传教育。CT、UU 和 NG 多分布在 14~24 岁,该年龄段人群处于性活跃期、流动性大,为性传播疾病的易感者,也是性传播疾病防治的重点人群。UU 感染在 25~50 岁年龄段略

低于 14~24 岁年龄段,50 岁以后检出率明显下降,说明相对于 CT 和 NG,UU 感染的年龄段更宽泛,这可能与 UU 能够分解尿素产氨的生物学特性及其自身降解的产物可使感染局部微环境 pH 值升高,从而促进生长和繁殖有关;另一方面,UU 对多种抗生素存在耐药导致感染持续或反复感染有关^[9],提示临床医生对 UU 感染患者治疗药物选择和治疗后复查核酸检测的必要性。

本研究结果发现,在所有检测标本中 CT 和 UU 二重感染 244 例,三重感染 13 例。二重感染或三重感染对患者的危害比单一感染更严重,是患者临床治疗不彻底,反复发作的原因之一,应将其作为性传播疾病防治的重点人群。由于女性生殖道 CT、UU 和 NG 感染的患者临床表现轻微或无症状,多个性伴侣和性卫生缺失是多重感染的风险,应加强青少年个人卫生和性健康教育。临床上,对混合感染或反复感染的病例应加强筛查和选择不同的治疗方案^[10]。本研究结果显示,CT 在 2023 年的检出率高,UU 在 2022 年检出率低,而 NG 检出各年份差异无统计学意义,呈现稳定低感染流行特点,文献显示,国内 NG 检出率 0.9%~2.2%之间^[11-12],可能与 NG 在女性生殖道感染多无明显症状且易于发生耐药而持续存在的结果。国内文献报道,CT 和 NG 感染无明显季节性^[13],而春夏季 UU 检出率明显高于秋冬季^[14]。本文检测对象地处亚热带,春夏季高温持续时间长,冬季低温时间短,地区间存在季节差异大的特点,且本组收集从 2021 年 9 月至 2024 年 9 月的检测病例,结果可能存在一定的差异。

综上所述,CT、UU 和 NG 三者均以青年女性感染为主要人群,应加强各年龄段的性卫生健康教育,临床医生在诊断女性生殖系统疾病时,应同时检测这 3 种病原体,尤其是对无症状携带者和妊娠妇女的筛查。

参考文献:

[1] 闫青,郝芙蓉. 阴道解脲支原体和沙眼衣原体感染对输卵管性不孕症的影响研究[J]. 陕西医学杂志,2019,48(10): 1272-1274.

[2] 吴满武,俞信忠,杨志浩,等. 生殖道感染与不孕不育症的相关性分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2014,22(11):147-148,81.

[3] 吴燕,王萍,吕美丹. 妊娠期生殖道感染对妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健,2024,39(16):3015-3018.

[4] 李莉,金平安,商玲霞. 下生殖道沙眼衣原体 解脲支原体感染及合并感染发生与胚胎停育的相关性[J]. 中国妇幼保健,2024,39(21):4246-4249.

[5] 李瑞,熊文学,王文娟,等. 广东省育龄妇女生殖道沙眼衣原体感染时空分布及其社会经济影响因素[J]. 中国卫生统计,2024,41(4):521-525.

[6] 孙彤,王冬莲,陈微,等. 浙江省台州市解脲支原体、沙眼支原体和淋球菌感染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2023,33(5):543-546.

[7] 许志定,林小玲. 女性生殖道沙眼衣原体、解脲支原体和淋球菌 DNA 定量检测分析[J]. 系统医学,2022,7(12): 15-18,29.

[8] 彭契六,关竒,李园,等. 泌尿生殖系统解脲支原体、沙眼衣原体和淋球菌 3 种病原体感染情况分析[J]. 检验医学与临床,2021,18(13):1866-1869,1873.

[9] 李斐,谢婷,彭泉泉. 某院疑似女性生殖道感染患者生殖道分泌物标本中支原体的检出情况及其耐药性分析[J]. 抗感染药学,2024,21(7):764-767.

[10] 刘朝晖,张林爱,张师前,等. 人工流产围手术期下生殖道感染筛查和诊治的中国专家共识(2022 年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2022,38(10):996-1000.

[11] 金秀萍,王凤,顾旭明,等. 常见性病病原体生殖道感染与女性不孕的相关性研究[J]. 中国艾滋病性病,2021,27(2):196-198.

[12] 许媛,方莉,赵维皎,等. 四川东北地区女性生殖道感染沙眼衣原体、淋球菌和解脲支原体的结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(15):2047-2048.

[13] 徐文婕,白承续,陈东妮,等. 2010—2022 年北京市青少年部分性传播疾病流行病学特征分析[J]. 中国生育健康杂志,2024,35(5):457-461.

[14] 刘秀玲. 1849 例女性泌尿生殖道支原体感染的流行病学特点及危险因素[J]. 中国卫生工程学,2019,18(4):583-585.

收稿日期:2024-12-30;修回日期:2025-03-03
(本文编辑 覃黎黎)

(上接第 300 页)

[12] BAO Y L,WANG L,SHI L,et al. Transcriptome profiling revealed multiple genes and ECM-receptor interaction pathways that may be associated with breast cancer[J]. Cell Mol Biol Lett,2019,24:38.

[13] MARTINEZ R,BLASINA A,HALLIN J F,et al. Mitotic checkpoint kinase mps1 has a role in normal physiology which impacts clinical utility[J]. PLoS One,2015, 10(9):e0138616.

[14] ZENG N X,LI H Z,WANG H Z,et al. Exploration of the mechanism by which icariin modulates hippocampal neurogenesis in a rat model of depression[J]. Neural Regen Res,2022,17(3):632-642.

[15] ROSSI F,BELTRAN M,DAMIZIA M,et al. Circular RNA ZNF609/CKAP5 mRNA interaction regulates microtubule dynamics and tumorigenicity[J]. Mol Cell, 2022,82(1):75-89. e9.

[16] SCHNEIDER M A,CHRISTOPOULOS P,MULEY T, et al. AURKA, DLGAP5, TPX2, KIF11 and CKAP5: Five specific mitosis-associated genes correlate with poor prognosis for non-small cell lung cancer patients[J]. Int J Oncol,2017,50(2):365-372.

[17] HUANG D L,WANG Y T,XU L L,et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res,2018,37(1):247.

[18] KHAN M I,AL JOHANI A,HAMID A,et al. Proproliferative function of adaptor protein GRB10 in prostate carcinoma[J]. FASEB J,2019,33(3):3198-3211.

[19] OKINO K,KONISHI H,DOI D,et al. Up-regulation of growth factor receptor-bound protein 10 in cervical squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep,2005,13(6):1069-1074.

[20] BOMMER U A,TELERMAN A. Dysregulation of TCTP in biological processes and diseases[J]. Cells,2020,9(7):1632.

[21] JIANG Y T,CHEN K H,YANG J,et al. Efficiency of high cumulative cisplatin dose in high- and low-risk patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Med,2022,11(3):715-727.

[22] TANG L L,GUO R,ZHANG N,et al. Effect of radiotherapy alone vs radiotherapy with concurrent chemoradiotherapy on survival without disease relapse in patients with low-risk nasopharyngeal carcinoma: a randomized clinical trial[J]. JAMA,2022,328(8):728-736.

收稿日期:2025-01-13;修回日期:2025-02-15
(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:田昱晨,谢良玉,马润泽,等.基于数据挖掘的中医药治疗异位妊娠的
用药规律研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(3):335-340.

【中医药现代研究】

基于数据挖掘的中医药治疗异位妊娠的用药规律研究

田昱晨,谢良玉,马润泽,毕是昊,师彬

(山东第一医科大学附属颈肩腰腿痛医院中医骨伤科,山东 济南 250117)

摘要:目的 基于数据挖掘技术分析中医药治疗异位妊娠的用药规律,为提高疗效和新药研发提供理论依据。方法 收集中国知网(CNKI)数据库、万方(Wanfang)数据库、维普(VIP)数据库和中国生物医学文献数据库(CBM)中治疗异位妊娠的文献,建立方剂数据库,使用 Microsoft Excel 2016、IBM SPSS Modeler 和 IBM SPSS Statistics 对数据进行统计分析。分析内容包括四气五味、归经分布、频次统计、药物组方规律、药物间关联度及核心药物组合。**结果** 共收集 52 篇文献,涉及 95 种中药,使用频次 502 次。高频药物(频次前五):赤芍、桃仁、莪术、丹参、三棱。药物性质偏寒(38.45%),苦味(43.35%)较为常见。药物归经以肝经(38.04%)为主,药物类型主要为活血化瘀药(48.41%)。聚类分析得到 3 个新方:A1:莪术、三棱、赤芍、丹参、桃仁、天花粉、蜈蚣、乳香、没药、延胡索、水蛭、红花,即宫外孕二号方加减;A2:三七、益母草、川芎、当归、牛膝、香附,即身痛逐瘀汤加减;A3:甘草、蒲黄、大血藤、五灵脂、紫草,即失笑散加减。药物关联规则分析发现,赤芍-桃仁、赤芍-丹参、莪术-三棱为强关联药对。**结论** 中药治疗异位妊娠以“恶血归肝”为指导,治疗重在疏肝行血。研究为异位妊娠的中医治疗提供了药物选择和用药结构的理论支持,并为进一步的临床应用和药物研发提供了重要参考。

关键词:异位妊娠;数据挖掘;用药规律;中医药

中图分类号:R271

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)03-0335-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.03.023

Research on medication rules of traditional Chinese medicine in the treatment of ectopic pregnancy based on data mining

TIAN Yuchen, XIE Liangyu, MA Runze, BI Shihao, SHI Bin

(Department of Orthopedics, Shandong First Medical University Neck-Shoulder and Lumbocrural Pain Hospital, Jinan 250117, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To analyze the medication rules of traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of ectopic pregnancy based on data mining technology, providing a theoretical basis for improving efficacy and new drug development. **Methods** Literature on the treatment of ectopic pregnancy was collected from the China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang, VIP, and China Biomedical Medicine (CBM) databases to establish a prescription database. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel 2016, IBM SPSS Modeler, and IBM SPSS Statistics, including four properties and five flavors of medicines, distribution of meridian tropism, frequency statistics, medication combination rules, drug-drug associations, and core drug combinations. **Results** A total of 52 pieces of literature were collected, involving 95 types of traditional Chinese medicines with a usage frequency of 502 times. High-frequency drugs (top five): radix paeoniae rubra, semen persicae, rhizoma curcumae, radix salviae miltiorrhizae, rhizoma sparganii. The medicinal properties were predominantly cold (38.45%), and bitter flavor (43.35%) was common. The meridian tropism was mainly the liver meridian (38.04%), and the primary drug type was blood-activating and stasis-resolving agents (48.41%). Cluster analysis yielded three new formulas: A1: rhizoma curcumae, rhizoma sparganii, ra-

第一作者:田昱晨,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合临床,E-mail:2226583257@qq.com

通讯作者:师彬,主任医师,二级教授,博士、硕士研究生导师,E-mail:bshi@sdfmu.edu.cn

dix paeoniae rubra, radix salviae miltiorrhizae, semen persicae, trichosanthes root, scolopendra, olibanum, myrrha, corydalis yanhusuo, hirudo, and carthamus tinctorius (modified version of ectopic pregnancy No. 2 decoction); A2: panax notoginseng, herba leonuri, ligusticum chuanxiong, angelica sinensis, achyranthes bidentata, and cyperus rotundus (modified version of Shentong Zhuyu decoction); A3: glycyrrhiza, pollen typhae, sargentodoxa cuneata, troglodytes dung, and lithospermum (modified version of Shixiao powder). Drug association rule analysis revealed strong associations between radix paeoniae rubra-semen persicae, radix paeoniae rubra-radix salviae miltiorrhizae, and rhizoma curcumaе-rhizoma sparganii. **Conclusion** TCM treatment for ectopic pregnancy is guided by the theory that “pathogenic blood returns to the liver”, with a focus on soothing the liver and promoting blood circulation. This study provides theoretical support for herb selection and medication structure in TCM treatment of ectopic pregnancy, offering important references for further clinical applications and drug development.

Key words: ectopic pregnancy; data mining; medication rules; traditional Chinese medicine

异位妊娠(ectopic pregnancy,EP)是指受精卵在子宫体腔以外着床,习称宫外孕,是妇产科常见的急腹症之一。中医学古籍未直接记载“异位妊娠”,该病症状散见于“妊娠腹痛”(下腹痛、阴道流血)、“经漏”(非经期阴道不规则出血伴腹痛、包块)和“癥瘕”(腹部包块或肿块伴腹痛、流血)等病证中。异位妊娠包括输卵管妊娠、卵巢妊娠、腹腔妊娠、阔韧带妊娠、宫颈妊娠以及子宫残角妊娠^[1]。中医认为气滞血瘀及气虚血瘀是其主要发病原因,先天肾气不足或后天脾气亏虚加之少腹素有瘀滞,冲任不畅,孕卵未在胞宫内着床导致异位妊娠发生^[2]。本研究基于数据挖掘技术,通过收集、整理、分析现代期刊文献中治疗异位妊娠的方剂,总结中药治疗异位妊娠的用药规律,可为提高中医药治疗异位妊娠的临床应用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源 以“异位妊娠”“输卵管妊娠”“中医”“中药”中文为检索词,检索自建库至 2021 年 9 月中国知网(CNKI)、万方(Wanfang)、维普(VIP)、中国生物医学文献服务系统(CBM)中所有有关中医药治疗 EP 的核心刊物文献,共计检索出 2 196 篇文献,去重后剩余 1 247 篇,阅读题目和摘要后纳入 52 篇,见图 1。

1.2 纳入标准 ①所有中药组方治疗 EP 的临床试验类文章,研究类型为随机对照试验、临床观察性文献等;②符合 EP 的诊断标准^[3];③有明确中药药物组成,临床治疗有效。

1.3 排除标准 ①药理研究、文献综述、动物实验、个案报道及经验总结类文献;②治疗组合并使用西医治疗、中药注射液、中成药及中医非药物疗法者;③药物组成不完整或处方无具体剂量的文献;④重复发表的文献;⑤无法获得原文的文献;⑥诊断标准不符合、随机对照例数<30 的小样本研究^[4]。

1.4 筛选结果 共纳入 52 篇文献,依据上述标准整理得出符合研究条件的 52 首方剂,记作 52 条数据记

录。

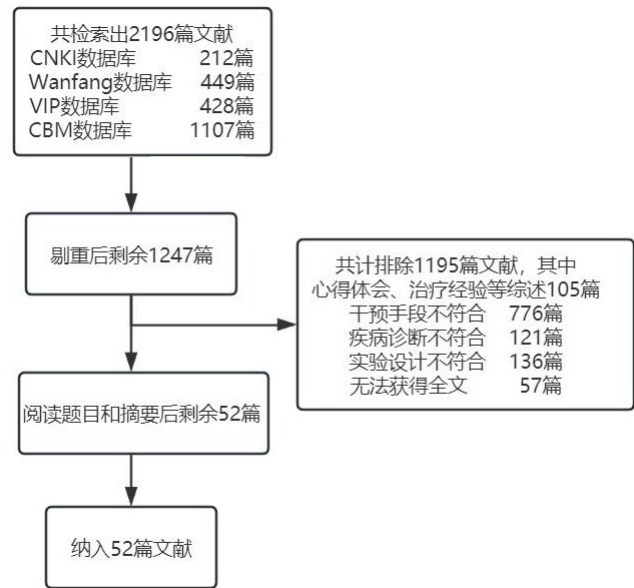


图 1 文献筛选流程图

1.5 中药名称的规范 中药名的规范遵循“十三五”《中药学》教材以确保名称准确一致,原则:①统一别称及炮制药物名称,如“白茯苓”为“茯苓”;②区分功效差异大的药物,如“白芍”与“赤芍”;③简化药性药味分别为寒热温凉平、酸苦甘辛咸淡涩;④未归类的功效按记录分类;⑤仅统计基本方药物^[5]。

1.6 数据统计与分析 双人录入并相互核查 Excel 数据,确保准确可靠。频数分析中药频次、性味归经及功效,归纳 EP 用药特点。采用 IBM SPSS Modeler 18.0 中 Apriori 算法挖掘药物组合,设定支持度≥10%、置信度≥80%、前项数≤2。采用 IBM SPSS Statistics 29.0.1.0 系统聚类分析高频中药并得出组方规律^[6]。

2 结果

2.1 中药频次、剂量、性味、归经分析

2.1.1 中药频次 52 张处方含 95 味中药,累计用 502 次。其中,11 味药 ≥ 10 次,共 269 次,赤芍最高达 40 次,见表 1。

表 1 高频中药

中药名称	使用频次	中药名称	使用频次
赤芍	40	蜈蚣	21
桃仁	38	当归	13
莪术	33	红花	13
丹参	32	没药	13
三棱	31	乳香	13
天花粉	22		

2.1.2 中药性味 52 首处方中中药材性味分布规律,见表 2。药味总计 819 次,主要为苦味最高,其次为辛味,见表 3。

表 2 中药药性统计表

药性	使用频次	频次百分比/%
寒	193	38.45
平	154	30.68
温	147	29.28
凉	5	1.00
热	3	0.60

表 3 中药药味统计表

药味	使用频次	频次百分比/%
苦	355	43.35
辛	215	26.25
甘	173	21.12
咸	45	5.49
酸	20	2.44
涩	7	0.85
淡	4	0.49

2.1.3 中药归经 52 首处方中药归经总计 1 125 次,见表 4。

表 4 中药归经统计表

中药	使用	频次百	中药	使用	频次百
归经	频次	分比/%	归经	频次	分比/%
肝	428	38.04	肾	49	4.36
心	185	16.44	心包	29	2.58
脾	168	14.93	膀胱	19	1.69
胃	85	7.56	胆	17	1.51
肺	65	5.78	小肠	10	0.89
大肠	60	5.33	三焦	10	0.89

2.1.4 中药药物种类 52 首处方共涉及中药种类 16 种,其中 ≥ 30 次者有 3 种,见表 5。

表 5 中药种类统计表

中药	使用	频次百	中药	使用	频次百
种类	频次	分比/%	种类	频次	分比/%
活血化瘀药	243	48.41	泻下药	6	1.20
清热药	120	23.90	收涩药	5	1.00
补虚药	35	6.97	解表药	5	1.00
平肝息风药	26	5.18	消食药	3	0.60
止血药	19	3.78	温里药	3	0.60
理气药	17	3.39	化痰止咳平喘药	3	0.60
利水渗湿药	8	1.59	化湿药	2	0.40
祛风湿药	6	1.20	安神药	1	0.20

2.2 中药关联规则分析 利用 IBM SPSS Modeler 18.0 构建药物关联网络图(见图 2),弱链接上限为 10,强链接下线为 20,实线条粗细反映药物对相关性强度,虚线条表示较弱关联。分析图 2,可识别赤芍—桃仁、赤芍—丹参、莪术—三棱等强关联药对。在 IBM SPSS Modeler 18.0 软件实现 Apriori 算法分析 20 味中药关联,设置最小支持度为 10,最小规则置信度为 80,最大前项数为 2。置信度显示药物共现概率,如桃仁与赤芍共现置信度 85.00%。支持度表明药物组合出现频率,如桃仁—赤芍组合支持度 76.92%。高支持度、高置信度药对有桃仁—赤芍、赤芍—桃仁、三棱—莪术,结果见表 6。

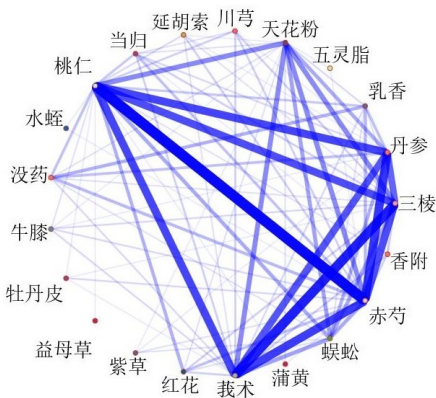


图 2 中药关联规则分析图

2.3 聚类分析 为探究 ≥ 5 次使用频次的 26 味中药的内在联系和核心组合,采用系统聚类法分析,最小聚类数 2,最大聚类数 12,使用组间链接的方法,设置杰卡德二元测量,结果见图 3。图 3 显示,群集数设为 23~24 时,可划分出 3 个新的中药处方,A1:莪术、三棱、赤芍、丹参、桃仁、天花粉、蜈蚣、乳香、没药、延胡索、水蛭、红花,即宫外孕二号方加减;A2:三七、益母草、川芎、当归、牛膝、香附,即身痛逐瘀汤加减;A3:甘草、蒲黄、大血藤、五灵脂、紫草,即失笑散加减。当群集数为 15 时,得到莪术—三棱—赤芍—桃仁—丹参、蜈蚣—天花粉、乳香—没药 3 个常用药对。

表 6 治疗异位妊娠的中药关联规则分析(支持度≥50%,置信度≥80%)

后项	前项	支持度 百分比/%	置信度 百分比/%	增益	后项	前项	支持度 百分比/%	置信度 百分比/%	增益
桃仁	赤芍	76.92	85.00	1.16	桃仁	三棱和莪术	59.62	80.65	1.10
赤芍	桃仁	73.08	89.47	1.16	赤芍	三棱和莪术	59.62	80.65	1.05
三棱	莪术	63.46	93.94	1.58	桃仁	丹参和赤芍	53.85	89.29	1.22
赤芍	莪术	63.46	81.82	1.06	三棱	莪术和赤芍	51.92	92.59	1.55
赤芍	丹参	61.54	87.50	1.14	桃仁	莪术和赤芍	51.92	85.19	1.17
桃仁	丹参	61.54	81.25	1.11	赤芍	丹参和桃仁	50.00	96.15	1.25
莪术	三棱	59.62	100.00	1.58	三棱	莪术和桃仁	50.00	96.15	1.61
桃仁	三棱	59.62	80.65	1.10	赤芍	莪术和桃仁	50.00	88.46	1.15
赤芍	三棱	59.62	80.65	1.05					

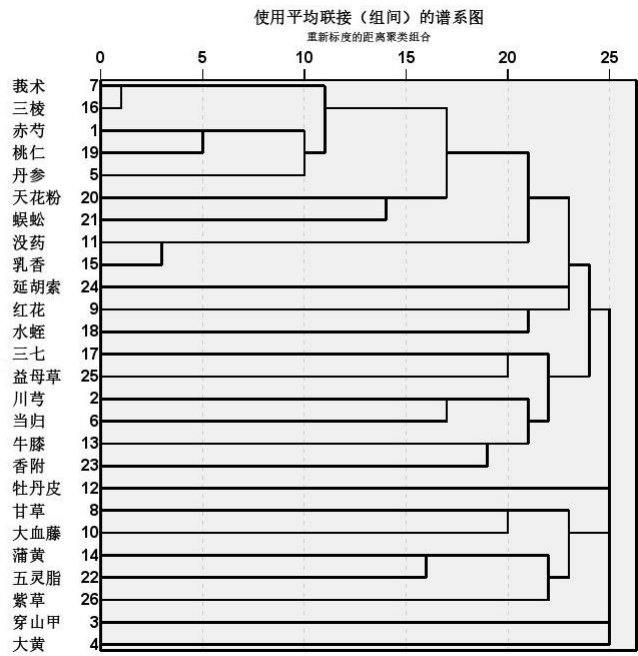


图 3 中药聚类群

3 讨论

异位妊娠是育龄女性的常见急腹症,严重威胁患者的生命安全^[7]。近年来,随着我国微创技术的不断提高,EP 的临床救治取得长足进展,但仍会对患者的生命安全和日后生育健康水平造成不良影响。近年发病率不断上升^[8]。中医认为异位妊娠的基本病机是气滞血瘀或气虚血瘀,其病机是少腹血瘀。输卵管妊娠未破损期,孕卵阻滞胞络气血,留结成瘀,日久成癥,是为胎元阻络、胎瘀阻滞;若脉络破损,血液离经妄行,血亏气脱则致厥脱^[2]。

3.1 用药规律

3.1.1 急则治标,以通为用 数据挖掘显示,治疗异位妊娠主用活血调经药以针对少腹血瘀。桃仁、赤芍、丹参、莪术、三棱常用于活血化瘀、散结消癥。

3.1.2 防微杜渐,止血清热 《诸病源候论》提到“漏血尽,则人毙也^[9]”伴随着阴道流血,气血亏虚加剧,固摄无力,胚元易裂。《景岳全书·血证》提到“血本阴

精,不宜动也,而动则为病……盖动者多由于火,火盛则逼血妄行^[10]”出血当先止血,但瘀血已生,需凉血以宁血。凉血多用牡丹皮、紫草、赤芍等,配合蒲黄等止血药,使恶血不生,稳定病势。

3.1.3 辛散苦降,理气行血 “坚者削之,客者除之……结者散之,留者攻之^[11]”,辛味药物能散、能行、能通、能化,临床应用其治疗异位妊娠大抵与其散湿浊、行气血、通经络、化瘀滞等作用相关。《黄帝内经》提出“大积大聚,其可犯也,衰其大半而止,过者死”以及“导而下”,而苦味药能泄能燥能坚,性质沉降,可以引气下行。辛散苦降的代表中药有桃仁、赤芍、丹参、三棱、莪术,即宫外孕Ⅰ、Ⅱ号方。丹参苦入肝经,祛瘀、调经止痛、凉血消痈;赤芍苦入肝经清热凉血、活血祛瘀;桃仁苦入肝经活血祛瘀、润肠通便,三棱辛苦入肝经消食和胃、破血行气;莪术辛苦入肝经破气行血、消积止痛。诸药辛散苦降,共奏益气救脱,化瘀止血之功效^[12]。研究发现,宫外孕Ⅱ号方^[13]可使血管舒张,改善循环状况,促进吞噬细胞的吞噬机能,改善腹腔淋巴管吸收血浆蛋白,提高宫外孕包块型患者的血浆纤维蛋白溶解活性和血浆胶原酶活性,促进包块的吸收,减轻输卵管周围的黏连,减少炎症,增加输卵管复通机会及功能的恢复。异位妊娠的本质在于瘀血,“气为血之帅,血为气之母”,使理气药常用于异位妊娠的治疗。常用理气药有枳壳、香附等。枳壳性微寒,味苦、辛、酸,具有理气宽胸、行滞消胀的功效,是中医常用理气药,具有良好的抗血栓、降血脂、抗肿瘤、杀菌作用^[14]。香附具有疏肝解郁、理气宽中、调经止痛的功效,《本草纲目》中记载其为“气病之总司,女科之主帅”,是血中之气药^[15]。研究显示,香附具有良好的降血压,抑制子宫平滑肌收缩和抑制金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌和粪肠球菌的作用^[16]。枳壳、香附常作为辅药使用,陈双东^[17]使用自拟宫外孕汤治疗输卵管异位妊娠,腹痛消失时间、血β-HCG 转阴时间、包块消失时间减少,疗效显著。胡玉芳等^[18]使用自拟宫外孕中药方治疗未破损期异位妊娠患者在活血化瘀的基础加入枳壳、香附

