

基因表达存在显著负相关<sup>[13]</sup>。国外研究证明, hMLH1 可以直接与 c-myc 结合, c-myc 可以受 Survivin 的调控<sup>[14-15]</sup>, 可能是 hMLH1 与 Survivin 相关的直接证据。以上研究与本实验结论一致。本实验结果显示, 单基因组 (Survivin shRNA 与 APC) 及双基因组中 hMLH1 和 hMSH2 蛋白及 mRNA 表达量均升高, 且双基因组中 hMLH1、hMSH2 蛋白及 mRNA 增加更明显。双基因组移植瘤的 IRV 及 IRW 也较单基因组明显增高, 进一步表明双基因组通过上调 hMLH1、hMSH2 表达对裸鼠移植瘤的生长起抑制作用, 并且与单基因组相比, 其对移植瘤的抑制效果更为明显。

综上所述, Survivin shRNA-APC 