等理气药,治疗有效率达到 94%。

3.1.4 虫掘瘀络,攻坚破积 蜈蚣、水蛭、全蝎、土鳖虫、地龙等虫类药在处方中出现共 52 次。虫类药,多咸、辛味,辛以行气散瘀,治气滞血瘀;咸能软坚散结,治瘀血痰浊;气温或平,略有小毒,善走窜,能深入经络脏腑,攻坚破积,治风湿痹痛、癥瘕积聚等顽疾。药性善走窜,剔邪搜络,攻坚破积^[19]。蜈蚣辛温,入肝经,具有息风镇痉,攻毒散结,通络止痛的作用。蜈蚣酸性蛋白酶能抑制动脉硬化、抑制血小板聚集,抑制动脉血栓形成^[20]。水蛭,咸平入肝经,有破血通经,逐瘀消症的功效。《神农本草经》载,水蛭主逐恶血瘀血,月闭,破血瘕积聚,无子,利水道,生他泽。水蛭可以抑制血小板聚集,防止血栓形成,起到活血化瘀的作用^[21]。全蝎味辛性平,有毒,归肝经,熄风镇痉、通络止痛、攻毒散结^[22],可以抑制血小板聚集,减少纤维蛋白含量和促进纤溶系统活性,明显延长活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间^[23]。土鳖虫性寒、味咸、归肝经^[24],有小毒,具有破血逐瘀、续筋接骨之功效,用于跌打损伤、筋骨骨折、症瘕痞块、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛。黄镇林等^[25]研究发现土鳖虫体内的 F2-2 多肽可以抑制大鼠体内凝血酶原激活物的生成,降低纤维蛋白含量,抑制血小板聚集并降低血液凝固度,具有很好的抗凝作用。地龙咸,寒,入肝经^[26],具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效,其中的纤维蛋白溶解酶、蚓激酶和蚓胶原酶均为溶栓有效成分,具有抗凝、降纤的作用^[27]。虫类药搜剔血分之邪、化瘀散结,通络走窜,药力易达病所,在治疗异位妊娠上具有较大优势。

3.1.5 生运相得,祛恶生新 中药归经以肝、心、脾经为主。肝主疏泄,调畅气机,肝藏血而心行之,肝脏调节血量运行,心主行血,心气推动血液运行,脾主统血,控制血液在脉道中正常运行,三者合力维持血液的运行;脾为气血生化之源,水谷之精在心阳作用下化为新血,肝精亦可生血,三者共同促进新血的生成。女子胞的主持月经和孕育胎儿生理功能的正常和肝、心、脾关系密切。综上所述,从中医脏腑功能来看,调节肝、心、脾功能可有效改善异位妊娠的血瘀状态。

3.1.6 恶血归肝,疏肝养肝 临床用药中 38% 的中药归肝经,48.4% 中药属于活血化瘀药,疏肝理气药以及心脾经药物的使用均提醒活血化瘀与肝脏之间的紧密联系,盖因“恶血归肝”。“恶血归肝”首载于李东垣的《医学发明》,“夫从高坠下,恶血留于内,不分十二经络,圣人俱作风中肝经,留于胁下……恶血必归于肝……盖肝主血故也。”王冰注,人动则血运行诸经,人静则血归于肝脏。肝主藏血,体阴而用阳,生血造血,是血液运行枢纽。故恶血所属必归于肝,肝乃祛瘀生新

之脏。气行则血行,气滞则血瘀,恶血留止,气机不畅,肝失疏泄,复使恶血蓄而不行^[28]。基于肝脏喜条达恶抑郁的特点,针对异位妊娠气虚血瘀、气滞血瘀的基本病机,参照活血化瘀的治疗准则,中药治疗采用了活血化瘀、清热止血、理气补虚的主要治法,以达到恶血去而新血生的治疗效果。“血瘀”作为病程变化中主要的病理因素始终贯穿于异位妊娠的始终,血瘀阻滞冲任,导致气血津液运行不畅,从而出现停经、腹痛、癥瘕等一系列症状。故治疗以活血化瘀为要,使恶血得去,新血始生。数据挖掘的结果显示,临床更加注重苦味、辛味药、虫类等药物的应用,以达到事半功倍之效。

3.2 常用药对 综合参照聚类分析和关联规则分析中较高支持度和置信度,常用的药对是莪术—三棱、赤芍—桃仁—丹参、蜈蚣—天花粉、乳香—没药。

3.2.1 三棱—莪术 三棱辛、苦、平,莪术辛、苦、温,入肝、脾经。三棱、莪术能破血行气,散瘀消癥,消积止痛,适用于血瘀日久而成的癥瘕积聚,《本草经疏》云:“三棱,从血药则治血,从气药则治气……此所以能治一切凝结停滞有形之坚积也”,《药品化义》云:“蓬术味辛性烈,专攻气中之血,主破积消坚,去积聚癥块,经闭血瘀,扑损疼痛”。故二者常相须为用^[29]。

3.2.2 赤芍—桃仁—丹参 现代药理学表明^[30],丹参具有抗心脏缺血缺氧、改善微循环、抑制血小板聚集和血栓形成、中枢镇静及抗菌消炎等作用;赤芍有抗血小板聚集作用;桃仁有舒张血管作用。丹参祛瘀、调经止痛、除烦安神、凉血消痈;赤芍清热凉血、活血祛瘀;桃仁活血祛瘀、润肠通便,三棱消食和胃、破血行气;莪术破气行血、消积止痛。诸药共奏益气救脱,化瘀止血之功效^[31]。

3.2.3 蜈蚣—天花粉 《雷公炮制药性解》:“蜈蚣,味辛,性温有毒,不载经络。去瘀血,堕胎。蜈蚣辛温,入肝经。药理学实验证明,蜈蚣能改善微循环,延长凝血时间,降低红细胞比容和血黏度,有镇痛、抗炎的作用,并能降低怀孕率^[32]。《景岳全书》中记载,天花粉,味苦,性寒。消乳痈肿毒痔瘰疮疖,排脓生肌长肉,除跌扑瘀血,通月水。天花粉蛋白^[33]可以直接作用于对其敏感的胎盘滋养层细胞,使绒毛破损,促使细胞内促凝物质外溢,并在绒毛间隙形成血凝,致胎盘循环和营养障碍,导致组织坏死。蜈蚣通络止痛,攻毒散结,天花粉消肿排脓,清热解毒,两者配伍使用增强去瘀血杀胚功效。

3.2.4 乳香—没药 乳香与没药组合源自《证治准绳》的“乳香止痛散”,以气香走窜、善行散瘀止痛著称,药性淡薄易入血分。两者相辅相成,气血并治,能宣通经络、活血祛瘀、消肿止痛^[34]。乳香味辛苦性温,入心肝脾经,活血定痛、消肿生肌;没药味辛微酸,亦入心肝

脾经,化瘀理血。张锡纯认为乳香透窍理气,没药化瘀理血,两者并用治疼痛、调和气血。此外,两者还治女子经痛、产后瘀血、月经不调、风寒湿痹、疮疡肿痛等^[35]。

4 总结

中医认为,异位妊娠的发生多与气滞、寒凝、热结、痰湿、肾虚、气虚等因致血瘀形成有关,血瘀渐成扰及冲任,恶血阻肝,加之胚元阻滞,从而导致气血不通,诸症丛生,治疗应从“疏肝”入手。“恶血归肝”理论指出,恶血的消散和新血的化生都要依靠肝脏,强调肝脏疏泄正常是恶血消散的重要前提。因此,治疗异位妊娠需认识其气滞或气虚血瘀病机及少腹血瘀病位,核心治法为活血化瘀,同时重视疏肝养肝以调畅气机。“恶血归肝”理论提供了新视角,中医学博大精深,望吾辈挖掘精髓,结合现代医学,为异位妊娠诊治提供新指导,提高患者生活质量,促进中医发展。

参考文献:

[1] 康燕. 活血清热方灌肠联合米非司酮片治疗异位妊娠的疗效观察[J]. 河北中医, 2018, 40(12): 1850-1854.

[2] 罗颂平, 刘雁峰. 中医妇科学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.

[3] 中国优生科学协会肿瘤生殖学分会. 输卵管妊娠诊治的中国专家共识[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(7): 780-787.

[4] 王梦迪, 郭弋凡, 王玉锋, 等. 基于文献分析的特发性膜性肾病的辨治规律探讨[J]. 环球中医药, 2019, 12(12): 1834-1840.

[5] 武文洁, 裘越, 吴玉琴, 等. 基于数据挖掘探讨肾阳虚证骨质疏松症用药规律[J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11): 165-169.

[6] 彭广操, 乔利杰, 朱明军. 基于数据挖掘探讨中医药治疗急性心力衰竭的用药规律[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1549-1555.

[7] 徐星星, 李观观. 异位妊娠发生的危险因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(19): 4553-4556.

[8] 裴海英, 张大微, 吴钦兰, 等. 甲氨蝶呤联合宫外孕Ⅱ号方与米非司酮治疗异位妊娠的随机对照试验[J]. 中国循证医学杂志, 2012, 12(2): 168-172.

[9] 王迪, 李岩, 于晓菲. 李岩教授关于保守治疗异位妊娠的经验总结[J]. 中医临床研究, 2021, 13(3): 10-11.

[10] (明)张介宾, 著. 景岳全书—上册[M]. 李继明等, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

[11] 叶晨书, 李军. 浅探《妇人大全良方》中妇人癥瘕的论治特色[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(12): 131-133.

[12] 李兴艳, 陈林兴, 张亚嘉, 等. 陈林兴教授运用活血化瘀法治疗妇科疾病经验[J]. 云南中医中药杂志, 2021, 42(6): 3-6.

[13] 裴海英, 张大微, 吴钦兰, 等. 甲氨蝶呤联合宫外孕Ⅱ号方与米非司酮治疗异位妊娠的随机对照试验[J]. 中国循证医学杂志, 2012, 12(2): 168-172.

[14] 章斌, 金剑, 金芝贵, 等. 枳壳的药理作用与临床应用进展[J]. 医药导报, 2013, 32(11): 1462-1464.

[15] 潘少斌, 孔娜, 李静, 等. 香附化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2019, 21(10): 1429-1434.

[16] 门翠伟. 不同彩超方式诊断早期异位妊娠的临床应用价值[J]. 中国现代医生, 2021, 59(30): 119-122.

[17] 陈双东. 自拟宫外孕汤治疗输卵管异位妊娠的临床疗效研究[J]. 环球中医药, 2019, 12(8): 1262-1264.

[18] 胡玉芳, 赵淑霞, 赵晓宁, 等. 自拟宫外孕中药方治疗未破损期异位妊娠效果观察[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2019, 6(8): 73, 75.

[19] 石雅馨, 郁悦, 师伟. 基于络病理论探析通路法在子宫腺肌病中的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1216-1219.

[20] 陈玉琪, 吉兰芳, 王梦梦, 等. 虫类药在妇科疾病中的应用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(9): 1022-1025.

[21] 欧阳罗丹, 胡小松, 牛明, 等. 基于网络药理学的水蛭活血化瘀的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1901-1906.

[22] 宋莹, 王振, 乌凯迪, 等. 毒药全蝎药理作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 216-220.

[23] 史磊, 张天锡, 杜聪颖, 等. 中药全蝎活性成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4): 89-91.

[24] 吴福林, 周柏松, 董庆海, 等. 土鳖虫的药理、药化及其临床的研究进展[J]. 特产研究, 2018, 40(3): 67-74.

[25] 黄镇林, 何亮颖, 王宏涛, 等. 土鳖虫活性组分 F2-2 体内抗凝药效实验[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(6): 1359-1363.

[26] 郑佳, 谢明, 刘威, 等. 中药地龙本草考证[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(4): 76-80.

[27] 王萍, 张悦. 地龙药理作用研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2015(33): 119.

[28] 付宏伟, 耿连岐, 宗振勇, 等. “恶血归肝”理论及其在痛经中的应用[J]. 现代中医药, 2021, 41(3): 60-63.

[29] 杨爽, 李佳, 左冬冬, 等. 基于数据挖掘探讨中药治疗子宫内异位症临床用药规律[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(8): 150-155.

[30] 曾涛, 赵欣, 钟立新, 等. 宫外孕 1 号方加味联合甲氨蝶呤治疗异位妊娠的疗效及影响因素[J]. 当代医学, 2021, 27(22): 83-85.

[31] 杨晓清. 异位妊娠不同保守治疗方案的疗效对比[J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9(5): 55-57.

[32] 毛小平, 陈子珺, 毛晓健, 等. 蜈蚣的部分药理研究[J]. 云南中医学院学报, 1999, 22(3): 1-3, 7.

[33] 戴良图, 张华, 王晨曦, 等. 天花粉蛋白治疗异位妊娠的临床应用及不良反应分析[J]. 海军医学杂志, 2013, 34(5): 321-324.

[34] 文雯, 张朋. 乳香、没药现代药理研究与临床应用[J]. 河南中医, 2009, 29(2): 204-206.

[35] 余玮, 李苗, 张聪伟. 张锡纯运用乳香、没药经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1238-1240.

收稿日期: 2024-10-14; 修回日期: 2024-12-21

(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:杨万平,阳桂艳,申亚灵,等.幽门螺杆菌在哺乳动物中定植和致病的研究进展[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):341-345,356.

【医学综述】

幽门螺杆菌在哺乳动物中定植和致病的研究进展

杨万平^{1,2}, 阳桂艳^{1,2,3}, 申亚灵^{1,2,3}, 辛雅楠^{1,2,3}, 李文露^{1,2,3}, 黄赞松^{2,4}, 黄干荣^{2,3}

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 广西高校耐药微生物感染防治研究重点实验室, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院基础医学院, 广西 百色 533000;

4. 右江民族医学院附属医院消化内科, 广西 百色 533000)

摘要: 幽门螺杆菌(*H. pylori*)与慢性活动性胃炎、胃癌等胃肠道疾病发生密切相关,世界上约 50%人口被感染,部分发展中国家更高。探索 *H. pylori* 在哺乳动物中的感染特征,选择合适的动物模型,将为疫苗、新药物及新治疗方法研发有重要意义。本文综述了 *H. pylori* 对哺乳动物中灵长目、啮齿目、偶蹄目、食肉目、兔形目等动物的感染定植与致病研究进展,从感染定植量、发病率、病理变化及模型成本等方面进行对比总结,分析利弊。提出啮齿目动物小鼠更适合普通实验室研究使用;灵长目恒河猴是筛选候选疫苗的首选动物;偶蹄目中的猪可尝试用于新型抗菌药物和临床前期药效评估。由于操作难度和成本限制,恒河猴等大型动物模型仅使用于少数高级别实验室。

关键词: 幽门螺杆菌;哺乳动物;模型;动物;定植

中图分类号: R377

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0341-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.024

自 1982 年巴里·马歇尔和罗宾·沃伦分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)^[1], *H. pylori* 相关性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等逐渐变成药物可治愈的疾病。随着研究深入,发现 *H. pylori* 除了感染人之外,还能感染其他哺乳动物,如恒河猴、猪、狗、猫、鼠等^[2]。为了研究人类与哺乳动物间 *H. pylori* 致病性,克服人体研究 *H. pylori* 的局限性,许多学者致力于开发 *H. pylori* 感染的动物新模型,采用动物实验方法来阐明 *H. pylori* 感染的发病机制,以期探索出有效的防控方法。现将 *H. pylori* 在常见哺乳动物中定植和致病的研究进展综述如下:

1 *H. pylori* 在灵长目中的定植和致病

H. pylori 感染的非人灵长类动物常见的有恒河猴、食蟹猴、日本猴^[3]。其中恒河猴研究较多,日本猴、食蟹猴近期研究较少。相比其他动物模型,恒河猴具有以下优点:胃的生理结构与人类相似、与人亲缘关系非常紧密、有相似的或相同的菌株、致病毒力机制相似、可通过镜检获得样本。

1.1 *H. pylori* 在灵长目中定植和感染

1.1.1 人 *H. pylori* 在人定植过程中产生的脲酶催化尿素水解产生碳酸氢盐和氨(NH₄⁺)中和胃酸,使得

细菌能在胃的极酸环境中生存。鞭毛辅助 *H. pylori* 运动使其快速穿过浓稠黏液层^[4]。黏附素使 *H. pylori* 与胃细胞结合,通过其表面黏附分子使其进入胃黏膜上皮细胞。*H. pylori* 还可产生各种酶逃避中性粒细胞杀伤,表达出许多毒力因子适应胃内环境,这些有利于它在胃中定植^[5-6]。*H. pylori* 在人主要传播途径为粪-口传播和口-口传播,传播主要发生在儿童时期,人与人之间和食源性感染是 *H. pylori* 的主要传播方式^[7]。

1.1.2 食蟹猴 食蟹猴可自然地被 *H. pylori* 定植,在 TESTERMAN T L 等^[8]研究中有 64%食蟹猴自然感染了 *H. pylori*,这与人类感染率相似。*H. pylori* 大部分位于胃浅层黏膜,但少数位于胃血管^[8]。在食蟹猴的胃黏膜感染 *H. pylori*,胃底或幽门黏膜的炎症细胞浸润,淋巴浆细胞浸润,常伴有壁细胞的减少和黏膜上皮的反应性增生,导致黏膜增厚^[9]。目前关于其定植机制的研究报道较少。

1.1.3 恒河猴 *H. pylori* 在恒河猴定植过程中通过表达宿主抗原来适应宿主,通过脂多糖末端寡糖单位的表达来适应胃黏膜的特性^[10],这利于它在胃中的定植。CagPAI 是患 *H. pylori* 的最重要的细菌毒力因

基金项目:国家自然科学基金项目(32060018);中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY20198004)

第一作者:杨万平,在读硕士研究生,研究方向:从事幽门螺杆菌防治研究,E-mail:1031799470@qq.com

通讯作者:黄干荣,高级实验师,研究方向:耐药微生物防治研究,E-mail:88193724@qq.com

子,自然感染的恒河猴中分离出的 *H. pylori* 菌株具有与人类临床分离株非常相似的 CagPAI,并且与人类分离株一样,且 CagPAI 在遗传和功能上与人类分离株也非常相似,它编码功能性Ⅳ型分泌系统^[11]。这些结果表明 *H. pylori* 利用类似的毒力机制在恒河猴和人类宿主中定植。未感染的圈养恒河猴群体很容易感染 *H. pylori*,目前可用于筛选候选疫苗,这些研究将为临床试验前的监管审批提供有用的数据^[12]。

1.2 *H. pylori* 感染对灵长目的致病作用 *H. pylori* 在人的致病机制主要通过定植、胃上皮损伤、免疫失调引起胃酸分泌失调。①在定植过程产生尿素酶,中和胃酸,使其在胃强酸环境下短暂存活^[13]。②直接损伤机制:毒力因子和毒素及蛋白直接损伤胃黏膜,如 Baba、CagA、VacA、黏液酶等及代谢物质直接作用于胃上皮细胞,发生炎症反应导致直接损伤^[14]。③免疫受损间接损伤机制:*H. pylori* 可以通过其毒力因子抑制 T 细胞增殖或诱导 T 细胞凋亡,从而对免疫反应产生耐受性^[15]。*H. pylori* 在恒河猴中致病机制与人类几乎相同,在食蟹猴、日本猴体内致病机制研究很少。自然感染和社会饲养的恒河猴中分离出的 *H. pylori* 菌株具有功能性 T4SS,可易位 CagA,诱导 IL-8,并且与人类 CagPAI 高度相关,有研究证明了恒河猴和人性 *H. pylori* 全基因组 DNA 也极其相似^[11]。这些结果表明 *H. pylori* 可以在恒河猴中使用与人类相同的毒力机制致病,并支持恒河猴作为人类 *H. pylori* 感染最佳试验模型。

2 *H. pylori* 在啮齿目中的定植和致病

H. pylori 感染的啮齿目动物有小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、蒙古沙鼠等。*H. pylori* 悉尼菌株感染的小鼠模型使用最广泛^[3],是小鼠最常用的胃癌动物模型^[16],蒙古沙鼠是 *H. pylori* 胃内定植最佳动物模型^[3]。目前,*H. pylori* 感染研究采用最多的模型是啮齿类动物,其优点为繁殖能力强、较低的实验成本、相似的胃生理特征、遗传背景比较明确和种属质量更容易掌控。

2.1 *H. pylori* 对啮齿目的定植和感染

2.1.1 小鼠 小鼠能自然和被动感染 *H. pylori*,提供不同品系的小鼠中观察到的 *H. pylori* 定植水平存在相当大的差异。东南亚 hpEastAsia 基因型小鼠表现出与人类 *H. pylori* 感染非常相似的胃炎症、上皮糜烂和发育异常变化^[17],这为研究 *H. pylori* 感染提供了新的参考模型。*H. pylori* 感染 MyD88 小鼠后 6 个月内胃腺癌可发生,可能是研究 *H. pylori* 致病性的较好啮齿动物模型^[18]。*H. pylori* 感染可导致 C57BL/6J 小鼠发生结直肠癌^[19],和 BALB/c 小鼠也用于胃炎发病机制研究^[20]。小鼠因其能够模拟 *H. pylori* 人类感染的病理过程、实验成本较低、操作方便、胃结构与

人类相似,成为 *H. pylori* 研究使用最多的实验动物。

2.1.2 大鼠 常用的大鼠模型有 Wistar、SD 大鼠,*H. pylori* 单独感染大鼠时,在胃黏膜的定植能力差,只引起轻微炎症反应^[21],但是感染显著损害大鼠的记忆功能^[21]。大鼠被广泛应用于药物疗效研究,如药物治疗慢性萎缩性胃炎^[22]。

2.1.3 仓鼠和豚鼠 仓鼠在食粪期间可能会在胃中继发定植 *H. pylori*,而慢性感染产生的相关性胃炎可以发展为浸润性胃腺癌。仓鼠的这种特性使得它们成为研究 *H. pylori* 感染及其相关疾病的重要模型^[23]。豚鼠胃黏膜被 *H. pylori* 定植,可导致胃上皮细胞组织损伤和凋亡^[24]。在模型选择上,豚鼠可用于测试 *H. pylori* 免疫和疫苗接种^[25]。

2.1.4 蒙古沙鼠 *H. pylori* 在蒙古沙鼠胃黏膜的定植产生类似于人类疾病中性粒细胞和单核细胞引起的炎症,严重炎症会导致壁细胞的丧失黏膜化生。此外,感染后表现出与人类相似的感染症状,如食欲和体重下降,并重现了 *H. pylori* 诱导的胃定植、炎症、溃疡和致癌的许多特征^[26]。因此,蒙古沙鼠是一种合适的动物模型,也是建立 *H. pylori* 感染常用的动物模型。

2.2 幽门螺杆菌对啮齿目的致病作用 在啮齿动物胃内人为定植适合的 *H. pylori*,观察到感染的啮齿动物体内 *H. pylori* 定植和致病方式有差异,也获得不同的疾病模型。使用小鼠模型,慢性感染会导致 CagA 重组导致 T4SS 功能下调^[27]。在大鼠模型中,发现感染后胃窦黏膜出现慢性炎症,与人类慢性胃炎的病理特征相似,并伴有血清 *H. pylori* 水平升高^[28]。豚鼠定植 *H. pylori*,仅导致胃炎,发现感染主要引起局部的炎症反应,而没有导致消化性溃疡或恶性肿瘤的形成^[29]。蒙古沙鼠感染 *H. pylori* 后血清胃泌素升高引起胃上皮细胞增殖,IL-1 在感染 *H. pylori* 后引起胃酸缺乏中发挥作用,CD44 基因在 *H. pylori* 感染引起的上皮细胞增殖和胃癌发展中至关重要^[26]。

3 *H. pylori* 在偶蹄目中的定植和致病

3.1 *H. pylori* 对偶蹄目的感染和定植

3.1.1 羊和牛 *H. pylori* 可以在牛、绵羊和山羊胃中定植,定植机制研究较少。RANJBAR R 等^[30]研究结果表明 *H. pylori* 感染绵羊高达 70%,而山羊和奶牛的样本最低,分别为 0.6% 和 4.0%。从绵羊和人类中分离得到的 *H. pylori* DNA 序列高度同源,表明绵羊可能作为 *H. pylori* 的宿主,并在一定程度上与人类共享 *H. pylori* 的祖先宿主^[31]。牛奶和牛肉样本中有与人类的 vacA 基因型相似的 *H. pylori*^[32],表明牛奶和肉类样本可能是人类细菌的来源。

3.1.2 猪 *H. pylori* 可以在猪胃中定植,成年猪患病率可到 90%,主要定植在胃底和幽门腺区,引起胃

炎,且感染后定植时间也较长,进而导致胃溃疡的发生^[33],这与人类 *H. pylori* 胃炎相类似。悉生乳猪是最早用于建立 *H. pylori* 猪模型,*H. pylori* 定植感染后可以出现胃炎及胃溃疡。其小型猪对抗生素敏感,该模型可用于鉴定新型抗菌药物和临床前期评估药效,但是其价格较昂贵,饲养环境要求严格,影响了其在相关研究中的应用。无菌栅栏出生的家猪容易感染 *H. pylori*,可以引起淋巴细胞性胃炎复制了人类疾病的大部分病理特征^[34],这为 *H. pylori* 相关性胃炎机制研究提供了新模型。

3.2 *H. pylori* 对偶蹄目的致病作用 *H. pylori* 感染猪后可以导致胃炎、消化性和十二指肠溃疡以及低级别黏膜相关淋巴组织淋巴瘤^[35]。目前猪模型、牛模型、羊模型具体定植及致病机制报道较少。使用全菌抗原免疫奶牛,可诱导奶牛机体的免疫应答,得到抗 *H. pylori* 牛奶,其饮用无任何不良反应,且临床效果和应用前景都较好,但感染者胃中的菌株存在差异以及免疫奶牛产量下降等问题,也限制了其发展^[36]。

4 *H. pylori* 在食肉目中的定植和致病

4.1 *H. pylori* 对食肉目的定植和感染

4.1.1 猫和狗 狗和猫可以被 *H. pylori* 定植,有研究证明了 *H. pylori* 可以在人和狗之间传播^[37],这些病原体也可能感染人类,导致胃炎、消化性溃疡、十二指肠溃疡以及淋巴组织淋巴瘤,狗和猫的胃非幽门螺杆菌螺杆菌(NHPH)患病率都很高,且多为混合感染,临床健康犬的胃 NHPH 患病率为 67%~86%,猫为 41%~100%。在自然感染的狗中,毕氏螺杆菌是最普遍^[35]。菌株 ASB1(T)、ASB2 和 ASB3 存在于猫胃黏膜中,可在 37℃ 的微需氧条件下在双相培养板上、干燥的琼脂平板上以菌落形式生长,并表现出脲酶、氧化酶和过氧化氢酶活性^[38]。这表明 *H. pylori* 在猫体内表现出与人类感染相似,包括的 *H. pylori* 生长、定植和致病等,有助于更好地理解 *H. pylori* 的病理机制过程。

4.2 *H. pylori* 对食肉目中的致病作用 已发现不同螺杆菌物种参与结合的聚糖受体是不同的,不同的胃 *NH. pylori* 有不同的黏附机制,由具有不同受体特异性的蛋白质介导。在犬胃黏膜中,胃 *H. pylori* 可能通过末端 α -GalNAc 和 2 型 Lewis 抗原结合^[35]。根据比较基因组研究,猫中胃 *H. pylori* 缺乏迄今为止在 *H. pylori* 中发现的所有已知粘连素,而 CagPAI 和 VacA 是 *H. pylori* 中两种主要的细胞毒力因子,在胃 *H. pylori* 中也均未出现^[35],这与人感染的 *H. pylori* 有一定的差异。

5 *H. pylori* 在兔形目中的定植和致病

近年,在 *H. pylori* 在兔形目中的定植与致病研究较少,只有较少文献有所涉及。NEGRINI R 等^[39] 的研究结果表明 *H. pylori* 的免疫反应产生的抗多糖自身抗体可能会导致兔子心肌梗塞,为理解 *H. pylori* 抗原模拟在心血管疾病发病机制中的重要性提供了有用的实验模型^[39]。但有文献提及,在 *H. pylori* 疫苗研发中,一些基于 *H. pylori* 菌株的重组复合物在兔子体内能使兔子对 *H. pylori* 特定成分产生强烈且特异的 IgG 反应,在未来 *H. pylori* 疫苗的研发中,兔的运用可能会更加广泛^[40]。

6 *H. pylori*在哺乳动物中定植和致病的特点

本文从哺乳动物的 28 个目中选常用于定植 *H. pylori* 的 5 个目来阐述幽门螺杆菌在哺乳动物中定植和致病的特点。①灵长目最大的优势是消化结构和感染后病理改变与人相似,恒河猴最为相似,定植 *H. pylori* 有类似的人毒力机制,感染 *H. pylori* 后可见特征胃炎,并有胃黏膜萎缩。②在啮齿类动物胃内成功定植 *H. pylori*,不仅观察到胃炎,还可以看到萎缩性胃炎发展成肠化生,甚至进展成胃癌的过程。③偶蹄目中牛、猪、绵羊和山羊胃中都有 *H. pylori* 定植,绵羊和人类中分离得到的 *H. pylori* DNA 序列高度同源,表明绵羊可能作为 *H. pylori* 的宿主,猪模型可以引起淋巴细胞性胃炎复制了人类疾病的大部分病理特征。④食肉目中 *H. pylori* 能在猫、狗胃中定植,*H. pylori* 在猫体内表现出与人类感染相似。⑤兔形目动物中兔子定植 *H. pylori* 后,基于 *H. pylori* 菌株的重组复合物在兔子体内能使兔子对 *H. pylori* 特定成分产生强烈且特异的 IgG 反应,并且 *H. pylori* 诱导的交叉反应性自身免疫反应促进血栓形成,可能导致兔子心肌梗塞。

7 小结

根据 *H. pylori* 在哺乳动物的定植和致病的特点,本次综述发现它们在 *H. pylori* 感染研究中的应用方向是不同的,这些差异更多体现在构建 *H. pylori* 感染的动物模型选择上。最常使用的是动物模型是啮齿目,其中小鼠模型运用最广泛,蒙古沙鼠是啮齿目中 *H. pylori* 胃内定植最佳动物。灵长目中恒河猴与人体最为相似,是最佳实验动物。偶蹄目、食肉目、兔形目模型也各有其特点但应用相对较少。尽管动物模型引起的病理变化与人有许多相似之处,但它们与人类感染的相似性仍然存在差异,定植致病机制有待更进一步研究,模型的选择体现在构建 *H. pylori* 感染动物模型的实验目标。*H. pylori* 感染哺乳动物模型资料汇总见表 1。

表 1 *H. pylori* 感染哺乳动物模型总结

目	哺乳动物	定植部位	动物模型的优缺点	应用方向	参考文献
灵长目	食蟹猴	胃	优点:与人亲缘关系非常紧密,可通过镜检获得样本;食蟹猴感染 <i>H. pylori</i> 过程中可产生胃底或幽门黏膜的炎症细胞浸润。缺点:定植机制尚不清楚,食蟹猴感染内部传播尚未确定,培养成本高。	研究胃炎模型	[8-9]
	恒河猴	胃	优点:胃的生理结构以及感染 <i>H. pylori</i> 的致病毒力机制与人相似;可通过镜检获得样本,缺点:恒河猴普遍存在 <i>H. pylori</i> 自然感染;培养成本较高。	① 研究 <i>H. pylori</i> 致病机理;② 抗 <i>H. pylori</i> 药物筛选和疫苗开发。	[10-12]
啮齿目	小鼠	胃	优点:小鼠因其能够模拟 <i>H. pylori</i> 人类感染的病理过程,实验成本较低,操作方便,胃结构与人类相似。缺点:胃内定植幽门螺杆菌,受小鼠品种、菌株种类等因素限制。	① 感染的小鼠模型使用最广泛;② 胃癌、直肠癌、胃炎动物模型。	[16-20,27]
	大鼠	胃	缺点:单独使用 <i>H. pylori</i> 感染时,胃黏膜的定植能力差,造成轻微炎症,且胃内定植部位与人稍有差异。	药物疗效研究	[2,21-22,28]
	仓鼠	胃	优点:仓鼠的慢性螺杆菌相关性胃炎经过多阶段发展可发展为浸润性胃腺癌,与人类慢性感染中观察到的结果相似。缺点:定植机制不明,研究太少。	研究 <i>H. pylori</i> 相关胃腺癌的发展。	[23]
	豚鼠	胃	优点:豚鼠不会自然感染螺杆菌,但易受 <i>H. pylori</i> 感染,持续感染 <i>H. pylori</i> 会产生特异性免疫反应。缺点:豚鼠感染 <i>H. pylori</i> 产生的胃炎,并没有导致消化性溃疡或恶性肿瘤的形成。	研究 <i>H. pylori</i> 触发的免疫和疫苗接种。	[24-25,29]
偶蹄目	蒙古沙鼠	胃	优点:蒙古沙鼠感染后表现出与人类相似的感染症状,是 <i>H. pylori</i> 胃内定植最佳动物。	是 <i>H. pylori</i> 胃内定植最佳动物。	[26]
	羊	胃	优点:绵羊和人类中分离得到的 <i>H. pylori</i> DNA 序列高度同源。缺点: <i>H. pylori</i> 自然感染率高,定植机制研究较少,培养成本高。	—	[30-31]
	牛	胃	优点:有基因型相似的 <i>H. pylori</i> 。缺点:定植机制研究较少,培养成本较高。	抗 <i>H. pylori</i> 牛奶。	[32,36]
	猪	胃	优点:生理结构和病理特征上与人类样本相关性较好,诱发的胃炎与人类 <i>H. pylori</i> 胃炎相类似。缺点:培养成本较高。	新型抗菌药物和临床前期评估。	[33-35]
食肉目	猫	胃	优点: <i>H. pylori</i> 在猫体内表现出与人类感染相似。缺点:猫的胃 <i>H. pylori</i> 患病率很高,且多为混合感染,从 41%~100%不等。	研究 <i>H. pylori</i> 的病理机制过程。	[35,37-38]
	狗	胃肠道	优点:可以和人共患同一种菌种。缺点: <i>H. pylori</i> 自然感染率高,与人类相比,成本较高。	—	[35,37]
兔形目	兔子	血清	优点: <i>H. pylori</i> 菌株的重组复合物在兔子体内能产生对 <i>H. pylori</i> 特定成分产生强烈且特异的 IgG 反应。缺点:与人类相比,兔生理结构明显差异,胃内定植机制不清。	<i>H. pylori</i> 疫苗的研发。	[39-40]

综上所述,在动物身上建立类似人类感染 *H. pylori* 模型,能直接或间接反映 *H. pylori* 感染后引起相关发生和发展规律。本文比较分析了 *H. pylori* 在 5 大类哺乳动物模型的特点,从定植感染、致病机制、发病率、病理变化及模型成本等方面进行对比总结,为实验动物模型的选择提供理论支持。

参考文献:

[1] ALEXANDER S M, RETNAKUMAR R J, CHOUHAN D, et al. *Helicobacter pylori* in human stomach; the inconsistencies in clinical outcomes and the probable causes[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 713955.

[2] LIU Z L, LI H, HUANG X T, et al. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and vaccines; current status and future prospects [J]. Helicobacter, 2024, 29 (4): e13119.

[3] 李笋, 戚远通, 苟强, 等. 建立幽门螺杆菌感染动物模型需考虑的因素[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(10): 914-920.

[4] BOTTING J M, TACHIYAMA S, GIBSON K H, et al. Fl-gV forms a flagellar motor ring that is required for optimal motility of *Helicobacter pylori* [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0287514.

[5] 宋元彬. 幽门螺杆菌的致病机制及检测方法[J]. 中国医学创新, 2022, 19(34): 184-188.

[6] 黄览, 王道敏, 黄赞松, 等. 幽门螺杆菌定植与致病机制的

- 研究新进展[J]. 中国医学创新, 2022, 19(14): 166-170.
- [7] DUAN M, LI Y Y, LIU J, et al. Transmission routes and patterns of *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*, 2023, 28(1): e12945.
- [8] TESTERMAN T L, SEMINO-MORA C, CANN J A, et al. Both diet and *Helicobacter pylori* infection contribute to atherosclerosis in pre- and postmenopausal Cynomolgus monkeys[J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0222001.
- [9] OHTA E. Pathologic characteristics of infectious diseases in macaque monkeys used in biomedical and toxicologic studies[J]. *J Toxicol Pathol*, 2023, 36(2): 95-122.
- [10] PEREPELOV A V, SENCHENKOVA S N, KNIREL Y A. Variations in the expression of terminal oligosaccharide units and glycosylation of poly(N-acetylglucosamine) chain in the *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide upon colonization of *Rhesus* macaques [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2020, 85(2): 234-240.
- [11] SKOOG E C, DECK S L, ENTWISTLE H D, et al. Characterization of the Cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* from naturally infected *Rhesus* macaques[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(24).
- [12] SUTTON P, BOAG J M. Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori* [J]. *Vaccine*, 2019, 37(50): 7295-7299.
- [13] BAKSH K A, PICHUGIN D, PROSSER R S, et al. Allosteric regulation of the nickel-responsive NikR transcription factor from *Helicobacter pylori* [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100069.
- [14] 吴林苗, 江剑平. 幽门螺杆菌致病机制及其治疗方式研究进展[J]. 保健医学研究与实践, 2021, 18(4): 144-148.
- [15] 马小莉, 包志贤, 袁浩, 等. 幽门螺杆菌感染的免疫应答及免疫逃逸机制研究进展[J]. 生命科学研究, 2023, 27(2): 147-154, 188.
- [16] AMALIA R, PANENGGAK N S R, DOOHAN D, et al. A comprehensive evaluation of an animal model for *Helicobacter pylori* associated stomach cancer: fact and controversy[J]. *Helicobacter*, 2023, 28(1): e12943.
- [17] NGUYEN T K C, DO H D K, NGUYEN T L P, et al. Genomic and vaccine preclinical studies reveal a novel mouse-adapted *Helicobacter pylori* model for the hpEastAsia genotype in Southeast Asia[J]. *J Med Microbiol*, 2024, 73(1). DOI:10.1099/jmm.0.001786.
- [18] BANERJEE A, THAMPHIWATANA S, CARMONA E M, et al. Deficiency of the myeloid differentiation primary response molecule MyD88 leads to an early and rapid development of *Helicobacter*-induced gastric malignancy [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(1): 356-363.
- [19] RALSER A, DIETL A, JAROSCH S, et al. *Helicobacter pylori* promotes colorectal carcinogenesis by deregulating intestinal immunity and inducing a mucus-degrading microbiota signature[J]. *Gut*, 2023, 72(7): 1258-1270.
- [20] TANG L, TANG B, LEI Y Y, et al. *Helicobacter pylori*-induced heparanase promotes *H. pylori* colonization and gastritis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 675747.
- [21] SEDDIGHI N S, BEHESHTI F, MASOUDI M, et al. Oral administration of bacterial probiotics improves *Helicobacter pylori*-induced memory impairment in rats; insights from behavioral and biochemical investigations[J]. *Behav Brain Res*, 2024, 463: 114903.
- [22] WEN J X, WU S H, MA X, et al. Zuojin Pill attenuates *Helicobacter pylori*-induced chronic atrophic gastritis in rats and improves gastric epithelial cells function in GES-1 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114855.
- [23] WANG Z D, CORMIER R T. Golden Syrian *Hamster* models for cancer research [J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2395.
- [24] GONCIARZ W, KRUPA A, CHMIELA M. Proregenerative activity of IL-33 in gastric tissue cells undergoing *Helicobacter pylori*-induced apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1801.
- [25] KUANG Y L, WU T, LIU J Y, et al. Advances in *Helicobacter pylori* vaccine research: from candidate antigens to adjuvants-a review [J]. *Helicobacter*, 2024, 29(1): e13034.
- [26] ANSARI S, YAMAOKA Y. Animal models and *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(11): 3141.
- [27] HANSEN L M, DEKALB D J, CAI L P, et al. Identification of pathogenicity island genes associated with loss of type IV secretion function during murine infection with *Helicobacter pylori* [J]. *Infect Immun*, 2020, 88(6): e00801-19.
- [28] 毛雅琴. 幽门螺杆菌国内流行株动物模型的建立[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [29] 赵爱玲, 刘一品. 幽门螺旋杆菌感染与胃癌发病及防治相关性进展[J]. 临床医学进展, 2022, 12(6): 5173-5180.
- [30] RANJBAR R, CHEHELGERDI M. Genotyping and antibiotic resistance properties of *Helicobacter pylori* strains isolated from human and animal gastric biopsies[J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 2545-2554.
- [31] MOMTAZ H, DABIRI H, SOUOD N, et al. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings[J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14: 61.
- [32] SAEIDI E, SHEIKHSHAHROKH A. VacA genotype status of *Helicobacter pylori* isolated from foods with animal origin[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8701067.
- [33] 黄欢. 猪胃溃疡的发生及其防治[J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(2): 165-166.

本文引文格式:黄浩,梁琼,王春芳,等. 高密度脂蛋白在脓毒症中的研究进展[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):346-350.

【医学综述】

高密度脂蛋白在脓毒症中的研究进展

黄浩¹,梁琼²,王春芳³,向淑麟⁴,梁燕冰²,邓琪¹,皮尔誉¹

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院呼吸与危重症医学科,广西 百色 533000;
3. 右江民族医学院附属医院检验科,广西 百色 533000;
4. 广西壮族自治区人民医院重症医学科,广西 南宁 530016)

摘要: 脓毒症是一种由感染引起的全身性炎症反应综合征,其特征是机体对感染的反应失调,导致器官功能障碍。高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)作为一类具有多种生物学功能的脂蛋白,在脓毒症中发挥保护作用,不仅参与胆固醇的逆向转运,还具有抗炎、抗氧化和免疫调节等多种生物活性,在脓毒症的发病机制中扮演着重要角色。本文综述了 HDL 在脓毒症中的研究进展,包括 HDL 的生物学特性、其在脓毒症中的代谢变化和功能作用,以及脓毒症中 HDL 相关治疗策略的潜力。

关键词: 脂蛋白类, HDL; 脓毒症; 炎症反应

中图分类号: R631 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2025)02-0346-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.025

脓毒症作为一种由宿主对感染反应失调引起的严重临床综合征,其特征是迅速发展的器官功能障碍。脓毒症具有较高的发病率和死亡率,一项荟萃分析显示,全球脓毒症的院内发病率为每年 189/10 万人,病死率约为 26.7%^[1]。脓毒症的治疗费用昂贵,对家庭和社会经济造成重大负担,在全球范围内对公共卫生构成了重大威胁,因此早期识别与恰当处理可改善脓毒症患者的预后。目前,脓毒症的新型生物标志物有急性期反应蛋白(如降钙素原、C 反应蛋白等),细胞因子及趋化因子(如白介素-6、白介素-8)等^[2]。

高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)在心血管保护方面的研究已有深入的了解。HDL 不仅是一个简单的胆固醇载体,而且是一个复杂的蛋白质和脂质的组装体,具有多种生物学功能,包括介导胆固醇逆向转运、抗氧化、抗炎和抗血栓等^[3]。近年来,随着对 HDL 及脓毒症病理生理机制研究的深入,研究者们发现 HDL 在脓毒症的发生、发展和预后中扮演着重要角色。本综述旨在探讨 HDL 在脓毒症中的研究进展,包括 HDL 的组成、代谢、脓毒症对 HDL 的代谢变化及其在脓毒症中的潜在治疗作用。

1 HDL 的组成成分

HDL 是一种高度异质的脂蛋白颗粒, HDL 颗粒由蛋白质、脂质、微小 RNA(MicroRNA、miRNA)等多种成分组成。HDL 的组成结构包括以下几个方面:①

蛋白质成分: HDL 的主要结构蛋白是载脂蛋白 A-I, 它占 HDL 中总蛋白质的 70% 以上。其他蛋白质成分包括载脂蛋白 A-II、载脂蛋白 C-III、血清淀粉样蛋白 A、 α -突触核蛋白等^[4]。这些蛋白质在 HDL 的功能中起着至关重要的作用。②脂质成分: HDL 包含多种脂质,如胆固醇酯、甘油三酯和磷脂等^[5]。③酶和脂质转运蛋白: HDL 颗粒还包含许多种酶和脂质转运蛋白^[6],如卵磷脂-胆固醇酰基转移酶、血小板激活因子乙酰水解酶、对氧磷脂酶 1、铜蓝蛋白、胆固醇酯转运蛋白和磷脂转运蛋白等。

2 HDL 的代谢

HDL 的产生是一个复杂的过程,包括细胞内胆固醇的外排和脂质的组装,涉及多种细胞和分子机制。研究表明, HDL 的生成主要通过肝脏和肠道的 ATP 结合盒转运体 A1 介导的胆固醇和磷脂的流出,形成新生的 HDL 颗粒。此外,巨噬细胞和其他细胞通过 ATP 结合盒转运体 G 成员 1 和 B 类 I 型清道夫受体等转运体也参与 HDL 的生成和成熟过程^[7]。HDL 主要在肝脏和小肠中合成。细胞内游离胆固醇通过 ATP 结合盒转运体 A1 和 ATP 结合盒转运体 G 成员 1 等转运体从细胞内转移到细胞膜上,与肝细胞和肠道上皮细胞分泌的载脂蛋白-I 结合形成新生的 HDL^[5]。卵磷脂-胆固醇酰基转移酶催化游离胆固醇与磷脂反应生成胆固醇酯,进一步成熟 HDL 颗

基金项目: 广西自然科学基金项目(2021JJA140882); 广西急性呼吸窘迫综合征诊治研究重点实验室课题(ZZH2020013)

第一作者: 黄浩,在读硕士研究生,研究方向:内科临床技能训练与研究(呼吸系统),E-mail:920754184@qq.com

通讯作者: 梁琼,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:急性呼吸窘迫综合征,E-mail:lqiangqiong@163.com

粒^[7]。成熟的 HDL 颗粒通过肝脏表面 SR-BI 受体被摄取,胆固醇酯被转运到肝脏进行代谢,肝脏将胆固醇转化为胆汁酸,并通过胆汁排出体外,完成胆固醇的逆向转运过程,而载脂蛋白主要通过肾脏排泄^[8]。外周组织细胞中的胆固醇通过 HDL 颗粒转运至肝脏的过程称为胆固醇的逆向转运。胆固醇的这种反向流动可以直接通过 HDL 颗粒与 SR-BI 之间的相互作用而发生,也可以通过胆固醇酯转运蛋白的作用介导胆固醇酯转移至非 HDL 脂蛋白而间接发生。

3 HDL 在脓毒症中的作用

3.1 抗炎作用 脂多糖是革兰阴性细菌外膜的主要成分,也是造成脓毒症的重要内毒素。大量研究表明,所有脂蛋白(乳糜微粒、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白和 HDL)都能够结合脂多糖。脂多糖与脂蛋白的结合具有高度特异性,与其他脂蛋白相比,HDL 对脂多糖的结合能力最高,同时脂多糖也优先与 HDL 颗粒结合^[9]。脂多糖入血后,脂多糖结合蛋白识别脂多糖,并与 Toll 样受体 4 结合,通过髓样分化因子 88 依赖性和 MyD88 非依赖性信号传导通路激活 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶引起级联反应,释放大量炎症介质,形成炎症介质瀑布样反应,导致细胞损伤^[10]。HDL 可抑制由脂多糖激活的 TLR4 信号通路,通过与脂多糖结合抑制脂多糖-LBP-TLR4 复合物的形成,阻断炎症下游信号传导,减轻脓毒症期间的炎症反应^[11]。脂多糖主要通过脂多糖结合蛋白转移到脂蛋白,但磷脂转运蛋白也可以从细菌膜中提取脂多糖并将其转移到人血清中的 HDL 颗粒中。此外,脂多糖结合蛋白可以在脂多糖和 CD14 之间形成复合物,该复合物能够结合 HDL 颗粒,HDL 与脂多糖结合致使脂多糖失活。

除了具有结合和中和脂多糖作用外,HDL 还具有促进脂多糖清除的作用,主要通过 SR-BI 结合并介导脂多糖摄取。有文献报道^[12],在体外脂多糖诱导的内毒素血症,SR-BI 基因缺失小鼠表现出内毒素清除障碍。这些研究结果说明,HDL 能作为脂多糖运载体并通过 SR-BI 促进脂多糖清除。革兰阳性菌的脂磷壁酸被认为与脂多糖相似,HDL 对脂磷壁酸的亲和力似乎最高,能够通过与脂磷壁酸结合来抑制其对巨噬细胞的激活。这表明 HDL 可能通过与革兰阳性菌的脂磷壁酸结合,发挥抗菌和抗炎作用^[5]。脂多糖和脂磷壁酸之间的结构相似,HDL 很可能通过 SR-BI 介导的脂磷壁酸摄取来中和脂磷壁酸,并促进脂磷壁酸清除。

载脂蛋白-I 在 HDL 的抗炎功能中起着关键作用,并表现出对脓毒症的保护作用。与对照小鼠相比,缺乏 HDL 的载脂蛋白-I 基因敲除小鼠血清中的脂多糖中和作用降低^[13]。另一方面,与对照组相比,载脂蛋白-I 的过度表达可适度改善小鼠的存活率,这表明 HDL 中的载脂蛋白-I 含量升高可能可防止脓毒症死亡。在脓毒症大鼠中,在 HDL 给药后注入脂多糖,

HDL 通过降低肿瘤坏死因子 α (TNF α)和一氧化氮的产生来防止脂多糖诱导的器官损伤^[14]。

3.2 抗氧化应激作用 HDL 在体内具有显著的抗氧化作用,能够通过多种机制减少氧化应激对细胞的损伤。HDL 含有多种抗氧化酶和蛋白质,如对氧磷酶 1、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶(SOD),这些酶可以中和自由基,保护细胞免受氧化损伤^[15]。HDL 颗粒中存在的多种抗氧化酶里,研究最多的是抗氧化酶氧磷酶 1,氧磷酶 1 是肝脏合成的重要氧化酶,可保护脂蛋白免受氧化,也能增强对巨噬细胞自由基的清除^[16]。HDL 在抗氧化应激中的作用不仅限于其携带的抗氧化酶,还能够使中性粒细胞还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶失活,减少活性氧的生成。在氧化应激过程中,作为促炎和氧化介质主要来源的单核细胞表现出先天免疫系统的反应能力。在脓毒症早期,循环单核细胞迁移至血管内皮并成熟为巨噬细胞,巨噬细胞氧化脂质体并分化为泡沫细胞,释放炎症细胞因子,激活 T 淋巴细胞和更多的单核细胞。HDL 通过抑制内皮细胞黏附分子的表达减少单核细胞的活化和迁移,从而发挥抗氧化和抗炎作用^[17]。

3.3 促进内皮修复和血管生成 HDL 通过上调内皮一氧化氮合酶和内皮依赖性血管扩张、刺激内皮细胞增殖和迁移以及内皮祖细胞介导的内皮修复来促进内皮修复^[18]。HDL 通过促进连接闭合、防止糖萼层丢失、抑制凋亡、刺激成熟内皮细胞和内皮前体细胞的增殖和迁移来维持内皮细胞的完整性和功能^[19]。在人真皮微血管内皮细胞中,HDL 可直接抑制由 TNF α 诱导的血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1 和 E-选择素表达,保护血管内皮的完整性^[20]。1-磷酸鞘氨醇是一种生物活性脂质,对维持血管屏障功能至关重要,HDL 是 S1P 在血浆中的重要载体之一,HDL 相关的 S1P 在保护肺血管内皮通透性和维持血管内皮功能方面发挥重要作用。在体外实验中,HDL-S1P 能够保护脂多糖刺激下的人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移能力,这种保护作用可能部分通过激活 S1P 受体 1 实现,HDL-S1P 通过选择性激活 S1P 受体 1,可能减少内皮细胞的黏附表达,减少免疫细胞释放炎症因子,从而减轻脓毒症引起的肺血管内皮的损伤^[21]。研究发现 HDRACA 是一种涉及 HDL 调节血管生成的长链非编码 RNA,正常的 HDL 能够在健康个体中诱导血管生成,正常的 HDL 能够通过抑制 HDRACA 的表达来促进血管生成,正常的 HDL 能够通过激活含有 WW 结构域 E3 泛素蛋白连接酶 2,降低内皮细胞中 HDRACA 的表达,该酶催化其转录因子 Kruppel-like factor 5 的泛素化及其随后的降解,这一过程通过 S1P 受体 1 实现,正常的 HDL 还可以通过增加内皮细胞转化生长因子 β 2 的表达,激活一氧化氮合酶和 p44/42 丝裂原活化蛋白酶信号通路,调控缺氧诱导因子-1 α 的翻译后

修饰,抑制胆固醇酯转运蛋白来诱导血管生成^[22]。在一项研究中,首次表明正常的 HDL 可以通过刺激内皮自噬来增加一氧化氮合酶表达和一氧化氮生成,从而诱导血管生成,而功能失常的 HDL 通过抑制内皮自噬来减少血管生成^[23]。

3.4 抗凋亡作用 HDL 的抗凋亡功能可能与其抗氧化能力有关。细胞凋亡已被证明是氧化应激刺激后的主要结果之一,HDL 能够通过减少氧化应激来保护细胞免受损伤,从而抑制细胞凋亡。实验表明,HDL 能够保护骨髓来源的间充质干细胞免受氧化应激诱导的凋亡,这一保护作用通过激活 PI3K/Akt 途径和降低活性氧水平实现^[24]。此外,HDL 因其抗内皮细胞凋亡和心肌细胞凋亡而具有内皮保护和心肌细胞保护特性。HDL 被证明可以保护内皮细胞免于原发性细胞凋亡,并降低氧化低密度脂蛋白诱导的细胞内活性氧^[25]。HDL 通过激活 AMP-激活蛋白激酶减少了棕榈酸诱导的心肌细胞凋亡,AMP-激活蛋白激酶在心肌细胞中具有直接的抗凋亡特征^[26]。

3.5 HDL 在肾上腺生物学中的作用 糖皮质激素主要由肾上腺皮质束状带细胞合成和分泌,其分泌和生成促肾上腺皮质激素的调节。糖皮质激素的合成原料主要是胆固醇,它在肾上腺皮质细胞内的线粒体和内质网中经过一系列酶促反应转化为糖皮质激素。肾上腺功能不全的特征是糖皮质激素不足,常与脓毒症有关。由于肾上腺中仅储存少量糖皮质激素,脓毒症中的原发性肾上腺功能衰竭通常是由于糖皮质激素生物合成不足造成的^[27]。SR-BI 是一种 HDL 受体,SR-BI 在肾上腺、卵巢和睾丸中高度表达,其功能是通过从 HDL 和低密度脂蛋白中选择性吸收胆固醇酯为类固醇激素合成提供胆固醇,尽管低密度脂蛋白受体也通过低密度脂蛋白吸收参与胆固醇输送,但 SR-BI 介导的 HDL 胆固醇吸收似乎是胆固醇更重要的来源^[28]。载脂蛋白 A-I 基因缺失小鼠血浆 HDL 耗竭或 SR-BI 失活会显著降低肾上腺中的 CE 含量^[29],表明了载脂蛋白 A-I 基因缺失小鼠中,肾上腺功能受到影响,糖皮质激素生成受限。SR-BI 在糖皮质激素生成中的关键作用表明,SR-BI 介导的肾上腺 HDL 胆固醇输送下调可能是导致糖皮质激素不足的一种机制,脓毒症期间 HDL 水平降低会减少 SR-BI 介导的肾上腺 HDL 胆固醇输送。HDL 在脓毒症中的重要性也因其肾上腺皮质类固醇生产中的作用而得到强调。脓毒症中下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活导致肾上腺皮质糖皮质激素的产生,这代表了 HDL 维持稳态的关键调节作用。

4 HDL 在脓毒症期间的代谢变化

在感染性休克的急性期,HDL 水平急剧下降,并向大 HDL 颗粒转变^[30]。同时在脓毒症发生后早期,HDL 的载脂蛋白成分发生变化,如载脂蛋白 A-I 水

平下降,而急性期蛋白血清淀粉样蛋白 A 显著增加并可能取代载脂蛋白 A-I 成为 HDL 的主要载脂蛋白,急性期蛋白血清淀粉样蛋白 A 的富集可能导致 HDL 的抗炎功能受损,并可能使其从抗炎转变为促炎状态,影响 HDL 在炎症反应中的作用^[31]。脂质和其他蛋白质成分也发生变化,例如磷脂含量降低,游离胆固醇、甘油三酯、脂多糖结合蛋白含量增加^[8]。脓毒症患者中与脂蛋白代谢有关的酶,如卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性、卵磷脂胆固醇酰基转移酶浓度和胆固醇酯转移蛋白活性显著降低,而磷脂转移蛋白和内皮脂酶显著升高^[32]。高水平的胆固醇酯转移蛋白活性会导致 HDL 消耗掉胆固醇,并更快地从循环中移除,导致较低的 HDL 水平。内毒素可抑制胆固醇酯转移蛋白的表达和血浆胆固醇酯转移蛋白的活性,从而减轻脓毒症时 HDL 的下降。卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性的降低可能阻碍胆固醇酯的形成,影响 HDL 的成熟和功能,对氧磷酶 1 活性的降低可能减弱 HDL 的抗氧化性能,影响其保护作用。

5 HDL 在脓毒症中的治疗潜力

CSL-111(一种重组高密度脂蛋白)是由从人血浆中纯化的载脂蛋白 AI 与大豆磷脂酰胆碱结合形成类似于天然重组 HDL 的盘状颗粒组成。输注 CSL-111 可提高脓毒症小鼠的存活率,与生理盐水组相比,在腹膜炎和肺炎模型中,注射 CSL-111 可减轻血浆和肺的炎症,经 CSL-111 治疗的小鼠在脓毒症后 24 h 血浆、肝脏和肺部细菌计数的减少均有统计学意义,肺内巨噬细胞浸润也较少。这些结果强调了 HDL 在细菌中和和清除中的关键作用,为探索 HDL 在脓毒性疾病中的治疗潜力提供了机会^[33]。同样,补充合成 HDL (sHDL ETC-642)不仅可以中和脂多糖,还可以显著抑制 TLR4-NF- κ B 信号和促炎细胞因子的产生,从而改善脓毒症小鼠的器官功能障碍和 7 d 生存率^[34]。研究表明有严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 感染入住 ICU 的患者,接受由人重组载脂蛋白 A-I 和磷脂 CER-001(一种工程化的高密度模拟物)组成的合成 HDL 短期治疗(q12 h,1~2 d),在所有病例中,CER-001 都能迅速降低不同细胞因子的水平,并相应改善患者的临床状况^[35-36]。CER-001 作为一种新的辅助治疗脓毒症的潜在作用的研究中,证明了 CER-001 具有通过胆汁清除内毒素的显著作用,以及其调节细胞因子风暴、减少内皮功能障碍和防止器官损伤的能力,并且进行了一项概念验证性临床研究,证实了 CER-001 在脓症患者中的多效作用在减少肾损害、器官支持需求和 ICU 住院方面,体现了这种治疗方法的潜在临床意义^[37]。载脂蛋白 A-I 是 HDL 的主要蛋白质成分,具有抗炎和抗氧化特性,可能在脓毒症的炎症免疫反应中发挥重要作用。载脂蛋白 A-I 模拟肽是人工合成的肽类,具有与天然载脂蛋白 A-I 类似的功能载

蛋脂白 A-I 已在动物模型中显示出对脓毒症介导的急性肺损伤的保护作用,其主要保护机制是直接抑制内毒素活性和维持 HDL 的抗氧化活性^[38]。国外学者对脓毒症患者 HDL 代谢相关基因进行了靶向重测序,发现了 CETP(rs1800777-A)中一种罕见的错义变异,该变异与脓毒症期间 HDL 水平的显著降低有关^[39],这种遗传方法表明,由于 CETP 基因的功能获得变异,遗传相关的低 HDL 水平是脓毒症生存率降低的一个因果危险因素,也说明 HDL 在感染时受到 CETP 的强烈调节,这是 CETP 免疫调节作用的高度支持证据,为基于 CETP 提高 HDL 水平的基因治疗提供了一定的依据^[40]。最近的一项研究表明,CETP 抑制剂通过 HDL 依赖性机制减少炎症,并可能通过 HDL 独立机制激活巨噬细胞,CETP 抑制剂显著提高了小鼠肺炎模型的生存率,并减少了肺炎的严重程度^[41]。这些发现表明,最初用于治疗心血管疾病的 CETP 抑制剂有可能被重新用作脓毒症的治疗方法。EL 是一种由内皮细胞合成并固定在内皮细胞腔表面的酶,它主要水解 HDL 中的磷脂,是调节血浆 HDL 浓度的主要因素^[42]。人体研究结果表明血浆 EL 水平与 HDL 水平呈反比关系,EL 过表达导致血浆 HDL 浓度降低,而 EL 功能丧失的人 HDL 水平升高^[43],因此选择性抑制 EL 能增加 HDL 并为脓毒症的治疗提供潜在益处。类似的,基于 HDL 的脓毒症治疗还涉及一些调节 HDL 代谢、颗粒有关的酶,包括重组卵磷脂-胆固醇酰基转移酶、重组磷脂转运蛋白等^[44]。

6 结语

在脓毒症患者中,HDL 水平的显著降低与病情的严重程度和不良预后密切相关。HDL 不仅能够通过结合和中和内毒素来减轻脓毒症机体的炎症反应,还可能通过抗氧化、保护内皮细胞功能等多重机制参与脓毒症的病理生理过程。此外,HDL 的组成和代谢在脓毒症期间也会发生显著变化,这些变化可能影响了 HDL 的功能,从而在脓毒症的进展中起到关键作用。重组 HDL、合成 HDL、载蛋脂白 A-I 模拟肽、CETP 抑制剂等药物具有治疗脓毒症患者的潜力,有望成为临床治疗脓毒症的研究靶点。因脓毒症存在很大的异质性,有学者提出了脓毒症亚型,根据分类基础的不同,脓毒症亚型主要分为以下几类:①基于基因组学指标的脓毒症内型;②基于生物标志物和临床指标的脓毒症亚型;③基于临床大数据的脓毒症表型^[45]。不同的亚型反应性不同,为了针对不同的亚型采取精准治疗,如何在脓毒症亚型中实现基于 HDL 的相关治疗,还有很多方面仍有待完善。

参考文献:

[1] FLEISCHMANN-STRUZEK C, MELLHAMMAR L, ROSE N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expand-

ed systematic review and meta-analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(8):1552-1562.

- [2] 陈师林,王兰,邓亚萍. 脓毒症早期识别及评估预后的生物标志物的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(10): 52-55.
- [3] 孔抒月,邵俊,於江泉,等. 高密度脂蛋白在脓毒症中的研究进展[J]. *大连医科大学学报*, 2023, 45(6):544-549.
- [4] VON ECKARDSTEIN A, NORDESTGAARD B G, REMALEY A T, et al. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance[J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(16):1394-1407.
- [5] 许臻,龚朵,刘厂辉,等. 高密度脂蛋白功能研究新进展[J]. *生理科学进展*, 2022, 53(5):363-367.
- [6] RIZZO M, OTVOS J, NIKOLIC D, et al. Subfractions and subpopulations of HDL: an update[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(25):2881-2891.
- [7] CHO K H. The current status of research on high-density lipoproteins (HDL): a paradigm shift from HDL quantity to HDL quality and HDL functionality[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7):3967.
- [8] 许智坤,郑标林,许小泽,等. 高密度脂蛋白与脓毒症关系的研究进展[J]. *内科*, 2020, 15(6):711-715.
- [9] LEVELS J H, ABRAHAM P R, VAN DEN ENDE A, et al. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(5):2821-2828.
- [10] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [11] RYU J K, KIM S J, RAH S H, et al. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer[J]. *Immunity*, 2017, 46(1):38-50.
- [12] GUO L, SONG Z Q, LI M T, et al. Scavenger receptor BI protects against septic death through its role in modulating inflammatory response[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(30):19826-19834.
- [13] GUO L, AI J T, ZHENG Z, et al. High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(25):17947-17953.
- [14] LEE R P, LIN N T, CHAO Y C, et al. High-density lipoprotein prevents organ damage in endotoxemia[J]. *Res Nurs Health*, 2007, 30(3):250-260.
- [15] CHIESA S T, CHARAKIDA M. High-density lipoprotein function and dysfunction in health and disease[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2019, 33(2):207-219.
- [16] 梁群,薛鸿征,冯文佳. 脂蛋白在脓毒症中作用的研究进展[J]. *中国急救医学*, 2021, 41(8):729-733.
- [17] LI J Y, YAO R Q, LIU S Q, et al. Efficiency of monocyte/high-density lipoprotein cholesterol ratio combined with neutrophil/lymphocyte ratio in predicting 28-day mortality in patients with sepsis[J]. *Front Med (Lau-sanne)*, 2021, 8:741015.
- [18] HE D, ZHAO M M, WU C Y, et al. Apolipoprotein A-1 mimetic peptide 4F promotes endothelial repairing and

- compromises reendothelialization impaired by oxidized HDL through SR-B1[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 228-242.
- [19] ROBERT J, OSTO E, VON ECKARDSTEIN A. The endothelium is both a target and a barrier of HDL's protective functions[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1041.
- [20] MUÑOZ-VEGA M, MASSÓ F, PÁEZ A, et al. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 44.
- [21] 范怡雯. 探究高密度脂蛋白相关 1-磷酸鞘氨醇在脓毒症中对肺血管内皮功能的作用及其机制[D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [22] MO Z W, PENG Y M, ZHANG Y X, et al. High-density lipoprotein regulates angiogenesis by long non-coding RNA HDRACA [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 299.
- [23] KANG B A, LI H M, CHEN Y T, et al. High-density lipoprotein regulates angiogenesis by affecting autophagy via miRNA-181a-5p[J]. *Sci China Life Sci*, 2024, 67(2): 286-300.
- [24] XU J F, QIAN J Y, XIE X X, et al. High density lipoprotein protects mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway and suppression of reactive oxygen species[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 17104-17120.
- [25] DE SOUZA J A, VINDIS C, NÈGRE-SALVAYRE A, et al. Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A- I [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(3): 608-620.
- [26] SPILLMANN F, TRIMPERT C, PENG J, et al. High-density lipoproteins reduce palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis in an AMPK-dependent manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(2): 272-277.
- [27] MILLER W L. StAR search-what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(3): 589-601.
- [28] PLUMP A S, ERICKSON S K, WENG W, et al. Apolipoprotein A- I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(11): 2660-2671.
- [29] RIGOTTI A, TRIGATTI B L, PENMAN M, et al. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12610-12615.
- [30] TANAKA S, DIALLO D, DELBOSC S, et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients[J]. *Ann Intensive Care*, 2019, 9(1): 68.
- [31] WEBB N R. High-density lipoproteins and serum amyloid A (SAA)[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2021, 23(2): 7.
- [32] REISINGER A C, SCHULLER M, SOURIJ H, et al. Impact of sepsis on high-density lipoprotein metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 795460.
- [33] TANAKA S, GENÈVE C, ZAPPELLA N, et al. Reconstituted high-density lipoprotein therapy improves survival in mouse models of sepsis [J]. *Anesthesiology*, 2020, 132(4): 825-838.
- [34] GUO L, MORIN E E, YU M Z, et al. Replenishing HDL with synthetic HDL has multiple protective effects against sepsis in mice [J]. *Sci Signal*, 2022, 15(725): eabl9322.
- [35] FAGUER S, DEL BELLD A, DANET C, et al. Apolipoprotein-A- I for severe COVID-19-induced hyperinflammatory states: a prospective case study[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 936659.
- [36] TANAKA S, BEGUE F, VEEREN B, et al. First recombinant high-density lipoprotein particles administration in a severe ICU COVID-19 patient, a multi-omics exploratory investigation[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(4): 754.
- [37] STASI A, FIORENTINO M, FRANZIN R, et al. Beneficial effects of recombinant CER-001 high-density lipoprotein infusion in sepsis: results from a bench to bedside translational research project [J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 392.
- [38] SHARIFOV O F, XU X, GAGGAR A, et al. Anti-inflammatory mechanisms of apolipoprotein A- I mimetic peptide in acute respiratory distress syndrome secondary to sepsis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64486.
- [39] TRINDER M, GENGA K R, KONG H J, et al. Cholesteryl ester transfer protein influences high-density lipoprotein levels and survival in sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(7): 854-862.
- [40] BLAUW L L, WANG Y N, WILLEMS V D K, et al. A novel role for CETP as immunological gatekeeper: raising HDL to cure sepsis? [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2020, 31(5): 334-343.
- [41] DENG H Y, LIANG W Y, CHEN L Q, et al. CETP inhibition enhances monocyte activation and bacterial clearance and reduces streptococcus pneumonia-associated mortality in mice[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(8): e173205.
- [42] KNAPP M, GORSKI J. Endothelial lipase: regulation and biological function[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2022, 73(3). DOI:10.26402/jpp.2022.3.01.
- [43] WU Y E, MA L, ZHANG H, et al. Significant association between the endothelial lipase gene 584C/T polymorphism and coronary artery disease risk[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(9): BSR20200027.
- [44] SINGH S A, ANDRASKI A B, HIGASHI H, et al. Metabolism of PLTP, CETP, and LCAT on multiple HDL sizes using the orbitrap fusion lumos[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(3): e143526.
- [45] 郝辰肖, 安友仲, 赵慧颖. 脓毒症亚型与精准治疗: 进展和趋势[J]. *中华重症医学电子杂志*, 2022, 8(2): 105-109.

收稿日期: 2024-08-30; 修回日期: 2024-11-10

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:闭覃宇,黄柄桦,罗世官.腹主动脉瘤腔内修复术后内漏的预防策略与治疗进展[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):351-356.

【医学综述】

腹主动脉瘤腔内修复术后内漏的预防策略与治疗进展

闭覃宇,黄柄桦,罗世官

(右江民族医学院附属医院百东院区,广西 百色 533000)

摘要: 随着人口老龄化及心血管危险因素增加,主动脉瘤发病率上升,血管内动脉瘤修复技术(EVAR)虽成主要治疗手段,但术后内漏影响其远期疗效。本综述对内漏分类、发病机制、预防及治疗进行阐述。内漏分 I~V 型,I、II 型常见,与手术技术和解剖结构有关,III、IV、V 型少见,IV 型多具自限性。预防和治疗上,I 型内漏预防注重支架密封,如 IV 型可加固近端锚定区,IB 型可延长远端支架等;II 型内漏预防可栓塞瘤囊分支动脉或填充瘤腔,治疗可选经皮动脉栓塞等;III 型内漏预防需确保支架组件连接,治疗因病况而异;IV 型内漏多自行缓解;V 型内漏机制不明,治疗个体化。临床应重视内漏早期识别与分类,制定个体化防治策略,虽然新材料和新技术的应用为内漏预防提供了更多选择,但其长期效果仍需进一步研究验证。未来仍需开发新技术并评估长期效果,以提高患者生活质量和生存率。

关键词: 主动脉瘤,腹腔内修复术;内漏;预防策略

中图分类号: R543.16

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0351-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.026

随着人口老龄化和心血管方面危险因素的增加,以胸、腹部和降主动脉为主要发生部位的主动脉瘤在我国以及全球范围内发病率呈上升趋势^[1-2]。其瘤体的破裂风险与瘤体的大小、扩张速度以及患者的年龄和性别等因素密切相关,其无症状的生长引起破裂时死亡率超 90%,对患者的健康构成严重威胁^[3]。随着医疗技术的发展,血管内动脉瘤修复术(endovascular aortic repair, EVAR)已经逐步取代了传统的开放手术,成为治疗的主要手段,其在有效性和安全性上已经取得多数临床研究的认可,但术后内漏的问题仍然是影响其远期疗效的主要因素,可能会导致瘤体持续增大,增加破裂风险^[4-6]。而针对这一问题,近年来的研究主要集中在如何有效预防和治疗内漏,以提高 EVAR 的成功率和患者的长期生存率。因此,本研究综述了 EVAR 后内漏的相关研究,旨在全面理解这一领域的研究动态,并为临床实践提供科学依据。

1 内漏的分类及概况发病机制

内漏在国际上被定义为 EVAR 后,血液通过各种途径持续流入动脉瘤囊内的现象,未能完全隔绝假腔,是 EVAR 术后最常见的并发症之一。内漏总体发生率各研究组间有较大差异,约 10%~50%^[7-9]。根据发生机制和位置的不同,内漏可分 I~V 型。

1.1 I 型内漏 I 型内漏是指血液通过支架移植物

与血管壁之间的间隙流入动脉瘤囊。I 型内漏是支架移植物与血管壁之间密封失败的表现,可能是由于主动脉形态的变异,如主动脉颈部的扩张或支架移植物位置的变动所导致。根据漏血位置的不同,可进一步细分为:由近端附着点引起的 IA 型,由远端附着点引起的 IB 型和发生在髂动脉密封区的 IC 型^[10]。其中 IA 型内漏的发生主要是由于支架固定不良或瘤颈扩张导致。而 IB 型内漏则与覆膜支架在远端与髂总动脉或髂外动脉血管壁的密合性不足相关。I 型内漏在 2%~10% 的 EVAR 病例中被发现,且其发生率随时间推移有增加趋势^[11]。从术后 1 个月内的监测影像中观察到 3.5% 的发生率,增加到 12 个月时的 6.8%,I 型内漏在所有发生内漏类型中占比约 12%^[11],凸显了其在 EVAR 术后并发症中的重要地位。因此,对于 I 型内漏的预防、早期诊断与有效治疗策略的研发,对于提高 EVAR 手术的成功率及患者预后具有重要意义。

1.2 II 型内漏 II 型内漏是由主动脉或髂动脉分支(如髂腰动脉、肠系膜下动脉、副肾动脉、正中骶动脉和髂内动脉)的逆行血流进入动脉瘤囊引起的^[10-11]。根据受累分支的数量,可进一步分为:IIA 型,仅累及 1 个分支;IIB 型,累及 2 个或 2 个以上分支,通常有一条主要流入动脉和一条或多条流出动脉^[10]。II 型内漏是 EVAR 后最常见的内漏类型,也是需要再次手术干预

基金项目: 国家自然科学基金项目(82360259)

第一作者: 闭覃宇,硕士,研究方向:外科学(胸心外科方向),E-mail:569775834@qq.com

通讯作者: 罗世官,主任医师,研究方向:外科学(胸心外科方向),E-mail:luoshiguan2009@sina.com

的内漏类型,其发生率为 10%~44%,存在显著的变异^[12],也是引发再次手术干预的主要原因之一。这种变异可能源于患者个体差异、手术技巧、术后管理以及随访时间的差异。因此,深入研究Ⅱ型内漏的发病机制、危险因素及预防策略,对于优化 EVAR 手术效果、减少并发症及改善患者预后具有至关重要的意义。同时,与Ⅰ型内漏相比,Ⅱ型内漏的发生机制更为复杂,涉及更多血管分支的血流动力学变化,增加了其诊断与治疗的难度。

1.3 Ⅲ型内漏 相比于Ⅰ型和Ⅱ型内漏,Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型内漏在研究中报告的发生率均较低,可能与其发病机制有关。Ⅲ型内漏可能由动脉瘤结构迂曲、支架移位、材料缺陷或组件间重叠不当造成^[9,11],可进一步细分为:支架衔接部位移或脱离(ⅢA)、支架覆膜破损(ⅢB)、支架衔接部之间未完全贴合(ⅢC)。对比Ⅰ型和Ⅱ型内漏,Ⅲ型内漏则归因于支架移植物本身的结构缺陷,而随着支架设计和材料的不断改进,Ⅲ型内漏的发生率有所下降,较新的支架移植物设计可能会进一步减少结构缺陷的风险。目前,Ⅲ型内漏发生率大约在 0.7%~4.5%之间^[9-11]。由于Ⅲ型内漏是在支架组件发生移动或材料疲劳后才易被检测,因此迟发型Ⅲ型内漏则更为常见,但也会导致患者的预后较差,同时也反映了其临床管理和治疗的复杂性。

1.4 Ⅳ型内漏 Ⅳ型内漏发生的原因通常是因为血液穿透覆膜支架的微小孔隙,进而流入瘤腔,这类内漏在所有内漏类型中所占比例较小,大约为 3%^[8]。其原因之一可能是现代支架移植物的设计和制造技术已经大大减少了覆膜的微小孔隙,从而降低了Ⅳ型内漏的发生概率。此外,Ⅳ型内漏的自限性可能也与其较小的漏血路径有关,这些微小孔隙可能随着时间的推移自然闭合,减少了持续漏血的风险^[13]。因此,大多数情况下,Ⅳ型内漏在持续观察期间可能会自行缓解,因此临床实践标准中建议无需对其进行特别治疗^[11]。

1.5 Ⅴ型内漏 Ⅴ型内漏的发生一般与支架内张力过大有关,通常表现为在缺乏明显内漏迹象时动脉瘤囊的异常扩大,发生率为 1%~5%^[14]。其发生机制尚不完全明确。这种情况可能源自未被检测出的其他内漏形式,或者是由于支架材料的微小孔隙导致的超滤现象,以及可能存在的压力传递问题^[9,11,15]。总结而言,Ⅰ型和Ⅱ型内漏更常见,因为两者与手术技术和患者解剖结构的变异性有关,而Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型则通常与支架设计、材料、制造工艺型的进步而变得少见。其中,Ⅳ型内漏具有自限性,很多时候不需要特别治疗。

2 内漏的预防及治疗

2.1 Ⅰ型内漏 预防Ⅰ型内漏发生的措施,主要是通过确保近端或远端支架的密封来实现,该过程涉及到

支架的选择、放置位置以及正确地锚定^[16]。对于ⅠA型内漏,即支架与主动脉壁近端不完全贴合的情况,主要预防措施包括加固近端锚定区。在术中使用成形球囊扩大支架颈部,以增强支架与动脉壁的贴合度,可显著改善Ⅰ型内漏情况^[17]。此外,Palmaz 球囊扩张型支架可以提供更大的径向支撑力,可以有效避免支架与血管壁之间产生缝隙^[18-19]。同时,还有研究发现球囊扩张技术在支架植入前对不规则近端瘤颈部分的预处理具有应用价值,但其确切效果仍待深入研究以验证^[20]。除此之外,延长近端锚定区,如植入覆膜支架延长支架(Cuff),也是封闭内漏口的有效手段^[21]。术中使用纤维蛋白胶进行腔内注射和瘤腔填塞,如弹簧圈联合化学胶 Onyx,也已被证实为预防ⅠA型内漏的有效方法^[22]。如 ZHANG L 等^[23]的研究发现,在 107 例具有复杂瘤颈结构的患者接受 EVAR 手术并结合术中纤维蛋白胶瘤腔填塞后,经过平均 89.1 个月的随访,仅有 1 例(0.93%)发生Ⅰ型内漏。

近年来,辅助内锚系统(EndoAnchors)较为新颖,其利用支架移植物的隔绝作用,还通过血管内锚定装置对动脉瘤颈部进行缝合固定,可为瘤颈长度<10 mm 甚至<4 mm 的情况下提供一种相对可行的治疗选择^[24]。但其手术过程也较为复杂,除了植入支架移植物外,还需要进行 EndoAnchor 植入,在该技术中植入过程达(148.0±80.0) min、EndoAnchor 植入和总透视时间分别为(17.1±11.5) min 和(35.3±22.0) min,平均每个患者需植入(5.5±2.1)个 EndoAnchors^[24]。在 EVAR 手术过程中,可通过提前植入 EndoAnchors 预防因不良颈部解剖结构等因素导致的ⅠA型内漏发生,以及防止主动脉支架移植物迁移,从而提高手术的成功率和长期稳定性^[25-26]。KAROLANIS G 等^[27]在 Meta 分析(8 项研究,968 例患者)中发现,初次 EndoAnchor 固定的技术成功率较高,可达 97.12%(95% CI:92.98~99.67),动脉瘤囊缩小率为 68.82%(95% CI:51.02~84.21),动脉瘤囊增大率为 1.93%(95% CI:0.91~3.24)。平均 6 个月的总体生存率为 93.43%,但随访期内就有 6.23%(95% CI:0.83~15.25)的患者出现持续性ⅠA型内漏,且患者还需要额外的近端主动脉袖套,还出现了如内锚系统相关的不良事件,如内锚骨折、脱位、嵌顿等。因此,虽然其对于预防还是治疗术中ⅠA型内漏均有一定效果,但还需要长期随访确定其有效性和安全性。另一项纳入随访时间更长的 Meta 分析(7 项研究,445 例患者)^[28]则发现,平均随访 15.4 个月中,ⅠA型内漏的发生率为 3.5%,移植物迁移率为 2.0%,认为其在技术上可行且安全,但还缺乏相关的病例对照。而最近的 Meta 分析则表明(16 项研究,1 145 例患者)^[29],

该技术下平均随访 11.9 个月,IA 型内漏发生率为 3.97%(95% CI:0.36~1.99),其中初次 EVAR 内漏发生率为 0.16%(95% CI:0.00~1.65),支架迁移率仅为 0.004%(95% CI:0.00~0.76),但再次干预率仍较高,可达 5.43%(95% CI:0.86~12.54)。综合以上的研究结果,可以认为 EndoAnchors 的加入扩大了 EVAR 手术的适用范围,对腹动脉瘤(AAA)的治疗以及对 IA 型内漏减少了因内漏引发动脉瘤破裂等严重并发症的风险,有利于患者术后的恢复和预后,在短期的随访内具有一定的有效性和安全性,但除了已报道的内锚系统自身的问题(如骨折、脱位等),可能还存在其他潜在的的不良事件,需要更系统、长期的监测和评估,因此 EndoAnchors 可被用于 EVAR 中预防和治疗内漏及支架迁移,但还不足以被推荐为常规使用。针对 IA 型内漏,治疗预防措施的目的是增强支架的稳定性和贴合度,从而降低内漏发生的风险,区别则在于应用场景的不同:Palmar 球囊扩张型支架适用于需要额外径向支撑力的血管;纤维蛋白胶腔内注射和瘤腔填塞则更多地应用于需要填充瘤腔、促进血栓形成以预防内漏的情况;延长近端锚定区则适用于解剖结构复杂、需要提高密封效果的情境;辅助内锚系统则用于需要增强支架稳定性、减少位移的复杂病例。

对于 IB 型内漏,即支架与主动脉壁远端不完全贴合的情况,预防措施主要为延长远端支架至髂血管,以增强锚定力,减少内漏发生^[30]。应用分支支架和开窗支架也是降低 IB 型内漏的有效手段^[31]。支架远段放大策略,即在髂总动脉直径较大时,通过增加支架远段的尺寸来提供更强的锚定力,已被证实可降低 IB 型内漏的发生^[32]。钟底支架作为一种支架远段扩张策略,目前其治疗效果仍存在争议^[33-34],其导致 IB 型内漏的发生风险上升的原因与将支架直接固定在扩张血管区域,使得受影响的动脉持续受到过大的张力有关。持续的张力可能促进动脉病变的进展和扩张,最终可能导致动脉进一步扩张。未来的预防 IB 型内漏的发展趋势可能包括一体化支架的使用,以减少支架间拼接,实现更充分的组件间连接。术中对瘤颈的准确评估和选择合适的支架尺寸同样关键,以确保手术的安全性和有效性。可见,目前预防 IB 型内漏的措施其本质上均以提高支架与血管壁的贴合度和锚定力为目标,以使用应用场景而言,延长支架应用与支架远段直径小于瘤体直径的场景,需加用延长支架延长锚定区,增强远端锚定力;分支支架则适用于瘤体位于多分支血管区,需保持血管分支通畅同时提高密封性的复杂情况。而一体化支架作为未来趋势,则适用于对支架整体性能有更高要求的场合。

综上,治疗 I 型内漏的策略是根据内漏的具体情况

况和患者的解剖结构来定制的。对于 IA 型内漏,重点在于加强近端锚定,治疗方法包括球囊扩张、主动脉袖套植入、球扩支架的应用等,腔内缝合技术能降低再干预率和 IA 型内漏发生率,但远期效果待评估,难治性 IA 型内漏可考虑弹簧圈栓塞、液体栓塞剂等技术或开放手术。而对于 IB 型内漏,则侧重于加强远端锚定,如通过延伸支架至髂外动脉,并栓塞髂内动脉来实现。

2.2 II 型内漏 II 型内漏是 EVAR 术后最常见的内漏类型,也是目前研究的重点。预防 II 型内漏的方法主要包括在术中对瘤囊分支动脉进行栓塞,或使用特殊的材料如 Onyx 胶、纤维蛋白胶、 α -氰基丙烯酸正丁酯(NBCA)等进行瘤囊的填充^[35-38]。纤维蛋白胶作为一种临床中常用的止血和组织黏合材料,具有非细胞毒性、可吸收、凝结快等特点,可能在瘤腔填充方面具有良好的应用价值^[35]。NBCA 作为一种液体栓塞材料,在 EVAR 中预防性栓塞瘤腔以预防 II 型内漏显示出了良好的安全性与有效性^[38]。术中瘤腔填充技术,如使用弹簧圈联合纤维蛋白胶填充瘤腔,已被证明是安全有效的,能够显著降低 EVAR 术后即刻及半年 II 型内漏的发生率^[37]。临床研究显示,预防性瘤腔栓塞可以减少中早期 II 型内漏的发生,防止 EVAR 后囊增大,对再干预率和死亡率无明显影响^[38]。然而,其对长期再干预率和死亡率的影响仍需进一步研究和确认。由此可见,目前针对 II 型内漏,其预防手段之间的差异主要集中于使用材料的不同,选择都基于其特定的优势和患者的具体情况。例如,纤维蛋白胶因其快速凝结特性适合快速形成血栓,而 NBCA 则适用于需要更持久栓塞的情况。术中瘤腔填充技术则结合了物理填充和化学促凝的双重作用,以达到更有效的预防效果。

II 型内漏早期被视为良性并发症,治疗原则为选择性栓塞相关侧支或残余瘤腔。以经皮动脉栓塞为最常用方式,可通过股或肱动脉建立通道,微导管超选至肠系膜下或腰动脉开口处栓塞^[5,9,11]。常用材料包括微弹簧圈、凝固胶或凝血酶^[35-38]。经腰部入路穿刺栓塞适用于常规通路受限患者,CT 引导下确定反流血管,X 光透视下精准穿刺并栓塞^[9,11-12]。腔内治疗失败时,可选择开放手术。开放手术中的处理包括:结扎反流侧支,缝合瘤腔内侧支开口,保留覆膜支架^[4-6,12]。虽然有效,但手术复杂度高,风险也相对较大。综上,对于瘤囊分支动脉较为明确的患者,经皮动脉栓塞可能是首选;而对于常规通路受限的患者,则可能需要考虑经腰部入路穿刺栓塞。对于复杂或难治性 II 型内漏,可能适合开放手术。

2.3 III 型内漏 确保支架组件之间的充分连接是预防 III 型内漏的关键。研究显示,多支架使用时需匹配

直径,并保证至少 3 cm 重叠^[39]。若连接处重叠不足,可考虑额外植入覆膜支架延长重叠部分。如连接处角度过大致使支架展开不全,可进行球囊扩张,但需谨慎避免过度张力引发支架移位^[39-40]。随着技术进步和设备改进,此类内漏发生率逐步降低。Ⅲ型内漏可能引起瘤腔压力和体积快速增加,需及时干预。常用干预方法为在脱节处植入新的覆膜支架将其覆盖^[11]。少数因支架部分破损引起的情况,可考虑重置分叉型覆膜支架或单臂支架型血管,并行股一股搭桥^[11]。在腔内治疗失败、存在持续性的动脉瘤扩张时,应考虑开放手术修复^[11]。总体而言,预防Ⅲ型内漏的关键在于选择合适的支架来确保支架组件之间的充分连接。而治疗Ⅲ型内漏难易程度通常与内漏的位置、大小、瘤体的解剖结构以及患者的整体健康状况有关。血管内治疗通常较为微创,但可能需要多次尝试或长期管理;开放手术则更为复杂,恢复时间更长,但可能提供更持久的解决方案。目前临床实践中还缺少相关的风险评估工具作为决策依据。

2.4 IV型内漏 IV型内漏多数情况下能够自行缓解,通常不需特殊干预或仅采取保守疗法。不过其早期发生可能妨碍瘤囊缩小并影响疾病进展,需引起重视。腔内植入物的覆膜材质是影响这类内漏的主要因素^[41]。研究发现,采用聚四氟乙烯材质的支架(例如早期 Excluder 型号)更易引发Ⅳ型内漏,从而阻碍瘤囊收缩过程^[41-42]。然而,在 Excluder 支架内部增设低渗透性膜层后,此类内漏的发生率明显降低^[42]。由于大部分Ⅳ型内漏通常可以自行消退,并且与腹主动脉搏膜的破裂没有直接联系。同时,随着支架设计和材料技术的不断进步,新型覆膜支架在治疗中很少出现Ⅳ型内漏的情况。因此对于Ⅳ型内漏,目前的临床实践标准^[11]中建议不采取干预措施。

2.5 V型内漏 V型内漏的形成机制仍不明确,可能涉及支架材料、动脉瘤囊壁的压力传递等因素。目前没有确切的预防策略。在治疗方面,当前的临床实践倾向于根据患者的具体情况来定制治疗方案,包括但不限于观察、使用低孔隙率的覆膜支架进行内衬,或者在必要时采取开放手术^[11,43]。在其他治疗失败或瘤腔继续扩张的情况下,采用开放手术修补可能是有效治疗途径,包括瘤腔折叠术和覆膜支架的移除^[11,44]。对于Ⅴ型内漏,如果排除了其他类型的内漏,可以采取非手术管理方式,但是需要定期进行影像学检查以监测内漏的变化情况,以防止可能出现的并发症^[11]。

3 小结与展望

本研究综述了主动脉瘤腔内修复术后内漏的分类、发病机制、预防策略与治疗方法。内漏是 EVAR 术后需要密切关注的并发症,其类型包括Ⅰ型、Ⅱ型、

Ⅲ型、Ⅳ型和Ⅴ型,每种类型都有其特定的预防和治疗策略。Ⅰ型内漏需要关注近端和远端的密封,而Ⅱ型内漏的治疗可能需要栓塞分支动脉,Ⅲ型内漏强调支架组件间的充分连接,Ⅳ型内漏通常观察等待,Ⅴ型内漏则需要个体化的治疗方案。在临床实践中,对内漏的早期识别和正确分类对于规划最佳管理策略至关重要。EVAR 术后内漏的预防需要从术前评估、术中技术和术后管理等多个环节入手,个体化制定预防策略。此外,通过定期的影像学监测,可以及时发现内漏并评估其对患者预后的影响,从而采取适当的治疗措施,以降低主动脉搏破裂的风险并改善患者的长期生存率。

未来的研究将集中在开发更有效的内漏预防和治疗技术,以及对新材料和技术的长期效果进行评估。个体化治疗策略和精准医疗的进一步发展,有望为 EVAR 术后内漏的管理提供更加有效和安全的方法,从而进一步提高患者的生活质量和生存率。同时,对现有治疗方法的改进和创新也将继续是研究的重点。

参考文献:

- [1] STOECKER J B, WANG G J. Epidemiology of thoracoabdominal aortic aneurysms[J]. *Semin Vasc Surg*, 2021, 34(1):18-28.
- [2] HOU X R, ZHANG F, YE Z, et al. The burden of aortic aneurysm in China from 1990 to 2019: findings from the global burden of disease study 2019 [J]. *BMC Public Health*, 2022, 18, 22(1):782.
- [3] BOSSONE E, EAGLE K A. Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(5):331-348.
- [4] 毛乐,董智慧,符伟国,等.胸降主动脉瘤诊断和治疗中国专家共识(2024 版)[J]. *中华血管外科杂志*, 2024, 9(1):8-15.
- [5] 中华医学会外科学分会血管外科学组,郭伟,陈忠,等.腹主动脉瘤诊断和治疗中国专家共识(2022 版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(4):380-387.
- [6] UPCHURCH GR JR, ESCOBAR GA, AZIZZADEH A, et al. Society for vascular surgery clinical practice guidelines of thoracic endovascular aortic repair for descending thoracic aortic aneurysms[J]. *J Vasc Surg*, 2021, 73(1S):55S-83S.
- [7] DUBOIS L, HARLOCK J, GILL H L, et al. A Canadian multicenter experience describing outcomes after endovascular abdominal aortic aneurysm repair stent graft explanation[J]. *J Vasc Surg*, 2021, 74(3):720-728, e1.
- [8] LAL B K, ZHOU W, LI Z Y, et al. Predictors and outcomes of endoleaks in the veterans affairs open versus endovascular repair (OVER) trial of abdominal aortic aneurysms[J]. *J Vasc Surg*, 2015, 62(6):1394-1404.
- [9] 韦金豆,杨晗,胡明,等.腹主动脉瘤腔内修复术后内漏研

- 究现状[J]. 中华血管外科杂志, 2023, 8(1): 64-68.
- [10] YANAMALADODDI V R, SARVEPALLI S S, VEMULASL, et al. The challenge of endoleaks in endovascular aneurysm repair (EVAR): a review of their types and management[J]. Cureus, 2023, 15(5): e39775.
- [11] CHUN J Y, DE HAAN M, MALEUX G, et al. CIRSE standards of practice on management of endoleaks following endovascular aneurysm repair[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2024, 47(2): 161-176.
- [12] 张小鹏, 张安平, 宋润泽, 等. 腹主动脉瘤腔内修复术后Ⅱ型内漏的诊疗进展[J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(2): 216-218.
- [13] FLOHR TR, SNOW R, AZIZ F. The fate of endoleaks after endovascular aneurysm repair and the impact of oral anticoagulation on their persistence[J]. J Vasc Surg, 2021, 74(4): 1183-1192, e5.
- [14] 朱广昌, 汪忠镐, 汪秀杰, 等. 腹主动脉瘤腔内修复术并发内张力发病机制及处理策略[J]. 中国实用外科杂志, 2013, 33(12): 1065-1067.
- [15] PARSA P, DAS G J, MCNALLY M, et al. Endotension: what do we know and not know about this enigmatic complication of endovascular aneurysm repair[J]. J Vasc Surg, 2021, 74(2): 639-645.
- [16] 凡杰夫, 陆清声. 腹主动脉瘤腔内修复术内漏预防措施的研究进展[J]. 中国血管外科杂志(电子版), 2024, 16(2): 194-199.
- [17] MILLEN AM, OSMAN K, ANTONIOU GA, et al. Outcomes of persistent intraoperative type Ia endoleak after standard endovascular aneurysm repair[J]. J Vasc Surg, 2015, 61(5): 1185-1191.
- [18] O'DONNELL T, COREY M R, DEERY S E, et al. Select early type IA endoleaks after endovascular aneurysm repair will resolve without secondary intervention[J]. J Vasc Surg, 2018, 67(1): 119-125.
- [19] ABDULRASAK M, RESCH T, SONESSON B, et al. The long-term durability of intra-operatively placed palmaz stents for the treatment of type Ia endoleaks after EVAR of abdominal aortic aneurysm[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2017, 53(1): 69-76.
- [20] GOTTARDI R, WYSS TR, VAN DEN BERG JC, et al. Current trends in reduction or elimination of the aortic impulse during stent-graft deployment and balloon moulding during thoracic endovascular aortic repair [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2021, 60(6): 1466-1474.
- [21] BORDET M, OLINY A, MIASUMU T, et al. EndoSuture aneurysm repair versus fenestrated aneurysm repair in patients with short neck abdominal aortic aneurysm [J]. J Vasc Surg, 2023, 77(1): 28-36, e3.
- [22] 罗明尧, 舒畅, 方坤, 等. CUFF 预开窗技术治疗胸主动脉腔内修复术后近端内漏[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, 27(1): 106-109.
- [23] ZHANG L, ZHAO W, WU M T, et al. Long-term outcome of sac filling with fibrin sealant after endovascular aneurysm repair of abdominal aortic aneurysm with challenging aortic neck anatomy[J]. J Vasc Surg, 2019, 70(2): 471-477.
- [24] ARKO FR 3RD, STANLEY GA, PEARCE BJ, et al. Endosuture aneurysm repair in patients treated with Endurant II/IIIs in conjunction with Heli-FX endoanchor implants for short-neck abdominal aortic aneurysm [J]. J Vasc Surg, 2019, 70(3): 732-740.
- [25] REYES V A, OIKONOMOU K, MILNER R, et al. The effect of endoanchors on aneurysm sac regression for patients treated with infrarenal endovascular repair with hostile neck anatomies: a propensity scored analysis[J]. J Endovasc Ther, 2024, 31(3): 438-449.
- [26] PATEL S, PAVLIDIS V, AMELI-RENANI S, et al. Long-term outcomes following transarterial embolisation of proximal type I endoleaks post-EVAR[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2023, 46(4): 428-435.
- [27] KARAOLANIS G, ANTONOPOULOS C N, KOUTSIAS S, et al. Outcomes of endosutured aneurysm repair with the Heli-FX endoanchor implants [J]. Vascular, 2020, 28(5): 568-576.
- [28] QAMHAWI Z, BARGE TF, MAKRIS G C, et al. Editor's choice-systematic review of the Use of endoanchors in endovascular aortic aneurysm repair[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2020, 59(5): 748-756.
- [29] TANG E W C, LAU A C K, CHENG J C H, et al. Effectiveness and safety of endoanchors in abdominal and thoracic endovascular aneurysm repair: a systematic review and meta-analysis[J]. J Endovasc Ther, 2024, 1526602824145911.
- [30] BAHROLOOMI D, QATO K, NGUYEN N, et al. External iliac artery extension causes greater aneurysm sac regression than the bell-bottom technique or iliac branch endoprosthesis for repair of concomitant infrarenal aortic and iliac artery aneurysm[J]. J Vasc Surg, 2022, 76(1): 132-140.
- [31] MESNARD T, PATTERSON B O, AZZAOU R, et al. Iliac branch device to treat type Ib endoleak with a brachial access or an "up-and-over" transfemoral technique [J]. J Vasc Surg, 2022, 76(6): 1537-1547.
- [32] WANG J R, WANG T H, ZHAO J C, et al. Effect of limb oversizing on the risk of type Ib endoleak in patients after endovascular aortic repair[J]. J Vasc Surg, 2021, 74(4): 1214-1221, e1.
- [33] PITOULIAS G A, PITOULIAS A G, CHATZELAS D A, et al. Early results of elective endovascular repair of infrarenal abdominal aortic aneurysms with the minosTM stent-graft system[J]. J Endovasc Ther, 2023, 32(1): 225-332.

[34] ROUBY A F, KUNTZ S, DELAY C, et al. Volume change after endovascular treatment of common iliac arteries ≥ 17 mm diameter: assessment of type 1b endoleak risk factors[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2020,59(1):51-58.

[35] 陈永辉. 纤维蛋白胶瘤腔填充预防腹主动脉瘤腔内修复术后Ⅱ型内漏的前瞻性随机对照研究[D]. 天津:天津医科大学,2021.

[36] 王琛,桑宏飞. 腹主动脉瘤腔内修复术后Ⅱ型内漏的防治进展[J]. 中国临床保健杂志,2024,27(3):304-308.

[37] 王铁皓,王家嵘,赵纪春,等. 腹主动脉瘤腔内修复术中弹簧圈联合纤维蛋白胶瘤腔填充技术预防术后Ⅱ型内漏[J]. 中国普外基础与临床杂志,2022,29(12):1562-1567.

[38] 张原. EVAR 中瘤腔内填充 NBCA 治疗腹主动脉瘤的临床研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2023.

[39] 谷涌泉,郭建明. 腹主动脉瘤腔内修复术后并发症预防与处理[J]. 中国普外基础与临床杂志,2019,26(1):1-3.

[40] ZOETHOUT A C, KETTING S, ZEEBREGTS C J, et al. An international, multicenter retrospective observational study to assess technical success and clinical out-

comes of patients treated with an endovascular aneurysm sealing device for type Ⅲ endoleak[J]. J Endovasc Ther, 2022,29(1):57-65.

[41] HYNES N, ACHARYA Y, SULTAN S. The contemporary design of endovascular aneurysm stent-graft materials: PTFE versus polyester[J]. Front Surg, 2022, 9: 984727.

[42] TORRES-BLANCO A, MIRALLES-HERNANDEZ M. Endotension: twenty years of a controversial term[J]. CVIR Endovasc, 2021,4(1):46.

[43] WANHAINEN A, VERZINI F, VAN HERZEELE I, et al. Editor's choice-european society for vascular surgery (esvs) 2019 clinical practice guidelines on the management of abdominal aorto-iliac artery aneurysms[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2019,57(1):88-93.

[44] PARSA P, DAS G J, MCNALLY M, et al. Endotension: What do we know and not know about this enigmatic complication of endovascular aneurysm repair[J]. J Vasc Surg, 2021,74(2):639-645.

收稿日期:2024-11-01;修回日期:2025-01-02

(本文编辑 钟琳)

(上接第 345 页)

[34] 李弘,颜丽萍,梁勇,等. 幽门螺杆菌感染动物模型最新进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(16):79-81.

[35] TAILLIEU E, CHIERS K, AMORIM I, et al. Gastric *Helicobacter* species associated with dogs, cats and pigs: significance for public and animal health[J]. Vet Res, 2022,53(1):42.

[36] 赵连梅,魏思思,武一鹏,等. 含幽门螺杆菌特异性抗体牛奶清除幽门螺杆菌效果的临床随机试验[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(2):274-277.

[37] KUBOTA-AIZAWA S, MATSUBARA Y, KANEMOTO H, et al. Transmission of *Helicobacter pylori* between a human and two dogs: a case report[J]. Helicobacter, 2021,26(3):e12798.

[38] SMET A, FLAHOUB, D'HERDE K, et al. *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012,62(Pt 2):299-306.

[39] NEGRINI R, VILLANACCI V, POIESI C, et al. Anti-glycan autoantibodies induced by *Helicobacter pylori* as a potential risk factor for myocardial infarction[J]. Front Immunol, 2020,11:597.

[40] ALTMAN E, CHANDAN V, HARRISON B A, et al. Chemoenzymatic synthesis of an α -1, 6-glucan-based conjugate vaccine against *Helicobacter pylori* [J]. Glycobiology, 2022,32(8):691-700.

收稿日期:2024-08-20;修回日期:2024-10-10

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:周子阳,孙纲. 大肠癌筛查策略及手术方式的选择[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):357-361.

【医学综述】

大肠癌筛查策略及手术方式的选择

周子阳¹,孙纲²

- (1. 锦州医科大学研究生培养基地,中国人民解放军联勤保障部队第九六七医院,辽宁 大连 116000;
2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六七医院综合外一科,辽宁 大连 116000)

摘要: 大肠癌又称结直肠癌(colorectal cancer,CRC),具有生长缓慢、潜伏期长、发病机制不明等特点。家族史、炎症性肠病、腺瘤性息肉、高脂及低纤维饮食等是 CRC 的高危因素,其预后与早期发现以及外科干预相关,因此对高危人群的筛查和选择合适术式就变得尤为重要。常用的筛查策略有基于粪便筛查的高灵敏度愈创木脂法粪便潜血试验(HSg-FOBT)、粪便免疫化学试验(FIT)、多靶点粪便 DNA(mt-sDNA)和基于内镜可视化筛查的 CT 结肠造影、软式乙状结肠镜、结肠镜、结肠胶囊内镜(CCE)等。传统开腹、腹腔镜、单孔腹腔镜及手术机器人的应用也使患者有更多个性化选择。通过及时的早期筛查和外科干预,可以在很大程度上降低 CRC 的发病率和死亡率,从而推动 CRC 的精确诊疗。

关键词: 大肠癌;结直肠肿瘤;筛查;手术

中图分类号: R735.34

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0357-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.027

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)目前在全球范围内的发病率已经居恶性肿瘤的第 3 位,死亡率居第 2 位。尽管近年来在诊断和治疗方面取得了一定的进展,但 CRC 仍是人类健康的一大威胁,尤其是在一些发达国家,其造成的病情负担和经济花费极为沉重。在临床诊治中发现,及早的筛查和干预可使 CRC 的发病率和死亡率显著降低,这凸显了科学有效的筛查策略的重要性。目前,CRC 的筛查主要分为非侵入性粪便检测和可视化内镜两大类。非侵入性粪便检测如高敏愈创木脂粪便潜血试验(HSgFOBT)、粪便免疫化学试验(FIT)、多靶点粪便 DNA(mt-sDNA)等。因其简便、成本低,主要适用于大规模筛查。而可视化检查如 CT 结肠造影和各类肠镜可在直视下观察病变并进行活检,但其也因侵入性和医疗资源而限制了普及率。近年来,一些新兴技术如液体活检和结肠胶囊内镜(CCE)也为临床提供了更多选择,但其实用性和成本及准确性还需进一步优化。在治疗方面,手术仍然是 CRC 治疗的第一选择。目前随着微创技术的应用,传统开腹手术已逐渐被腹腔镜技术所取代,凭借其创伤小、恢复快的优势已成为临床第一选择。同时,单孔腹腔镜技术(SILS)和机器人手术系统也在快速推动外科的发展,但其技术难度、学习曲线及维护成本仍是普

及的最大难题。因此,如何根据患者实际情况选择合适术式也成为了临床医生面临的重要课题。本文旨在系统性综述 CRC 筛查策略及各手术方式最新进展,分析各方法优缺点及适用人群,为临床提供实践性依据。通过优化筛查流程和手术选择,有望提高 CRC 的早期诊断率,改善患者预后,降低疾病负担和经济负担。

1 概述

1.1 CRC 的发病机制 目前 CRC 的发病因素及机制仍不完全清楚。目前认为,CRC 的发生涉及多种病理生理机制,如异常细胞增殖、细胞分化、抗细胞凋亡、侵袭结直肠肿瘤细胞附近结构和远处转移等^[1]。在分子生物学层面,癌基因、抑癌基因和 DNA 碱基错配修复基因的突变都可能参与 CRC 的演变过程。相关病因学研究显示,许多种系基因突变例如 APC、MLH1 等也使 CRC 的患病率有所增加。基因改变导致信号通路失调,引起耐药性,抑制细胞凋亡,诱导增殖、侵袭和迁移也可导致 CRC 发病与转移^[2]。另外还有研究指出,人体肠道中自然存在的微生物菌群也对其发病有一定的促进作用,虽然口腔离结肠的解剖区域较远,但是口腔内的细菌如具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌仍然能够扩散到结肠,这些细菌可以在复杂的生物背景下改变残留微生物群的组成,导致肠道菌群失调。这

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2019-ZD-1077)

第一作者: 周子阳,在读硕士研究生,研究方向:胃肠道肿瘤研究,E-mail:1679292999@qq.com

通讯作者: 孙纲,医学博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:消化道肿瘤多药耐药的相关研究,E-mail:neomoon@yeah.net

种口腔驱动的破坏促进了异常的免疫和炎症反应,最终导致 CRC 发生^[3]。目前有研究显示,肠道菌群可能是通过调节信号通路、参与免疫反应及细胞增殖等方面介导发病过程^[4]。

2 临床表现及分型

2.1 临床表现 CRC 起病较为隐匿,早期阶段多表现为排便习惯及性状异常,随后可出现间断性腹痛、肿块、肠梗阻及不明原因的消瘦,极少数患者会出现急腹症情况。晚期阶段出现远处淋巴结转移和严重的全身消耗症状甚至恶病质。在早期时患者并不会认为症状严重,而是将其归因于衰老、生活方式改变,精神心理因素或其他合并症,从而错过了最佳治疗期^[5]。

2.2 分型 世界卫生组织(WHO)胃肠道病理分类列出了大量结直肠癌的组织学亚型,例如经典腺癌(AC)、黏液腺癌(MAC)、印戒细胞癌(SRCC)和其他罕见的结直肠癌变异,包括鳞状细胞癌、神经内分泌癌、腺鳞状癌、梭形细胞癌和未分化癌^[6]。

3 筛查与诊断

越来越多的研究表明,通过科学有效的循证筛查策略可以在很大程度上预防并降低 CRC 的发病率和死亡率^[7]。依据美国预防服务工作组(US Preventive Services Task Force, USPSTF)在 2021 年 5 月更新的指南,建议将筛查目标人群分为 B 级推荐(45~49 岁)和 A 级推荐(50~75 岁)。目前推荐的几种筛查策略:①基于粪便的结直肠癌检测。②可视化筛查方式包括计算机断层扫描(CT)结肠造影、软式乙状结肠镜检查 and 传统结肠镜检查。目前还有软式乙状结肠镜检查和 FIT 结合,结合粪便检测和直接可视化。③近几年新兴的结肠胶囊内窥镜检查,基于血液的结肠癌筛查,基于肠道微生物的筛查等^[8]。

3.1 基于粪便的结直肠癌检测

3.1.1 高灵敏度愈创木脂法粪便潜血试验(HSg-FOBT) 基于粪便的筛查方式,通过在息肉或癌症中检测出氧化反应。当采集的粪便标本中含有血红素时,过氧化氢试剂会氧化检测卡中的 α -愈创木酸而呈现蓝色,代表该样本阳性(异常)。该方式需要被筛查者每年采集 3 个连续的粪便标本,任何一个出现阳性结果都需要行肠镜检查来进一步确认潜血原因^[9]。这种无创筛查方式应用广泛、价格低廉,可应用于临床或临床环境之外。在测试前两天内需要限制一些食物和药物,以免其影响检测结果,并且该方法不适用于存在消化道出血的患者。

3.1.2 粪便免疫化学试验(FIT) FIT 也是一种基于粪便的筛查方式,与 HSgFOBT 不同点在于使用抗体检测的形式来测定粪便中是否存在人血红蛋白的珠蛋白部分。特异性和灵敏度较高,FIT 每年只需要采

集 1 个粪便标本,不受饮食习惯或药物的影响。该方法也适用于存在上消化道出血的患者,因为上消化道出血的血红蛋白在到达结肠之前会被部分消化,不会出现阳性结果^[10]。2021 年 USPSTF 指南建议至少 1 年进行 1 次 FIT 以便筛查潜在的 CRC,出现阳性的个体需要进一步行肠镜检查确定原因^[11]。在某些情况下,FIT 阳性后肠镜检查率低于 30%。另一方面,在 FIT 筛查中,使用低临界值(如 10 μg Hb/g 粪便)可显著提高敏感性和阳性预测值,但会相应地降低该特异性,这就需要大量的结肠镜随访检查,而在检查过程中则会相应地增加了不良事件的发生率。

3.1.3 多靶点粪便 DNA(mt-sDNA)检测 mt-sDNA 也是一种基于粪便的 CRC 筛查方法,该方法可扩增甲基化的分子生物标志物(例如突变 KRAS、甲基化 BMP3、甲基化 NDRG4 等),也可以检测血红蛋白^[12]。通过从 11 种分子生物标志物定量计算得出的复合逻辑来确定异常结果。mt-sDNA 采集粪便的跨度可以更长,可以每 3 年采集一次并可在临床环境之外进行,无食物及药物限制,由于是非侵入性检查,在检测过程中发生不良反应的可能性较低。mt-sDNA 对左侧和右侧 CRC 以及高危腺瘤的敏感性和特异性较高。与其他非侵入性粪便血液检测相比,由于 BMP3 是 mt-sDNA 检测的一个组成部分,所以在检测无蒂锯齿状息肉(SSP)方面具有更高的灵敏度^[13]。该筛查方法提供了专门的工作人员通过电子或实时指导被检测者完成筛查并提高检测完成率^[14]。同样 mt-sDNA 筛查成本较高,可能会出现结果呈现阳性但结肠镜检查为阴性等现象。

3.2 可视化筛查方式

3.2.1 计算机断层扫描结肠造影(CT 结肠造影) 通过使用 CT 扫描仪和计算机重建的方式来检查结肠和直肠内的息肉及其他异常病变,属于直接可视化筛查^[15]。与结肠镜相比,CT 结肠造影属于非侵入性检查,性价比高,过程中不需要镇静,没有肠穿孔和肠道出血的风险,对基础状态差的老年患者较为友好^[16]。CT 结肠造影在观察病灶侵袭程度、有无淋巴结转移和远处器官转移等方面具有显著优势^[17]。尽管计算机断层扫描对于结直肠肿块有较高的敏感性,但 CT 结肠造影因在器官外成像,当有异常结果时,同样需要进行额外的内窥镜检查及活检^[18]。

3.2.2 软式乙状结肠镜检查 该方式可在内镜下直视直肠、乙状结肠和降结肠,并对远端的结直肠息肉和病变进行切除或活检。与结肠镜相比,软式乙状结肠镜对镇静要求较低、成本低、并发症发生率低,在一些初级卫生保健机构即可施行^[19]。在我国,由于软式乙状结肠镜只能观察到远端结直肠(尽管可使远端结直

肠癌发病率降低 52%),但因无法探查及整段结肠,近端结直肠癌的发病率并未降低,所以对软式乙状结肠镜的使用产生了一定的局限性。

3.2.3 结肠镜检查 目前应用最为广泛的检查方式,其本身是一种侵入性、对医疗资源有一定要求的手术。通常在进行结肠镜检查之前,被检者大都已经使用过非侵入性筛查方式或有一定程度的肠道异常表现。患者使用结肠镜检查的目的不仅仅是确定肠道异物的性质,还可对于一些孤立的、较小的、有不良倾向的息肉或者其他异物进行内镜下摘除。结肠镜检查分为两种:普通型和无痛型,术前 1 d 开始进行肠道清洁,减少肠腔内粪便对于操作者视野的影响。无痛型结肠镜检查前,麻醉医生需要对患者的基本状态进行评估,根据评估结果来确定其是否耐受。相关回顾性研究证明,软式乙状结肠镜检查使 CRC 的死亡率降低了 35%,而结肠镜检查可使 CRC 的死亡率降低 74%^[20],尤其是在近端结肠检查与死亡率的降低幅度更大有关^[21]。尽管结肠镜好处多,但是对于患者来说也是一种侵入性手术,少数患者也会因为会有出血、穿孔、麻醉意外或其他不良反应而对结肠镜检查或者检查结果产生焦虑甚至恐惧^[22]。这就需要医务人员在检查前与患者进行充分的沟通,使患者充分理解结肠镜检查的重要和必要性,缓解对该操作的焦虑心理^[23]。

3.2.4 结肠胶囊内镜检查(CCE) CCE 是新兴的一种检查方式,它是一粒胶囊大小的无线微型摄像头,患者将该摄像头吞下拍摄几千张胃肠道的图像^[24]。该方式不需要镇静剂、充气或者放疗,在非临床环境中也可以很好的使用^[25]。最新的 CCE 二代内窥镜对 >6 mm 的肿瘤敏感度高达 100%,对于 10 mm 及更大的肿瘤也有较高的敏感性及特异性,对于结肠异物的敏感性主要取决于结肠表面的百分比和胶囊在肠道内的排泄时间。相对于传统结肠镜,其发生不良反应的风险更低,但目前完全依赖 CCE 的检查率较低,仅占 66.7%,如果 CCE 发现结直肠病变时,往往需要再行结肠镜进行确诊性检查,使得检查成本升高,病人接受度降低^[26]。对于 CCE 图像的解读也需要经过专业培训的医生,等待时间也比结肠镜的时间更长。综上所述使得 CCE 的实用性受到了一定的限制^[27]。

3.3 新兴筛查方式 目前还有几种新兴的筛查方式待测试,例如基于血液的筛查方式(液体活检)、基于粪便微生物筛查方式以及基于尿液的筛查方式等。这些方式都属于非侵入性、可在非临床环境中采集样本的方式,但如果显示出异常结果时也都需要结肠镜进行确诊性检查,且目前这些检测的准确性并没有可靠的数据支撑,操作时间较长和费用也比较昂贵,所以目前

这些筛查方式的应用受到较多限制。

4 手术方式的选择

目前在临床诊疗中对于 CRC 的治疗方法仍然是以外科手术切除为主导。CRC 手术方式较多,既有起始最早并且较为成熟的开腹手术,也有目前较为流行的微创腹腔镜手术,还有近几年新兴起的单孔腹腔镜技术(SILS)及达芬奇手术机器人等。影响患者手术方式选择的因素较多,既有患者性别、年龄、机体耐受程度、经济状况等客观因素,也有地区差异、医师经验、操作难易程度等。

4.1 传统开腹手术 传统开腹手术是最早应用于 CRC 的手术方式,其基本方法是通过腹部开放性切口逐层进入腹腔,在直视下观察病变肠管的结构及浸润情况。通常需要在术前 3 d,患者开始使用复方聚乙二醇电解质粉作为肠道清洁制剂,目的是清洁肠道,减少感染风险和准确确定肿瘤浸润情况。术前需要禁食水,排空膀胱,必要时服用预防性抗生素。将患者置于仰卧位或膀胱截石位,全身麻醉和气管插管。制作 3~15 cm 的腹部切口并按层隔开。根据术中探查情况,来确定手术方法。手术过程中切除大肿瘤和浸润组织,并行淋巴结清扫及消化道重建,最后清洗腹腔并检查无出血,放置引流管并关闭切口。传统开腹手术操作较为简单,视野较好,对肿瘤切除及淋巴结清扫较为彻底,经济负担轻,但是切口较大,术中出血较多,疼痛较重,炎症反应发生率高,住院时间长,患者通常需要较长的恢复时间,且在术前评估时对患者的基础状态有所要求。目前在临床中对一些肿瘤引起严重相关并发症的患者使用该术式,例如癌肿破裂、大出血、急性肠梗阻或不明原因的急腹症需剖腹探查等,另有一些特殊患者因经济原因选择该术式。除上述情况外,现已较少应用。

4.2 微创腹腔镜手术 近年来流行的腹腔镜技术已经逐渐代替传统开腹手术成为 CRC 的主要治疗措施。其基本方式是前期行必要的术前肠道准备,术时患者仰卧,双腿分开或处于低截石位置,通过在脐周围开一个 1~2 cm 的切口当作观察孔以便微型镜头进入,在左下腹部,形成一个 1~2 cm 长的切口建立 CO₂ 气腹,压力一般控制在 1.60~1.86 kPa,再在相对应的部位做一个切口当作操作口。腹腔镜手术多采用五端口法将相关器械放入腹腔。根据腹腔镜探查来确定手术类型,例如结肠癌 D3 腹腔镜完全直肠系膜切除术和直肠癌 D3 腹腔镜全直肠系膜切除术等。腹腔镜游离癌组织和淋巴结清扫后,在腹部做一个小切口(6~8 cm),以帮助完成结直肠癌病变的切除。除乙状结肠外患有结肠癌的肠道在小切口外重建消化道后,将肠管放回腹腔,重建气腹,清洁和检查腹腔未发现出血,

保留引流管后关闭切口。在乙状结肠癌或直肠癌病例中则切除 6~8 cm 长的结直肠癌病变后,重建气腹,在腹腔镜检查的帮助下,在腹腔内完成了吻合。腹腔镜手术切口较小,术中出血量少、疼痛轻,术后炎症反应较轻,患者住院时间短,接受性好,但腹腔镜手术由于视野有限,对淋巴组织清扫、肿瘤肠端切除及重要血管处理等方面效果相对于开腹稍差,且在术中有中转开腹的可能^[28]。该术式对患者的年龄和基础状态要求较低,可应用于大多数择期手术的 CRC 患者,已经成为 CRC 治疗的首选术式。

4.3 SILS SILS 在最近几年的应用逐渐增多,不同于传统腹腔镜手术的基本“三角测量”思想,该操作的基本方法是通过腹部的单一切口进行整个手术过程。在早期,由于 SILS 的操作技能较为复杂,且存在技术及人体工程学障碍,例如三角测量的缺乏,摄像头与仪器之间的冲突、视野受限及操作范围的缩小导致解剖和处理不够充分等,使得 SILS 的手术时间较传统腹腔镜手术更长。目前,市场上出现了适合 SILS 使用的弯曲式仪器、配套的 SILS 端口、牵开器以及量身定做的仪器及相机都完美的解决了 SILS 应用的局限性^[29]。研究表明,SILS 比传统腹腔镜手术有着相同的安全性和可行性,而在术中出血、术后胃肠功能恢复、住院时间和切口长度等方面,SILS 要明显优于传统腹腔镜手术。该术式适用于心肺功能较差、年老体弱和对伤口美观有一定要求的患者。在术者的角度来看,对 SILS 的技术要求要明显高于传统腔镜,据国外报道,SILS 的学习曲线在 30~60 例之间才能成为一名技术娴熟的 SILS 操作者^[30]。

4.4 机器人手术 随着腹腔镜手术在临床上的大量应用,其越来越多的局限性逐渐暴露出来,例如手术视野是二维的(2D),扶镜手摄像头的不稳定,个别操作违反人体工程学,直而尖锐的器械和震颤等。在此基础上,机器人手术系统被设计出来克服这些限制。典型的代表为达芬奇系统(Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA, USA)^[31]。该手术系统采用了稳定的 3D 摄像头视野,克服了手部的生理性震颤及拥有合适的人体工程学,外科医生可通过 7 个自由度的成角器械在骨盆等狭窄空间里进行手术操作。机器人系统的应用也有较多局限性,包括操作者无触觉反馈、系统对接时间较长等,但其主要的局限是设备、耗材、维护的成本昂贵。相对于传统腹腔镜手术,目前尚未有确切研究证实机器人系统在治疗大肠癌结局上优于前者,反而可使手术的时间更长,因此该术式目前国内应用较少,目前只有少数头部医院配备并使用。总之,机器人手术目前尚未发挥真正的潜力。

5 总结与展望

CRC 的发病机制十分复杂,近二十年来,虽然对 CRC 的诊疗在不断更新,但临床上每种 CRC 的筛查方式都有其独特性和局限性,现在主要推荐的还是以非侵入性为主的粪便筛查,这种简单、成本低、敏感性高的方式更适合对高风险人群的大范围筛查,目前也有基于血液、粪便微生物及尿液的筛查方式在测试阶段中。结肠镜的积极应用及影像和内镜相结合的方式也对 CRC 的筛查和评估提供了新的途径和方法。各种改进手术方式的出现也产生了新的外科理念,能在完整切除肿瘤及相关组织的同时使损伤更小、更加美观已经成为了外科医师的首要目标。探讨 CRC 的筛查策略及不同术式可以帮助外科医师及时确定早期患者并根据特点选择合理的手术方式,结合科学的辅助性治疗方案,对 CRC 患者的治疗和改善预后具有重要的意义。

参考文献:

- [1] IONESCU V A, GHEORGHE G, BACALBASA N, et al. Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis [J]. Medicina(kaunas), 2023, 59(9): 1646.
- [2] AHMAD R, SINGH J, WUNNAVA A, et al. Emerging trends in colorectal cancer: dysregulated signaling pathways(review)[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 14.
- [3] WANG Z K, DAN W Y, ZHANG N N, et al. Colorectal cancer and gut microbiota studies in China[J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2236364.
- [4] CLAY S L, FONSECA-PEREIRA D, GARRETT W S. Colorectal cancer: the facts in the case of the microbiota [J]. J Clin Invest, 2022, 132(4): e155101.
- [5] GEORGE S. Being sick to a cancer patient: pathways of delay in help seeking and diagnosis of cancer in India[J]. J Soc Econ Dev, 2023, 25(1): 52-69.
- [6] SHI W Z, CHEN J F, YAO N, et al. The prognostic ability of radiotherapy of different colorectal cancer histological subtypes and tumor sites[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 11758.
- [7] KNUDSEN A B, RUTTER C M, PETERSE E F P, et al. Colorectal cancer screening: an updated modeling study for the US preventive services task force[J]. JAMA, 2021, 325(19): 1998-2011.
- [8] JAIN S, MAQUE J, GALOOSIAN A, et al. Optimal strategies for colorectal cancer screening[J]. Curr Treat Options Oncol, 2022, 23(4): 474-493.
- [9] SHAUKAT A, LEVIN T R. Current and future colorectal cancer screening strategies [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(8): 521-531.
- [10] GUPTA S. Screening for colorectal cancer[J]. Hematol Clin N Am, 2022, 36(3): 393-414.

[11] US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, DAVIDSON K W, BARRY M J, et al. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement[J]. JAMA, 2021, 325(19): 1965-1977.

[12] CLEBAK K T, NICKOLICH S, MENDEZ-MILLER M. Multitarget stool DNA testing (cologuard) for colorectal cancer screening[J]. Am Fam Physician, 2022, 105(2): 198-200.

[13] MÜELLER D, GYÖRFFY B. DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer[J]. Biochim Biophys Acta-Rev Cancer, 2022, 1877(3): 188722.

[14] CHINI A, MANIGRASSO M, CANTORE G, et al. Can computed tomography colonography replace optical colonoscopy in detecting colorectal lesions?: state of the art[J]. Clin Endosc, 2022, 55(2): 183-190.

[15] LEE S Z, SCHUBERT J P, PROWSE S J B, et al. Are we underutilising computer tomography colonography in Australia? [J]. Intern Med J, 2022, 52(5): 864-867.

[16] KADARI M, SUBHAN M, PAREL N S, et al. CT colonography and colorectal carcinoma: current trends and emerging developments[J]. Cureus, 2022, 14(5): e24916.

[17] MANG T, LAMPICHLER K, SCHARITZER M. CT colonography: technique and indications[J]. Radiologie (Heidelb), 2023, 63(6): 418-428.

[18] ZHANG C R, LIU L L, LI J J, et al. Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on colorectal cancer incidence and mortality: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2023, 23(11): 1217-1227.

[19] JUUL F E, CROSS A J, SCHOEN R E, et al. Effectiveness of colonoscopy screening vs sigmoidoscopy screening in colorectal cancer[J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(2): e240007.

[20] CARDOSO R, ZHU A N, GUO F, et al. Incidence and mortality of proximal and distal colorectal cancer in Germany: trends in the era of screening colonoscopy[J]. Dtsch Arztebl Int, 2021, 118(16): 281.

[21] GRAHAM H, KAUFFMAN R, KHALIQ W. Colorectal cancer screening prevalence, perceived barriers, and preference for screening colonoscopy among hospitalized women[J]. Turk J Gastroenterol, 2022, 33(11): 901.

[22] KAYAL G, KERRISON R, HIRST Y, et al. Patients' experience of using colonoscopy as a diagnostic test after a positive FOBT/FIT: a systematic review of the quantitative literature[J]. BMJ Open, 2023, 13(9): e071391.

[23] SHAUKAT A, KAHIC J, BURKE C A, et al. ACG clinical guidelines: colorectal cancer screening 2021[J]. Am J Gastroenterol, 2021, 116(3): 458-479.

[24] HOSOE N, LIMPIAS KAMIYA K J L, HAYASHI Y, et al. Current status of colon capsule endoscopy[J]. Dig Endosc, 2021, 33(4): 529-537.

[25] BENECH N, VINET O, GAUDIN J L, et al. Colon capsule endoscopy in clinical practice: lessons from a national 5-year observational prospective cohort[J]. Endosc Int Open, 2021, 9(10): e1542-e1548.

[26] MACLEOD C, OLIPHANT R, RICHARDS C, et al. An evaluation of a novel bowel preparation regimen and its effect on the utility of colon capsule endoscopy: a prospective cohort study with historical controls[J]. Tech Coloproctology, 2023, 27(8): 665-672.

[27] 董维峰, 兰德刚, 陈风, 等. 腹腔镜下根治术对大肠癌患者应激反应、免疫功能及并发症的影响[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(6): 35-39.

[28] PATHAK A, WANJARI M. Minimally invasive colorectal surgery techniques[J]. Cureus, 2023, 15(10): e47203.

[29] PERIVOLIOTIS K, BALOYIANNIS I, MAMALOUDIS I, et al. Change point analysis validation of the learning curve in laparoscopic colorectal surgery: experience from a non-structured training setting[J]. World J Gastrointest Endosc, 2022, 14(6): 387-401.

[30] RAVENDRAN K, ABIOLA E, BALAGUMAR K, et al. A review of robotic surgery in colorectal surgery[J]. cureus, 2023, 15(4): e37337.

[31] UK B S. Current status and future of robotic surgery for colorectal cancer-an English version[J]. J Anus Rectum Colon, 2022, 6(4): 221-230.

收稿日期: 2024-05-14; 修回日期: 2024-06-31

(本文编辑 覃洪含)

本文引文格式:韦梦秋,黄霞.水通道蛋白 9 在脓毒症中的分子机制及治疗进展[J].
右江民族医学院学报,2025,47(2):362-366.

【医学综述】

水通道蛋白 9 在脓毒症中的分子机制及治疗进展

韦梦秋^{1,2},黄霞¹

(1. 右江民族医学院附属医院呼吸与危重症医学科,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000)

摘要: 水通道蛋白 9(AQP9)是水通道蛋白家族的重要成员,通过其独特的跨膜孔道结构介导小分子溶质运输,维持细胞渗透压和代谢稳态。近年研究表明,AQP9 在脓毒症的病理过程中发挥关键作用,其表达异常与炎症调控、免疫细胞迁移密切相关,其具体的分子机制及抑制剂的研发一直是国内外学者共同关注的问题。本文系统综述 AQP9 的结构和功能特征及其在脓毒症中的分子作用,并探讨其作为生物标志物和治疗靶点的潜力。

关键词: 水通道蛋白 9;脓毒症;炎症调控;信号通路;靶向治疗

中图分类号: R631

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0362-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.028

脓毒症是由感染引发的全身性免疫反应综合征,炎症反应失控、免疫失衡及多器官功能障碍是其核心病理特征,尽管诊疗技术不断进步,但高死亡率仍是全球公共卫生的重大挑战。水通道蛋白 9(Aquaporin9, AQP9)是跨膜通道蛋白家族成员,通过介导水、甘油等小分子溶质运输维持细胞渗透压和代谢稳态,并在免疫调节、炎症反应中发挥关键作用。近年研究表明,AQP9 在脓毒症中表达升高,激活核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)等信号通路,加剧促炎因子释放、氧化应激及免疫细胞迁移失衡,引起多器官损伤^[1]。目前靶向 AQP9 的抑制剂研究取得重要进展,但其临床转化仍面临特异性不足、跨物种差异等挑战。笔者对 AQP9 的结构功能特征、在脓毒症中的分子作用机制及靶向治疗进展进行综述,旨在为优化脓毒症精准干预策略提供理论依据,推动其向临床应用的转化。

1 AQP9 的结构与功能

AQP9 是一种具有独特分子结构的跨膜通道蛋白,由 295 个氨基酸残基组成,分子量约 32 kDa,其功能依赖于高度保守的六跨膜 α -螺旋(TM1-TM6),以特定拓扑排列形成孔径约 3.4 Å 的中央孔道。TM2 和 TM5 螺旋上的两个高度保守的 NPA 基序构成选择性过滤器,通过带正电的 Arg 残基的电荷分布及空间位阻效应,精准调控水分子及甘油、尿素、乳酸等小分子溶质的跨膜运输^[2]。位于细胞膜外侧的 B/E 环与细

胞膜内侧的 A/C/D 环形成的跨膜连接环不仅维持 AQP9 结构稳定性,还介导其与离子通道、转运蛋白等信号分子的相互作用,形成功能复合体以维持细胞渗透压及代谢稳态^[3]。翻译后修饰 Ser11 位点磷酸化可动态调节 AQP9 的构象与通透活性;磷酸化增强其水运输效率,而糖基化修饰可能影响膜定位与复合物组装^[4]。此外,AQP9 的跨物种保守性,如人类与大鼠序列高度相似,提示其在进化中的核心功能地位,其关键区域 NPA 基序及跨膜螺旋的氨基酸残基高度保守,对结构稳定性和底物选择性至关重要。

AQP9 在人体中广泛分布且具有组织特异性,其功能涵盖物质转运、代谢调控及免疫调节。在肝脏中,AQP9 于肝细胞基底膜高表达,通过介导甘油跨膜转运为糖异生提供底物,并在禁食状态下表达上调以促进脂肪分解产物的利用。肾脏中,AQP9 参与尿素循环以浓缩尿液,而脑内星形胶质细胞则依赖其乳酸穿梭机制向神经元提供能量底物,维持突触活动。免疫系统中,AQP9 通过调控中性粒细胞伪足形成和巨噬细胞吞噬体酸化,增强免疫细胞趋化迁移和抗原提呈能力。在炎症反应中,AQP9 通过激活 NF- κ B 通路促进肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等促炎因子释放,同时调控烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶活性加剧氧化应激,形成炎症级联放大效应^[5]。

AQP9 的表达受多层级调控:转录水平上,NF- κ B、AP-1 等因子响应脂多糖或肿瘤坏死因子- α 炎症信

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA297103)

第一作者: 韦梦秋,在读硕士研究生,研究方向:脓毒症发病机制及诊治,E-mail:1985181624@qq.com

通讯作者: 黄霞,博士,副主任医师,研究方向:脓毒症发病机制及诊治,E-mail:huangxia722@126.com

号驱动基因转录;代谢层面,胰岛素通过 PI3K/AKT 通路抑制叉头框蛋白 O1,下调肝脏 AQP9 表达以应对高血糖;表观遗传机制如启动子 CpG 岛甲基化和组蛋白修饰 H3K9 乙酰化增强转录、H3K27me3 抑制表达精细调控其活性^[6-7]。病理状态下,AQP9 功能异常与多种疾病相关:肝癌中启动子高甲基化导致基因表达抑制,糖尿病中胰岛素抵抗削弱甘油转运加剧代谢紊乱,而脓毒症模型中 AQP9 敲除可减轻炎症损伤。这些机制揭示 AQP9 通过整合结构动态性、组织特异性表达及跨信号通路互作,成为代谢稳态和免疫平衡的关键枢纽,为相关疾病的靶向干预提供了新方向。

2 AQP9 在脓毒症中作用的分子机制

2.1 AQP9 与炎症反应 脓毒症的核心病理生理特征是免疫系统过度激活与炎症失衡,其发病始于模式识别受体对病原体如脂多糖等相关分子模式或高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、线粒体等 DNA 损伤相关分子模式的识别,触发巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞释放肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β 、白介素-6 等大量促炎因子,形成“细胞因子风暴”^[8]。在此过程中,肿瘤坏死因子- α 依赖性坏死性凋亡通过 RIPK3/MLKL 通路诱导细胞膜破裂,释放损伤相关分子进一步激活模式识别受体,形成炎症级联放大;同时,脂多糖与 HMGB1 结合经晚期糖基化终末产物受体内存后激活半胱天冬酶-11,切割消皮素 D 形成膜孔,导致白介素-1 β 、白介素-18 等炎性因子外流,并通过正反馈环路加剧全身炎症^[9]。失控的炎症反应通过多重机制导致多器官损伤:肺部因脂多糖激活内皮细胞及中性粒细胞释放活性氧和蛋白酶,破坏肺泡屏障并诱导肺泡细胞凋亡,引发肺水肿;肾脏因炎症介导的微循环障碍及 HMGB1 通过 TLR4/NF- κ B 通路激活肾小管上皮焦亡,导致急性肾损伤与纤维化;中枢神经系统因白介素-6 等因子降解血脑屏障紧密连接,引发胶质细胞活化及脑水肿;胃肠系统因黏膜屏障破坏导致细菌移位,脂多糖扰乱肠道菌群稳态;心脏则因肿瘤坏死因子- α 激活半胱天冬酶-3 诱导心肌细胞凋亡及活性氧爆发致钙稳态失衡,引发心功能不全^[10]。各器官损伤并非孤立,而是通过循环中脂多糖、HMGB1 及细胞因子的系统性播散形成“交叉对话”,推动免疫过度激活、细胞死亡途径失控及炎症介质网络互作的恶性循环,最终导致代谢崩溃与多器官功能失代偿。

AQP9 在免疫调节与炎症反应中扮演着关键角色。AQP9 动态调节免疫细胞的渗透压与离子平衡,影响免疫细胞的迁移与活化。AQP9 促进水分子及 Cl⁻ 等小分子溶质跨膜转运,驱动伪足形成与细胞骨架重塑,从而增强中性粒细胞向炎症部位的定向迁移,AQP9 基因敲除的脓毒症小鼠中性粒细胞迁移能力下

降。AQP9 还通过调控 T 细胞与 B 细胞的渗透压稳态,影响其活化与增殖能力,抑制 AQP9 表达可降低 T 细胞、B 细胞增殖速率,并减少白介素-2、 γ 干扰素等效应因子的分泌^[11]。AQP9 通过双重机制加剧炎症反应。AQP9 通过促进 I κ B α 磷酸化驱动 NF- κ B 核转位,显著上调肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等促炎因子表达。AQP9 缺失可降低 NADPH 氧化酶活性,减少活性氧生成,同时提升超氧化物歧化酶水平,从而减轻氧化损伤^[12]。在 AQP9 敲除脓毒症模型中,肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等炎症因子释放减少,器官损伤评分改善^[8]。上述机制表明,AQP9 通过渗透压调节、NF- κ B 通路激活及氧化还原失衡等环节,形成炎症放大的级联效应,为靶向干预脓毒症等炎症性疾病提供了理论依据。在脂多糖诱导的脓毒症模型中,AQP9 基因敲除小鼠存活率显著提高,其机制与抑制诱导型一氧化氮合酶/环氧化酶-2 表达导致一氧化氮和超氧化物生成减少相关^[2];盲肠结扎穿刺诱导的脓毒症小鼠模型进一步证实,AQP9 在心脏、肾脏中高表达,抑制其功能可提升左室射血分数及下调血肌酐水平。脓毒症患者血液 AQP9 水平与中性粒细胞计数正相关,且高表达患者死亡率风险增加,是独立的预后危险因素^[1]。

2.2 AQP9 与免疫细胞迁移 脓毒症的病理进程中,免疫细胞迁移的动态失衡既是清除病原体的关键机制,也是驱动炎症失控与器官损伤的核心因素。感染早期,中性粒细胞在 C-X-C 基序趋化因子配体 8 趋化下通过整合素介导的滚动-黏附-跨内皮迁移向炎症部位募集,吞噬病原体并释放活性氧及髓过氧化物酶同时 Th1/Th17 细胞分泌 γ 干扰素、白介素-17 激活巨噬细胞,促进肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 释放,但过度活化可导致微循环障碍;单核/巨噬细胞经 TLR4/NF- κ B 通路激活后,通过 CCL2-CCR2 轴迁移至病灶区释放 HMGB1 等病原体相关分子模式,进一步放大炎症信号,而树突状细胞依赖 CCR7 迁移至淋巴结激活适应性免疫应答^[2]。然而,脓毒症进展中免疫迁移呈现“双刃剑”效应:早期趋化因子风暴中白介素-8、单核细胞趋化蛋白-1 导致中性粒细胞过度聚集于微血管,通过中性粒细胞胞外陷阱、基质金属蛋白酶-9 释放引发内皮损伤和血栓形成,加重器官缺血;晚期因白介素-2 减少及 HMGB1 介导的 CXCR4/CXCL12 轴失调,T 细胞和单核细胞迁移能力显著下降,导致病原体清除失败和继发感染^[13]。HMGB1 水平升高进一步抑制 T 细胞增殖及白介素-2 分泌,引发免疫麻痹,中性粒细胞核变形能力下降及微循环阻塞则直接促进多器官衰竭^[14]。

AQP9 通过调控多种免疫细胞的迁移动态与功能表型,参与脓毒症的免疫失衡及器官损伤进程。在中

性粒细胞中, AQP9 过表达可通过参与微管重组与肌动蛋白极化, 破坏细胞骨架动态性, 导致其变形能力下降及跨内皮迁移异常^[15]。感染早期, AQP9 介导的渗透压调节促进中性粒细胞向炎症部位过度聚集, 释放过量活性氧及基质金属蛋白酶-9, 直接损伤内皮屏障并引发微循环阻塞, 加速多器官衰竭; 而脓毒症晚期, AQP9 异常上调与核变形能力丧失相关, 导致中性粒细胞无法有效穿透组织间隙, 加剧病原体扩散^[12, 16]。在巨噬细胞中, AQP9 通过双重机制调控其免疫极化: 一方面, 脂多糖刺激下 AQP9 表达显著升高, 通过增强 M1 型巨噬细胞的 NF- κ B 信号通路, 促进肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等促炎因子释放, 并协同活性氧爆发加重组织损伤; 另一方面, AQP9 介导的乳酸外排可激活 HIF-1 α /VEGF 轴, 推动巨噬细胞向 M2 型抗炎表型转化, 但其在脓毒症中的修复功能可能因持续炎症微环境而受限^[17-18]。值得注意的是, AQP9 还参与病原体-巨噬细胞互作: 铜绿假单胞菌通过 lasI/rhII 群体感应系统诱导巨噬细胞 AQP9 表达上调并重新定位于伪足前缘, 从而增强吞噬效率及病原体清除能力; 而 AQP9 缺失则导致巨噬细胞氧化应激与凋亡抵抗能力下降, 提示其在宿主防御中的双重角色^[19]。在树突状细胞及 T 细胞中, AQP9 通过调控细胞体积及代谢适应影响其迁移与功能: LPS 刺激下树突状细胞的 AQP9 高表达可加速其成熟并促进炎症信号传递, 而敲除 AQP9 后树突状细胞炎症反应显著减弱^[20]。AQP9 通过维持 CD8⁺ T 细胞渗透压稳态, 保障其快速向感染或肿瘤微环境迁移并延长存活时间, 但在脓毒症中可能因 T 细胞耗竭而加剧免疫抑制^[5]。免疫微环境层面, AQP9 介导的乳酸转运不仅激活巨噬细胞缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子通路促进血管渗漏, 还可通过调控肿瘤相关巨噬细胞极化, M2 型巨噬浸润减少可缓解组织纤维化影响炎症—修复平衡; 在基因调控网络中, AQP9 与 ZAP70 协同抑制 JAK/STAT 通路, 可能通过限制过度炎症反应减轻脓毒症继发性损伤^[21]。AQP9 通过时空特异性的免疫细胞迁移调控、代谢—炎症信号整合及病原体互作, 成为脓毒症免疫紊乱的关键节点, 其动态表达失衡贯穿炎症风暴向免疫麻痹转变的全过程, 为靶向干预提供了新方向。

2.3 AQP9 参与脓毒症的细胞信号转导调控 脓毒症的病理进程本质上是免疫—炎症信号网络失衡驱动的系统性紊乱, 其发生发展涉及多条关键细胞信号通路的级联激活与交互作用。TLR4 信号通路作为炎症启动的核心枢纽, 通过结合脂多糖等病原体相关分子模式或 HMGB1 等损伤相关分子模式, 触发髓样分化初级反应蛋白 88 依赖途径, 激活 I κ B 激酶复合物并降解 I κ B α , 释放 NF- κ B 进入细胞核, 诱导肿瘤坏死因子-

α 、白介素-6 等促炎因子的转录^[22-23]。同时, TLR4 通过 TRIF 依赖途径激活 IRF3, 促进 I 型干扰素表达, 进一步放大先天免疫应答, 驱动炎症风暴的形成^[24]。NF- κ B 通路在炎症级联放大中发挥核心作用, 通过上调一氧化氮合酶、环氧化酶-2 表达促进白介素-1 β 的释放和氧化应激, 并与 p38 MAPK 通路形成正反馈环路^[25]。活性氧激活 p38MAPK 后, 磷酸化 NF- κ B p65 亚基, 增强其转录活性, 进一步加剧内皮细胞凋亡和微血管渗漏。p38MAPK 本身通过 MKK3/6 的磷酸化激活, 介导细胞应激反应如热休克蛋白 27 的表达, 并诱导线粒体凋亡, 例如通过激活 Bax 促凋亡蛋白。与此同时, p38MAPK 与 PI3K/Akt 通路存在拮抗关系, Akt 通过抑制 p38MAPK 的上游激酶 ASK1 减弱其活性, 而 p38MAPK 则通过阻断 Akt 的促存活信号抑制其功能^[26]。

PI3K/Akt 通路在脓毒症中具有双重作用。早期, 它通过激活 mTORC1 支持免疫细胞的代谢重编程, 并抑制凋亡相关蛋白如 Bim 的表达, 促进细胞存活。然而, PI3K/Akt 的持续活化会抑制自噬过程, 加剧氧化损伤。晚期, PI3K/Akt 信号失调导致 T 细胞耗竭, 表现为程序性死亡受体 1 表达上调和白介素-2 分泌减少, 同时通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进器官纤维化^[27]。这些信号通路的交互作用形成了复杂的时空动态网络。TLR4-NF- κ B 轴启动炎症反应, 与 p38 MAPK 通过活性氧和促炎因子相互增强; PI3K/Akt 整合代谢与炎症信号, 早期协同免疫应答, 晚期加剧免疫麻痹; NLRP3 炎症小体与细胞焦亡协同放大炎症损伤, 最终, 多重信号通路的失衡共同驱动脓毒症从炎症风暴向多器官衰竭进展。

AQP9 通过调控 NF- κ B、p38 MAPK 和 PI3K/Akt 等关键信号通路, 在脓毒症的发病机制及多器官功能障碍中发挥核心作用。在脓毒症早期, AQP9 通过直接或间接增强 NF- κ B p65 的核转位, 促进下游促炎因子肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、白介素-1 β 的释放, 驱动“炎症风暴”的形成。研究表明, 脂多糖刺激下 AQP9 基因敲除小鼠显著抑制 NF- κ B 活化, 导致炎症性一氧化氮、超氧化物及一氧化氮合酶、环氧化酶-2 水平降低, 从而减轻全身炎症反应^[28]。此外, AQP9 通过调控 NF- κ B 信号间接激活 NLRP3 炎症小体, 促进半胱天冬酶-1 介导的白介素-1 β 成熟释放, 加剧脓毒症中的“细胞焦亡—炎症”恶性循环。AQP9 抑制剂 RG100204 可抑制 NF- κ B/NLRP3 轴, 减少肺和胰腺组织损伤, 提示 AQP9 是炎症风暴驱动的关键分子^[29]。在氧化应激与细胞死亡方面, AQP9 通过调节细胞渗透压和甘油代谢, 影响线粒体活性氧生成。活性氧作为 p38MAPK 的上游激活因子, 其积累导致

p38MAPK 磷酸化,进而促进内皮细胞凋亡和微血管渗漏,尤其在脓毒症肺损伤中表现显著。AQP9 通过激活 ERK1/2 与 p38 MAPK 共享的活性氧上游信号,上调促凋亡蛋白 Bax 并抑制 Bcl-2,形成 Bax/Bcl-2 比值失衡,激活半胱天冬酶级联反应,扩大心肌细胞凋亡范围^[30]。沉默 AQP9 或使用 p38MAPK 抑制剂可减轻活性氧—p38MAPK 介导的氧化应激损伤,改善脓毒症相关器官功能障碍,表明 AQP9 在氧化应激与细胞凋亡中的调控作用具有重要治疗潜力。在代谢与免疫调控方面,AQP9 通过介导甘油转运影响细胞内糖酵解等能量代谢,进而激活 PI3K/Akt/mTOR 通路,促进细胞存活。然而,在脓毒症中,PI3K 的过度激活可能抑制自噬并加剧炎症损伤,形成“代谢—免疫失衡”的恶性循环并加重器官纤维化^[31]。此外,AQP9 通过 PI3K/Akt 通路调控免疫细胞功能,晚期脓毒症中 PI3K 失调导致 T 细胞耗竭和免疫麻痹,进一步加剧多器官功能障碍。

在脓毒症所致的多器官功能障碍中,AQP9 通过 NF- κ B/NLRP3 轴释放肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 促炎因子,诱导内皮损伤和微循环障碍,导致肺水肿、急性肾损伤及血脑屏障破坏。在肺组织中,AQP9 通过 NF- κ B/NLRP3 促进中性粒细胞浸润和肺泡水肿,抑制剂 RG100204 可减少 CD68⁺/CD11b⁺ 细胞浸润,显著改善肺功能^[1]。在心脏中,AQP9-ERK1/2-Bax 通路扩大梗死面积,沉默 AQP9 可改善心功能^[30]。在肝脏与肾脏中,AQP9 通过活性氧-p38 MAPK 加剧氧化损伤,抑制其表达可减轻纤维化和急性肾小管坏死^[12]。在中枢神经系统中,AQP9 介导的血脑屏障通透性增加导致脑水肿,与 NF- κ B 驱动的神炎症密切相关^[32]。这些器官特异性损伤表明,AQP9 在脓毒症多器官功能障碍中具有广泛的调控作用。

3 AQP9 抑制剂研究进展

近年来,AQP9 的抑制剂研究取得了显著进展,为脓毒症的治疗带来了新的希望。HTS13268 作为一种高效的 AQP9 抑制剂,通过阻断炎症性一氧化氮和超氧阴离子的释放,减轻全身炎症反应^[12]。天然化合物根皮素通过抑制 AQP9 的溶质通透性,下调单核细胞趋化蛋白-1、骨形态发生蛋白-2 及 NF- κ B 受体活化因子配体 RANKL 的表达,展现出抗氧化与抗炎双重效应,证实了靶向 AQP9 的治疗潜力^[3]。在动物模型中,新型 AQP9 抑制剂 RG100204 表现出显著的抗炎和器官保护作用。在盲肠结扎穿刺诱导的脓毒症小鼠中, RG100204 能够有效减轻脓毒性心肌病变和多器官衰竭^[1]。RG100204 能够减少重症急性胰腺炎所致的急性呼吸窘迫综合征动物模型胰腺和肺组织中炎症细胞因子的表达,并降低 NF- κ B 的活化以及 NLRP3 炎症

小体在心脏和肾脏中的表达^[33]。上述研究结果表明,AQP9 不仅是脓毒症治疗的潜在药物靶点,还可能作为脓毒症的生物标志物,为疾病的早期诊断和治疗提供重要依据。AQP9 抑制剂氯化汞通过限制细胞体积变化、抑制 p38MAPK/NF- κ B 通路以及促进自噬,在巨噬细胞 M1 极化中发挥重要作用。氯化汞通过抑制 NF- κ B 和 p38 MAPK 通路激活,减少白介素-1 β 产生,并减轻线粒体活化和活性氧的生成,促进自噬过程。氯化汞还通过增加 LC3-II/LC3-I 比例以及降低 PTEN 诱导的激酶 1 的表达,促进受损线粒体的回收和线粒体功能的恢复^[34]。基于 NF- κ B 通路在脓毒症中的核心作用机制,氯化汞可能通过靶向 AQP9 发挥治疗作用,为脓毒症的治疗提供了新的药物靶点^[18]。

4 研究展望与结论

AQP9 凭借其独特的结构特征,在跨膜转运水和多种小分子溶质方面发挥着重要作用,通过多条信号通路调控脓毒症免疫调节和炎症反应,可成为脓毒症潜在的诊断生物标志物和治疗靶点。尽管目前在 AQP9 特异性抑制剂的开发和解析其在脓毒症病理作用的分子机制等方面仍面临挑战,但基础研究已取得显著进展,临床转化也展现出良好前景,未来需要整合多学科优势,深入开展基础与转化研究,充分挖掘其科学价值与临床应用潜力,为脓毒症的防治提供新思路。

参考文献:

- [1] MOHAMMAD S, O'RIORDAN C E, VERRA C, et al. RG100204, a novel aquaporin-9 inhibitor, reduces septic cardiomyopathy and multiple organ failure in murine sepsis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 900906.
- [2] DA SILVA I V, GARRA S, CALAMITA G, et al. The multifaceted role of aquaporin-9 in health and its potential as a clinical biomarker [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (7): 897.
- [3] NEDERVEEN-SCHIPPERS L M, PATHAK P, KEIZER-GUNNINK I, et al. Combined FCS and PCH analysis to quantify protein dimerization in living cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (14): 7300.
- [4] SINGH C R, GLINEBURG M R, MOORE C, et al. Human oncoprotein 5MP suppresses general and repeat-associated non-AUG translation via eIF3 by a common mechanism [J]. *Cell Rep*, 2021, 36 (2): 109376.
- [5] QUAN Y Z, KAN B, YANG B X. Aquaporins in immune system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1398: 195-202.
- [6] ZHANG B, LV D Y, CHEN Y, et al. Aquaporin-9 facilitates liver regeneration following hepatectomy [J]. *Redox Biol*, 2022, 50: 102246.
- [7] ZAHL S, SKAULI N, STAHL K, et al. Aquaporin-9 in the brain inflammatory response; evidence from mice injected with the parkinsonogenic toxin MPP [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (4): 588.

- [8] YANG K, FAN M, WANG X H, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(1): 133-146.
- [9] VOLCHUK A, YE A N, CHI L, et al. Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4561.
- [10] LI Y X, ZHU H R, PAN L Y, et al. microRNA-103a-3p confers protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and consequent multiple organ dysfunction syndrome by targeting HMGB1 [J]. Infect Genet Evol, 2021, 89: 104681.
- [11] HUANG H, YAN S, GUO T W, et al. Bile acid metabolism modulates intestinal immunity involved in ulcerative colitis progression [J]. Heliyon, 2024, 10(14): e34352.
- [12] LI Y H, YANG X, LI X, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol promote liver regeneration through regulation of hepatic oxidative homeostasis and glucose/lipid metabolism[J]. Phytomedicine, 2024, 135: 156165.
- [13] RUMP K, ADAMZIK M. Aquaporins in sepsis- an update[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1495206.
- [14] PANG X L, LI J, WANG J, et al. MiR-142-3p Regulates ILC1s by targeting HMGB1 via the NF- κ B pathway in a mouse model of early pregnancy loss[J]. Curr Med Sci, 2024, 44(1): 195-211.
- [15] KURE J L, KARLSSON T, Andersen CB, et al. Using kICS to reveal changed membrane diffusion of AQP-9 treated with drugs[J]. Membranes (Basel), 2021, 11(8): 568.
- [16] SUN S P, MAO Y Q, LE S H, et al. Biological characteristics of molecular subtypes of ulcerative colitis characterized by ferroptosis and neutrophil infiltration[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 9510.
- [17] LIU W, LI Y L, ZHANG Y, et al. Identification of biomarkers and immune infiltration in acute myocardial infarction and heart failure by integrated analysis[J]. Biosci Rep, 2023, 43(7): BSR20222552.
- [18] CHUANG Y C, WU S Y, HUANG Y C, et al. Cell volume restriction by mercury chloride reduces M1-like inflammatory response of bone marrow-derived macrophages[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1074986.
- [19] REN Y Y, YOU X J, ZHU R, et al. Mutation of *Pseudomonas aeruginosa lasI/rhlI* diminishes its cytotoxicity, oxidative stress, inflammation, and apoptosis on THP-1 macrophages [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12 (10): e0414623.
- [20] LU Z M, DING L, ZHANG S, et al. Bioinformatics analysis of copper death gene in diabetic immune infiltration [J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(39): e35241.
- [21] SHI Y D, YASUI M, HARA-CHIKUMA M. AQP9 transports lactate in tumor-associated macrophages to stimulate an M2-like polarization that promotes colon cancer progression[J]. Biochem Biophys Rep, 2022, 31: 101317.
- [22] WU Y C, SU B H, CHENG W H, et al. CYLD links the TRAF6/sNASP axis to TLR4 signaling in sepsis-induced acute lung injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2025, 82(1): 124.
- [23] TIAN M, SHI Y, GONG X, et al. MG53 protects against septic cardiac dysfunction by ubiquitinating ATF2[J]. J Adv Res, 2025; S2090-1232(25)00191-2.
- [24] LU X C, ZHU H X, LIU M Y, et al. Serum amyloid P component suppresses porcine epidemic diarrhea virus replication through TLR4-mediated IFN- β signaling pathway[J]. Vet Microbiol, 2025, 304: 110459.
- [25] CHEN P R, LI C Y, YAZAL T, et al. Protective effects of nordalbergin against LPS-induced endotoxemia through inhibiting MAPK/NF- κ B signaling pathway, NLRP3 inflammasome activation, and ROS production [J]. Inflamm Res, 2024, 73(10): 1657-1670.
- [26] CUI Y N, TIAN N, LUO Y H, et al. High-dose Vitamin C injection ameliorates against sepsis-induced myocardial injury by anti-apoptosis, anti-inflammatory and pro-autophagy through regulating MAPK, NF- κ B and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in rats[J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(8): 6937-6953.
- [27] CHEN L, LI L, ZOU S Z, et al. B. Tong-fu-li-fei decoction attenuates immunosuppression to protect the intestinal-mucosal barrier in sepsis by inhibiting the PD-1/PD-L1 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6): 840.
- [28] TESSE A, GENA P, RÜTZLER M, et al. Ablation of aquaporin-9 ameliorates the systemic inflammatory response of lps-induced endotoxic shock in mouse [J]. Cells, 2021, 10(2): 435.
- [29] CHEN J W, ZHU X D, WANG Z Q, et al. Inhibition of aquaporin-9 ameliorates severe acute pancreatitis and associated lung injury by NLRP3 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 137: 112450
- [30] HUANG X M, YU X B, LI H X, et al. Regulation mechanism of aquaporin 9 gene on inflammatory response and cardiac function in rats with myocardial infarction through extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway [J]. Heart Vessels, 2019, 34(12): 2041-2051.
- [31] MA N N, LIU B, JIN Y F, et al. Aquaporin 9 causes recurrent spontaneous abortion by inhibiting trophoblast cell epithelial-mesenchymal transformation and invasion through the PI3K/AKT pathway[J]. Biol Reprod, 2023, 109(5): 736-748.
- [32] WANG S, SOLENOV E I, YANG B. Aquaporin inhibitors[J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1398: 317-330.
- [33] FLORIO M, ENGFORS A, GENA P, et al. Characterization of the aquaporin-9 inhibitor RG100204 in vitro and in db/db mice[J]. Cells, 2022, 11(19): 3118.
- [34] JIN F, LI J Y, ZHAO C Y, et al. Quercetin alleviates kidney damage caused by mercury chloride; the protective effects of quercetin on autophagy and inflammation were studied based on TRIM32/TLR4/LC3 pathway[J]. Toxicon, 2024, 248: 108031.

收稿日期: 2025-01-11; 修回日期: 2025-02-25

(本文编辑 钟琳)

本文引文格式:覃洪含,覃灵艳,周文婷,等.民族医科院校基础医学研究生培养模式创新与实践——以右江民族医学院耐药微生物防控导师团队为例[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):367-370.

【医学教育研究】

民族医科院校基础医学研究生培养模式创新与实践

——以右江民族医学院耐药微生物防控导师团队为例

覃洪含¹,覃灵艳²,周文婷³,曾红³,莫小强³,罗家锚³,黄衍强³

(1. 右江民族医学院药学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要: 本研究聚焦民族医科院校基础医学研究生的培养模式,深度剖析导师引领与多学科融合在其学术发展进程中的关键效能。导师依托自身扎实的专业知识、前沿的科研认知和良好的师德师风,在基础医学理论知识夯实、实验技能提升、科研思维构建以及学术道德培养等层面,为研究生提供精准且全面的指引。多学科融合促使基础研究与临床研究、药学、中药学、化学和微生物学等学科深度交融,为基础医学研究生培养开辟全新路径。同时,通过搭建跨学科实践平台、开展联合科研项目、联合培养等举措,全方位拓展研究生的学术格局,强化其综合科研素养。导师的引领与多学科融合协同发力,成为解锁民族医科院校基础医学研究生成长的核心密码,对推动民族医学基础研究的创新发展具有深远意义。

关键词: 民族医科院校;研究生培养模式;创新与实践

中图分类号: G642

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)02-0367-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.029

研究生教育是国家教育结构中最高层次的教育,其核心是培养学生的科研技能、科研思维与创新能力^[1]。随着全球现代科学技术的发展,培养具备扎实理论基础和创新能力的高素质医学人才,已成为民族地区医疗卫生事业发展的迫切需求。民族医科院校作为培养民族地区医疗卫生人才的重要基地,其基础医学研究生培养模式直接关系到人才培养的质量和民族地区医疗卫生事业的发展。在这一过程中,导师的引领作用至关重要。坚持言传与身教相统一是研究生导师立德树人的价值规范,也是育人的有效途径^[2]。科学研究不仅是探索真理的过程,更是滋养心灵、塑造人格、磨砺意志、修身正己的实践。导师需具备高尚的道德情操、严谨的治学态度、精深的专业造诣和渊博的知识储备,才能更好地激发研究生的科学理想和学术兴趣^[2]。此外,多学科交叉与融合为研究者提供了全新的研究方法和视角,能够有效应对复杂的社会问题和

科技挑战^[3]。这种融合不仅推动了知识的创新,也在促进社会进步和经济发展中发挥着重要作用^[3]。然而,传统的基础医学研究生培养模式存在培养目标单一、课程体系僵化、实践创新能力不足等问题,难以满足新时代对医学人才的多元化需求。右江民族医学院耐药微生物防控导师团队立足民族地区,以服务地方经济社会发展为导向,积极探索基础医学研究生培养模式的创新。通过优化培养目标、重构课程体系、强化实践教学、加强导师团队建设等一系列改革与实践,取得了显著成效。本文以右江民族医学院耐药微生物防控导师团队为例,探索民族医科院校基础医学研究生培养模式的创新路径,以为同类院校提供借鉴和参考。

1 民族医科院校研究生的培养现状

民族医科院校的研究生教育,传统教育模式的局限性日益凸显。在学科设置方面,因地域文化、民族医

基金项目: 广西研究生教育改革课题(JGY2023294);广西教育科学“十四五”规划学术期刊建设研究专项课题(2022QKB026)

第一作者: 覃洪含,副教授,研究方向:中药药理学,E-mail:313770493@qq.com

通讯作者: 黄衍强,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:医学微生物学与免疫学,E-mail:hyq77615@163.com

学传统,打破学科界限融合知识时较复杂,要处理不同医学文化理念差异,基础与临床医学结合项目开展及跨学科融合难度颇大。在教育资源方面,师资力量:地处欠发达地区,吸引和留住优秀教师较难,教师流失较严重,与发达地区高校师资差距较大,学生接触先进理念和前沿方法机会较少,不像其他院校可依托地区优势稳定师资;实践平台与科研条件:受一定经济水平限制,科研设备和资源短缺较突出,提供实践机会有限,对培养质量有一定影响。在评价体系方面,需兼顾民族医学传承、地方疾病防治等需求,但通用评价体系侧重学术成果等,不利于其结合特色培养适应本地需求的研究生及民族医学特色领域发展创新。

2 耐药微生物防控导师团队培养研究生的创新模式

右江民族医学院耐药微生物防控导师团队于 2019 年开始组建,截止目前,该团队获得“广西壮族自治区边疆民族地区耐药微生物临床防治技术及先导药物工程研究中心”和“广西病原微生物耐药防控科技创新合作基地”2 个省级科技平台立项建设,承担国家自然科学基金及广西重大科技专项等项目共 62 项。已培养研究生 32 人,研究生以第一作者及参与发表 JCR 一区论文 35 篇,出版专著 2 部,获国家发明专利授权 16 件,实现成果转化 3 件,获中国国际“互联网+”创新创业大赛省级金奖 3 项、银奖 6 项、广西网络科普作品创作大赛科普微视频作品一等奖、广西科技资源科普化优秀案例奖等系列奖励,有 7 人次获中国自强之星、广西优秀毕业生等荣誉,有 10 人次获国家奖学金或校长奖学金。该导师团队通过导师引领、多元培养模式的实施,在研究生培养方面取得了丰硕的成果,为了更好地分享和推广该模式,具体介绍如下。

2.1 科学指导,助力研究生学术能力提升 研究生导师是研究生培养的第一责任人,肩负培养高层次创新人才的重任^[4]。良好的导生关系、和谐的导生互动是微观层面影响研究生培养质量的重要因素之一^[5]。在研究生学术培养过程中,导师团队通过专业知识和学术洞察力,为学生提供重要指导。在开题报告阶段,导师结合学生的兴趣与能力,从医学领域的广泛研究方向中,帮助学生选择兼具研究价值与可行性的课题。研究计划的制定是学术研究的关键环节。导师根据学生的实际情况,制定个性化的研究计划,合理安排时间节点,确保研究任务有序推进。例如,在研究方法的选择上,导师通过与学生的深入讨论,结合研究目标与特色,协助确定科学合理的研究方法,保障开题报告的顺利完成和研究计划的顺利实施。学位论文的撰写过程是研究生综合运用所学知识,发现问题、分析问题和解决问题的研究过程^[6]。学位论文的质量是研究生培养质量、创新能力和学术水平的集中体现^[7]。在论文写

作阶段,导师从选题的创新性、文献综述的完整性、研究方法的科学性以及结论的可靠性等方面,进行全面指导与严格把关,确保论文质量达到较高水平。

2.2 科研启蒙,激发潜能 导师的科研启蒙为研究生开启了探索未知世界的大门。组会是导师与学生交流的重要形式,也是导师营造学术氛围、传授各种知识、推动创新思维、培养综合能力、塑造社会价值的“最佳平台”^[7]。本导师团队定期召开组会,导师在组会中负责主持、引导、分析、总结和反馈,课题组人员则参与讨论、发言和提问。另外,本导师团队积极组织学术研讨活动,制定了每周、每月、每学期的详细研讨计划。并不定期邀请国内外知名专家举办讲座和研讨会。这些活动使学生能够接触到前沿的学术思想和研究成果,分享最新的研究进展,拓宽学术视野,激发研究兴趣与热情。学生们在研讨中积极提出见解和疑问,形成了浓厚的研学氛围,助力研究生稳步踏上求知之路。参与科研项目是研究生提升科研能力的重要途径。本导师团队注重让研究生参与导师的科研项目,从基础的数据收集和整理工作开始,逐步引导学生掌握科研方法和技能。例如,在部分导师关于壮药开发的科研项目中,研究生们深入壮族聚居地,开展田野调查,收集壮药相关文献和资料。在此过程中,学生们不仅学习了壮药的采集、炮制等传统方法,还掌握了如何运用现代科学技术对壮药进行分析和研究。在导师的悉心指导下,学生们成功提取了壮药中的有效成分,并对其药理作用进行了初步研究,最终取得了具有一定价值的科研成果。

2.3 严谨治学,协作育人 导师的人格魅力和道德品质如同一盏明灯,照亮了研究生的成长之路。他们严谨的学术态度让学生深刻认识到学术研究需要一丝不苟、精益求精。例如,在本导师团队中,严格要求学生按照操作规程进行实验操作,确保实验数据的记录和分析准确无误。在审阅学生的实验报告时,如果发现某个数据处理存在问题,就要求学生重新进行实验和分析,直到数据准确可靠为止。这种严谨的态度使学生深刻体会到学术研究的严肃性和科学性。导师的团队合作精神也深深影响着学生。在科研项目中,导师会组织研究生分工协作,共同完成研究任务。在这个过程中,学生们学会了如何与他人沟通合作,发挥各自优势,实现团队目标。例如,在幽门螺杆菌耐药防控研究项目中,学生们分工明确:有的学生负责感染模型的构建,有的学生负责先导化合物的制备和活性筛选,有的学生负责用药治疗,有的学生负责检测血液和组织病理指标等。在大量解剖幽门螺杆菌感染急性胃炎小鼠的过程中,从培养基的制备到动物解剖、脏器收集等环节,大家分工有序、相互配合,共同攻克了一个又一

个难题。通过这样的团队合作,学生们不仅提升了科研能力,还培养了团队合作精神和沟通协调能力。

3 多元培养:铺就学生成长之路

3.1 跨学科融合,拓宽视野 跨学科融合是打破学科壁垒、培养复合型人才的重要途径。多学科交叉教育旨在建立学科间的联系,运用共有概念和普遍规律,从多个角度研究实际问题,突显学科的共性^[8]。研究人员通过对 170 多位医学或生理学诺贝尔奖获得者的分析发现,这些诺贝尔奖得主中具有跨学科知识背景的占 44.2%,获奖成果中涉及多学科交叉的占 53%^[9]。本导师团队汇聚了微生物学、药学、医学检验学、临床医学、化学等不同专业的导师,通过每月举办的学术研讨会,让研究生接触到多学科的知识与方法,拓宽学术视野。招收硕士研究生的本科专业也是多样化,根据统计,2021~2024 年团队导师共招生 61 人,其中医学检验技术 49 人,临床医学 5 人,中药学 1 人,生物制药 1 人,其他专业 5 人。在抗感染先导药物的研究项目中,不同学科背景的研究生组成团队,充分发挥各自的专业优势,从广西特色民族医药中提取有效成分,开展结构鉴定和药理研究,最终成功开发出一种具有潜在药用价值的新产品。例如,团队研究发现,中药肉桂中的有效成分之一:肉桂醛,其具有明显地抗幽门螺杆菌的作用^[10]。通过跨学科融合,导师团队培养了研究生综合运用知识的能力,为其未来的学术研究与职业发展奠定了坚实基础。

3.2 实践锻炼,知行合一 实践锻炼对于民族医学院校的研究生而言,是成长过程中不可或缺的重要环节。只有将理论知识与实践紧密结合,才能真正掌握专业技能,提升解决实际问题的能力。研究生联合培养基地建设作为研究生创新培养模式改革的重要内容,受到我国诸多学者的关注与重视^[11]。医学技术的发展需要医务人员在临床实践中具备发现问题、分析问题和解决问题的能力,而集临床和科研能力于一体的学术型临床医学研究生在这方面有明显优势,是突破重大医学难题的攻坚力量^[12]。为此,该导师团队积极与企业、医院等机构建立合作关系,共建实践基地。学生在实践基地中能够接触到真实的病例和工作场景,将所学知识应用于实际操作。例如,在与右江民族医学院附属医院合作的幽门螺杆菌防控项目中,研究生参与临床诊疗工作,跟随医生查房、诊断病情、制定治疗方案、分析治疗效果并总结治疗经验。通过实践,他们不仅提升了临床技能,还深刻体会到自己参与的研究项目在实际医疗中的重要作用和价值,获得了强烈的成就感。此外,该导师团队还鼓励研究生积极参与社会实践活动。例如,他们组建了“桂无幽”团队,开展医疗下乡、健康科普等线上线下公益活动。在这些活动

中,研究生深入基层,为群众提供医疗服务,了解群众的健康需求,同时也增强了社会责任感和使命感。研究生们普遍表示:“通过这些活动,我们看到了自己参与的研究在偏远地区的广阔应用前景,也更加明确了自己的责任——努力做好科学研究,广泛传播防病知识,将研究成果转化和应用,真正做到科技为民。”通过这些实践锻炼,研究生实现了知行合一,在实践中不断成长和进步。

3.3 国际交流,接轨前沿 在全球化的时代背景下,国际交流对民族医学院校的研究生具有重要意义。它如同一扇窗户,帮助研究生开阔视野,了解国际前沿研究动态,并与国际同行开展交流与合作。本导师团队依托广西病原微生物耐药防控科技创新合作基地,积极组织各类国际学术交流活动,邀请国际知名专家学者来校讲学、举办学术讲座和研讨会。例如,每年举办一次国际学术研讨会,邀请全球专家围绕病原微生物耐药防控的研究热点问题展开深入探讨。研究生们在会上聆听了专家的精彩报告,并与他们进行面对面交流,不仅了解了该领域的最新国际研究成果,还拓宽了研究思路,激发了创新灵感。另外,随着国际和国内学术交流活动的加强,导师团队对学术规范和伦理道德教育非常重视,已将学术规范、学术诚信和学术伦理道德教育作为研究生教育的一部分,与论文写作指导共同纳入研究生课程中^[13]。本导师团队对论文投稿实行严格的学术规范管理:投稿国内期刊的论文在投稿前均需通过中国知网和万方数据库查重系统检测,确保复制率符合期刊要求;投稿 SCI 期刊的论文需经过 Turnitin 查重,全文复制率控制在 10% 以内,且单篇引用复制率不得超过 2%;论文图片均通过 Figcheck 查重,确保图片的原创性;实验数据管理,导师每周对学生的实验结果、数据及图片进行检查,并妥善保存实验原始记录,杜绝学术不端行为的发生。通过以上措施,本团队致力于维护学术诚信,确保研究成果的真实性和可靠性。联合培养研究生也是推进国际交流的重要举措。联合培养研究生项目能够促进国际研究生教育一体化合作,受益于教育和研究每个合作伙伴的优势和减少个别合作伙伴缺点的不良影响^[14]。该导师团队中大部分成员是马来西亚玛莎大学、泰国清迈大学的兼职导师,目前已选派 3 名优秀博士研究生参与联合培养。此外,团队还鼓励研究生积极参与科技部资助的“广西边疆少数民族地区耐药微生物防控技术国际培训”活动。通过这些国际交流活动,研究生结识了来自不同国家的同学和学者,与他们深入交流,拓宽了国际视野。同时,这些活动帮助研究生接轨国际前沿,提升学术水平和国际竞争力,为该导师团队的国际化发展贡献力量。

4 小结

在本团队的导师引领和多元培养模式下,研究生得到了全面发展和显著提升,取得了丰硕的科研成果,为右江民族医学院研究生的成长开辟了广阔前景,注入了强劲动力。展望未来,本导师团队将继续坚持并优化现有培养模式,进一步深化导师责任制与多元培养机制的融合。导师将在学生的学术发展、职业规划、心理健康等方面发挥更加全面的指导作用;同时,跨学科融合、实践锻炼和国际交流等多元培养方式也将不断创新和完善,为学生提供更加丰富和优质的教育资源。学校将进一步支持该团队,加强与企业和科研机构的合作,建立更多实践基地和联合培养项目,帮助学生在实践中积累经验,在合作中提升能力。团队将继续加强伦理规范教育,倡导合理使用 AI 工具辅助科学研究,加强“技术赋”,避免数据污染、侵犯知识和“工具依赖”^[15]。随着这一模式的不断完善和推广,右江民族医学院将为边疆民族地区培养更多高层次医学人才,研究生将在新时代绽放更加耀眼的光彩,助力学校实现“更大申博”的目标。

参考文献:

[1] 袁媛,王艳霞,徐玉乔,等. 医学研究生病理形态学教学改革探索与实践[J]. 中华全科医学,2024,22(10):1778-1780.

[2] 宋红艳,何静,安哲. 导师在研究生思想政治教育中作用发挥探索[J]. 北京教育(德育),2022(6):50-52.

[3] 王崎,余珮嘉,李耀羲. AI 驱动下多学科融合的创新型人才培养模式构建[J]. 西部素质教育,2025,11(5):80-83.

[4] 杨举泽,陈恩国. 医学研究生对组会制度评价的研究[J]. 基础医学教育,2024,26(10):900-903.

[5] 方针. 导生组会互动:作用机理及激励策略——基于互动仪式链理论的视角[J]. 应用型高等教育研究,2022,7(2):46-50,95.

[6] 汪赫男. “双一流”背景下高校博士研究生创新成果评价体系改革探析[J]. 高等建筑教育,2021,30(3):23-29.

[7] 楼建晴,杨巍,高铃铃,等. “双一流”背景下医学研究生学位授予评价体系创新和探究[J]. 中国高等医学教育,2024(5):1-4.

[8] 董书婷,俞梦飞,干晨露,等. 多学科交叉教育在口腔医学专业研究生培养中的探索与实践[J]. 中国高等医学教育,2024(12):144-145.

[9] 曹轩,付四清. 基于学科交叉的基础医学研究生创新人才培养[J]. 基础医学教育,2022,24(3):213-217.

[10] LI C Y, LIAO L J, YANG S X, et al. Cinnamaldehyde: an effective component of Cinnamomum cassia inhibiting *Helicobacter pylori* [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118222.

[11] 李菁菁,吴怡,陈明慧. 研究生联合培养的实践与思考[J]. 卫生职业教育,2025,43(1):8-11.

[12] 江克清,钟伏弟. 提高学术型临床医学研究生科研创新能力的探索[J]. 科技风,2025(3):95-97.

[13] 周宇霞,石明隽,郭兵. 西部医学院校“学-研-创”研究生培养模式的构建与实践[J]. 基础医学教育,2024,26(5):421-424.

[14] 王文礼. 欧洲大学联合培养博士项目的发展历程、困难和挑战[J]. 集美大学学报(教育科学版),2024,25(5):18-26.

[15] 杨秀木,申正付,熊韵波,等. 人工智能工具对医学硕士研究生科研创新能力的影响研究[J]. 蚌埠医科大学学报,2025,50(1):57-62.

收稿日期:2025-01-17;修回日期:2025-02-22

(本文编辑 覃黎黎)

本文引文格式:陈慧中,周梦春,李媛,等.基于 MBTI 性格分析的术前心理护理干预对初次接受试管婴儿助孕夫妻心理健康及夫妻关系的影响[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):371-374.

【临床护理】

基于 MBTI 性格分析的术前心理护理干预对初次接受试管婴儿助孕夫妻心理健康及夫妻关系的影响

陈慧中,周梦春,李媛,曾海琴

(广西壮族自治区生殖医院,广西 南宁 530000)

摘要:目的 探讨基于 MBTI(Myers-Briggs Type Indicator,MBTI)性格分析的心理护理干预对初次试管婴儿助孕夫妇的抑郁、焦虑及夫妻关系的影响。**方法** 研究选取 2020 年 1 月至 2023 年 6 月在广西壮族自治区生殖中心就诊的首次接受试管婴儿的不孕不育夫妻为研究对象,通过随机数字表法分为对照组和观察组,每组 92 例(46 对)。对照组接受常规心理护理干预,而观察组则基于 MBTI 性格分析结果进行个性化心理护理。**结果** 观察组在心理护理干预后焦虑自评量表(SAS)得分显著低于对照组($P < 0.001$),生活质量评估(SF-36)得分高于对照组($P < 0.001$)。观察组心理护理的效率更高,干预时间较短。**结论** 基于 MBTI 性格分析的个性化心理护理干预对于改善初次试管婴儿助孕夫妇的心理健康和生活质量具有显著效果,为心理护理提供了新的视角和方法,有望在生殖医学领域得到更广泛的应用。

关键词:MBTI 性格分析;心理护理;体外受精;抑郁;焦虑;夫妻关系

中图分类号:R248.9

文献标识码:C

文章编号:1001-5817(2025)02-0371-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.030

不孕不育问题在全球范围内受到广泛关注,它不仅影响个体的生育能力,更对患者及其伴侣的心理健康造成深远影响。研究表明,不孕不育夫妇常伴随着焦虑、抑郁等负面情绪,这些情绪不仅影响其日常生活质量,还可能对辅助生殖技术的成功率产生不利影响^[1]。作为生殖科护士,需要关注并提供心理支持,帮助患者应对情绪困扰,维护其心理健康^[2]。MBTI(Myers-Briggs Type Indicator,MBTI)性格分析在不孕不育患者心理护理中具有重要意义,通过了解患者性格特点,个性化制定护理方案,有助于提高护理效果,缓解患者心理压力^[3]。此前类似研究较少见。本研究旨在探讨基于 MBTI 性格分析的心理护理干预对初次试管婴儿助孕夫妇的抑郁、焦虑及夫妻关系的影响。通过随机对照试验,评估个性化心理护理干预与传统心理护理干预的效果差异,以期为临床心理护理提供新的视角和方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究选取 2020 年 1 月至 2023 年 6 月在广西壮族自治区生殖医院就诊的首次接受试管婴儿助孕的不孕不育夫妻共 92 例(46 对)作为研究对象。选择初次接受试管婴儿助孕的夫妇是因为这一群体面临着独特的心理压力和挑战,他们对治疗过程的

未知可能导致更强烈的情绪反应。此外,初次接受治疗的夫妇在心理护理需求上可能与多次尝试试管婴儿的夫妇有所不同。纳入标准:①年龄 35~45 岁,已婚夫妇,且为初次进行试管婴儿助孕;②需有医学诊断为不孕不育症(1 对配偶未采取避孕措施,有规律性生活至少 12 个月未能获得临床妊娠)并符合试管婴儿的指征(如子宫输卵管阻塞、排卵障碍、子宫内膜异位、男方严重少弱精子症、多次促排未孕、人工授精未孕、腹腔镜后未孕等);③参与者需完成 MBTI 性格测试,并根据测试结果纳入不同性格类型的夫妇;④夫妇双方均需在心理评估中表现出一定程度的抑郁或焦虑症状;⑤夫妇双方均需自愿参与研究,并签署知情同意书;⑥能够理解并使用研究所需的语言进行沟通。排除标准:①既往慢性疾病如糖尿病、高血压等;②排除有严重心理疾病史的夫妇,例如精神分裂症、双相情感障碍等;③排除有重大医疗疾病,可能影响研究结果的夫妇;④排除正在使用可能影响心理状态的药物的夫妇。对于符合上述标准的夫妇共 196 例,发放调查问卷,其中共回收 184 份,有效回收率为 93.88%。上述患者按随机数字表法分为对照组与观察组,每组 92 例(46 对夫妻)。本研究取得广西壮族自治区生殖中心伦理委员会审核通过(伦理批准号:KY-LW-2024-07)。

1.2 方法

1.2.1 对照组 生殖科护理心理护理干预措施为:①定期组织不孕症知识讲座,向患者提供详细的疾病信息。由资深护理人员(副主任护师或高年资主管护师)为患者解答疑问。采用集中宣教或一对一指导,通过视频和手册普及相关知识。②通过交流了解患者的生活习惯和饮食习惯,对不合理之处给予及时指导和纠正。③根据患者对疾病的认知,实施个性化情绪疏导,如想象疗法、音乐疗法、肌肉放松等。通过心理疏导,帮助患者缓解紧张、恐慌、自卑和烦躁等负面情绪,增强治疗信心和配合度。心理干预的时间点为:建档日、促排卵用药日、定取卵手术日、取卵手术日、移植胚胎手术日。

1.2.2 观察组 本研究观察组由广西壮族自治区生殖医院心理护理科的 3 名经心理咨询培训的护理人员和 5 名注册护士执行,他们都经过 MBTI 评估培训。观察组通过 MBTI 测试为每位参与者定制心理护理计划,提供情绪支持和压力管理等服务。科室护士长监督项目实施,定期评估效果并调整计划。每次心理护理需夫妻共同参与并以妻子为主。同时,团队收集数据以评估干预效果,为未来研究提供数据支持。心理干预的时间点与对照组相同。

观察组的个性化心理护理基于 MBTI 的结果来实施。以下是实现个性化心理护理的具体步骤:(1)性格评估:首先,建档日每位参与者(夫、妻)都各自独立通过网络 MBTI 问卷进行性格评估,以确定其在 4 个维度上的偏好:外倾(E)与内倾(I)、感觉(S)与直觉(N)、思维(T)与情感(F)、判断(J)与知觉(P)。得到 MBTI 分型后记录在建档病历上。(2)护理计划制定:根据 MBTI 结果,心理护理团队会与每位参与者制定个性化的心理护理计划。①外倾型(E)个体安排更多的社交互动和团体支持,比如建立病友群、安排团建活动等。②内倾型(I)个体应尽可能安排一对一的对话咨询,保证安静的环境、私密空间。可多提供书面、音频、视频资源。尊重他们的个人界限,在护理过程中让他们有更多的选择权和控制感,允许他们根据自己的节奏和舒适度安排治疗和咨询时间。给予他们足够的时间来表达自己的想法和感受。③感觉型(S)个体需要交代详细的治疗步骤和明确的指导,侧重提供具体信息并强调实用性,展示实际的成功案例,让他们看到治疗的实际效果。鼓励他们记录自己的感受和进展,并提供定期的反馈和调整建议。日程安排上更为稳定和一致,减少不确定性。④直觉型(N)个体则侧重提供概念框架,通过讨论治疗的长远目标和个人成长的可能性来激发他们的内在动机。沟通中多使用隐喻和类比,鼓励其自我反思并对他们的创新想法持开放态度。

日程安排上更为灵活。⑤思维型(T)个体需要清晰地解释治疗方案的科学依据,提供结构化的信息和清晰的治疗流程图,必要时提供权威研究数据和结果并允许他们在充分了解信息后自行做出选择。鼓励他们提出问题,并提供系统性的问题解决方法。⑥情感型(F)个体则提供更多的情感支持和同理心。对他们的情感体验表示理解和支持,多多倾听、肯定和鼓励。鼓励他们表达自己的情感,无论是喜悦、担忧还是恐惧,促进他们与其他患者或支持团体的联系,以获得情感共鸣。提供有关情感管理的教育资源,如压力管理技巧和情绪调节方法。⑦判断型(J)个体侧重明确的治疗计划,维持一个有序和可预测的护理流程,减少不确定性。强调治疗目标和预期成果,帮助他们专注于实现这些目标并定期的跟进和评估。尊重他们对时间的重视,合理安排咨询和治疗时间,避免不必要的等待。⑧知觉型(P)个体则侧重提供灵活的护理计划,允许根据情况的变化进行调整,避免过度强调计划和细节。创造一个较为宽松和非结构化的环境,让他们感到自在。鼓励他们表达自己的想法和感受,即使这些想法可能随时改变。帮助他们理解和接受治疗过程中的不确定性和变化。(3)以上这些心理护理措施是根据个体的 MBTI 分型进行决定,如个体的 MBTI 分型为 ENFJ,则采用上述①、④、⑥、⑦的方式,个体的 MBTI 分型为 INTP,则采用上述②、④、⑤、⑧的方式在对患者宣教的医疗护理内容与对照组大同小异,重点是在宣教方式方法上,包括情绪支持、压力管理、沟通互信等在内的心理护理服务技巧。通过采用这些让个体更容易接受的方式,增加个体对诊疗过程的了解,降低个体的焦虑、抑郁等负面情绪,建立信任,提高护理的工作效率与效果。在干预过程中,团队将定期评估每位参与者的心理状态变化,并根据反馈调整护理计划,以确保护理措施的有效性和适应性。所有个性化心理护理的实施过程都将被记录,包括参与者的反馈和护理效果,以便进一步优化护理服务。

1.3 观测指标

1.3.1 心理健康状况评估 采用抑郁自评量表(Self-Rating Depression Scale, SDS)和焦虑自评量表(Self-Rating Anxiety Scale, SAS)进行评分,以量化受试者的抑郁与焦虑水平。SDS 和 SAS 量表均已被广泛验证,具有高内部一致性信度(Cronbach's $\alpha > 0.8$)和良好的效度^[4-5]。SDS 量表的临界值为 53 分, SAS 量表的临界值为 50 分,量表分值的升高与抑郁和焦虑症状的严重程度呈正相关。

1.3.2 生活质量评估 生活质量的评估采用简易生活量表(Short Form-36 Health Survey, SF-36),该量表已被证实具有良好的信度和效度^[6]。该量表涵盖情

感功能、心理健康、生理功能和社会功能等多个维度，其得分与生活质量的整体水平呈正相关^[7]。

1.3.3 护理服务满意度评价 护理服务满意度通过问卷调查获得，共计 10 个项目，包括：个性化服务的评价、互动性评价、隐私性评价、情绪价值、诊疗时间、医疗内容接受度评价等。分为“非常满意”“较为满意”及“不满意”3 个等级。总得分为 0~10 分。满意度的计算公式为：非常满意+较为满意均计 1 分。上述量表调查包括受试者基本情况，由本研究团队中的成员负责实施。调查对象为参与本研究的不孕不育夫妇，他们在团队成员的指导下独立完成量表填写。所有调查人员均接受了标准化的培训，以确保数据收集的一致

性和准确性。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析。计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示，采用 t 检验；计数数据以例(%)表示，采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者基本情况 对照组与观察组均为 46 对夫妻，年龄按性别分开计算(每组丈夫 46 例、妻子 46 例)，其他如文化程度、月收入、婚姻持续时间、确诊不孕时间则按个人(每组 92 例)计算。数据见表 1。对照组与观察组在夫妻年龄、文化程度、月收入、婚姻持续时间、确诊不孕时间差异无统计学意义。

表 1 两组受试者基本情况

组别	丈夫 年龄/岁	妻子 年龄/岁	文化程度 (大专以上)	月收入 (5000 元以上)	婚姻持 续时间/年	确诊不 孕时间/年
对照组	40.11±5.82	38.07±3.17	38(41.30)	41(44.57)	3.41±1.12	1.30±0.23
观察组	40.85±6.15	37.72±2.93	40(43.48)	44(47.83)	3.22±0.99	1.27±0.22
t/χ^2	-0.592	0.547	0.089	0.197	1.225	0.995
P	0.555	0.586	0.765	0.416	0.657	0.321

注：表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示；计数资料数据用[$n(\%)$]表示。

2.2 患者焦虑、抑郁、生活质量评估在心理护理干预后对比结果 由表 2 可知，对照组 SAS 明显高于观察组，两组比较差异有统计学意义($P<0.001$)；观察组情感功能、心理健康、生理功能及社会功能明显高于对照组，两组比较差异有统计学意义($P<0.001$)；但是两组 SDS 差异无统计学意义。对照组心理干预时间

(9.71±1.73) h，观察组(6.78±1.38) h，两组差异有统计学意义($t=12.686$ ， $P<0.001$)，观察组心理护理的效率更高。护理服务满意度(满分 10 分)对照组(9.20±0.74)分，观察组(9.10±0.70)分，差异无统计学意义($t=0.920$ ， $P=0.359$)。

表 2 两组患者焦虑、抑郁指数、生活质量评估(SF-36)在心理护理干预后对比结果

组别	n	SDS	SAS	情感功能	心理健康	生理功能	社会功能
对照组	92	42.34±1.92	42.39±1.74	78.53±2.41	75.71±3.76	85.12±2.73	78.24±4.05
观察组	92	42.73±1.95	37.52±2.19	82.71±2.07	87.92±3.26	90.02±2.73	81.15±4.35
t		-1.372	16.688	-12.591	-23.559	-12.191	-4.697
P		0.172	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

3 讨论

3.1 MBTI 性格分析在心理护理中的应用价值 MBTI 性格分析不仅为心理护理提供了个性化的依据，通过本研究进一步证实了其在提升护理效果和患者满意度方面的实际应用价值。通过将 MBTI 性格分析结果与心理护理实践相结合，本研究团队成员能够更深入地理解患者的心理需求，从而设计出更有效的干预措施。例如，外倾型个体可能更受益于团体支持和社交互动，而内倾型个体则可能更偏好一对一的咨询和安静的环境。这种针对性地干预可能有助于提高

干预的效果和患者的接受度^[8]。

3.2 心理干预对抑郁、焦虑、家庭生活质量的影 响 本研究结果显示，观察组在接受基于 MBTI 性格类型的个性化心理护理干预后，SAS 得分显著低于对照组，这表明个性化的心理护理干预对于缓解试管婴儿助孕夫妇的抑郁和焦虑情绪具有积极作用。这一发现与现有文献相符，强调了心理干预在辅助生殖技术过程中的重要性^[9-11]。观察组在简易生活量表(SF-36)上的得分高于对照组，反映出心理干预不仅改善了患者的心理健康状况，也提升了他们的生活质量。这一结果

提示,在接受试管婴儿心理健康状况与生活质量密切相关,心理干预可能是提高生活质量的有效途径。进一步分析,本研究结果强调了心理健康状况与生活质量之间的密切联系。在试管婴儿助孕前,抑郁和焦虑情绪的缓解可能对提升患者的生活质量具有重要影响。这一发现对于临床实践具有重要意义,因为它提示医疗专业人员在辅助生殖技术治疗中应重视心理干预的整合,以全面提高患者的治疗效果和生活满意度。此外,本研究的结果也为未来的研究方向提供了启示。未来的研究可以进一步探讨不同性格特征对心理干预反应的差异性,以及如何根据个体差异设计更为精准的心理干预方案。同时,长期跟踪研究将有助于了解心理干预的持久效果,以及其对辅助生殖技术成功率的潜在影响。

3.3 心理干预效率 对初次接受试管婴儿治疗的不孕不育夫妇进行了 MBTI 性格分析,并根据结果实施了个性化的心理护理干预。基线数据显示,各性格类型的夫妇在抑郁、焦虑和夫妻关系指数上存在一定差异。观察组心理干预的时长较短,效率更高,通过快速识别患者的性格特征和偏好,护理人员能够制定更加个性化的干预策略和优化沟通方式,从而提高患者的接受度和参与度。MBTI 分析有助于预测患者的需求和可能的反应,减少心理抵抗,促进患者的自我认知,并优化资源分配。这种方法不仅能够缩短建立信任关系的时间,还能帮助护理团队更好地协作,快速调整干预方法。这一发现强调了在心理护理中应用性格分析工具的实用性和效率^[12-13]。

3.4 研究的局限性与未来方向 本研究虽然取得了积极的结果,但也存在一些局限性,如样本量相对较小,未能细化 MBTI 性格类型,限制了对不同性格特征影响的全面分析。未来的研究应扩大样本量,并进一步细化不同性格类型对心理干预反应的差异性。此外,未来的研究可以探索长期跟踪的效果,以及不同文化背景下 MBTI 性格分析在心理护理中的应用。

3.5 夫妻双方感受差异的讨论 尽管丈夫和妻子可能对试管婴儿治疗的感受存在差异,本研究的目的是比较基于 MBTI 性格分析的心理护理干预对夫妻双方抑郁、焦虑及夫妻关系的影响。在研究设计中,本研究确保夫妻双方都完成了 MBTI 性格测试,并在分析结果时考虑了性格类型对感受和反应的影响。分析结果显示,尽管存在个体差异,但基于 MBTI 的个性化心理护理干预对夫妻双方均显示出积极的效果,这表明本研究的干预措施能够有效地应对不同性格类型的夫

妇。未来的研究可以进一步探讨夫妻双方 in 心理护理干预后的反应差异,以及这些差异对研究结果的可比性有何影响。

总之,基于 MBTI 性格分析的个性化心理护理干预对于改善试管婴儿治疗前不孕不育夫妇的抑郁、焦虑情绪,提高生活质量和护理服务满意度具有显著效果。这一研究为心理护理提供了新的视角和方法,有望在生殖医学领域得到更广泛的应用。

参考文献:

[1] TUOHY D,KINGSTON L,CAREY E,et al. A scoping review on the psychosocial interventions used in day care service for people living with dementia[J]. PLoS One, 2023,18(12):e0295507.

[2] 廖光华. 综合护理干预对辅助生殖技术治疗的不孕患者焦虑抑郁及妊娠结局的影响[J]. 中国当代医药,2017,24(33):148-150.

[3] ROONEY K L,DOMAR A D. The relationship between stress and infertility[J]. Dialogues Clin Neurosci,2018,20(1):41-47.

[4] ZUNG W W. A self-rating depression scale[J]. Arch Gen Psychiatry,1965,12:63-70.

[5] BECK A T,EPSTEIN N,BROWN G,et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties [J]. J Consult Clin Psychol,1988,56(6):893-897.

[6] WARE J E JR,SHERBOURNE C D. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection[J]. Med Care,1992,30(6):473-483.

[7] 李业. PCOSAct 项目患者 PCOSQ 和 SF-36 量表的评估 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2018.

[8] 李霞. 基于 MBTI 的医学生医患沟通能力个性化培养措施探讨[J]. 教育理论与实践,2020,40(21):45-47.

[9] 郭阳春,杨晓萍,张军. 心理护理干预对高龄不孕患者的影响[J]. 广东医学,2015,36(12):1956-1958.

[10] 王小蝉,杨怀亮. 心理护理在不孕症患者中的应用[J]. 妇女儿童健康导刊,2023,2(23):179-181.

[11] 连雪. 不孕不育患者的心理状态分析及针对性护理干预 [J]. 中国医药指南,2022,20(22):178-180.

[12] 王莉莉,伍焱,杜艳鸣,等. 性格色彩罗盘在乳腺癌患者沟通中的应用[J]. 中华护理杂志,2019,54(11):1653-1658.

[13] KOUMPAROU M,BAKAS P,PANTOS K,et al. Stress management and In Vitro Fertilization (IVF): a pilot randomized controlled trial [J]. Psychiatriki, 2021, 32(4):290-299.

收稿日期:2024-10-21;修回日期:2024-12-15
(本文编辑 覃洪含)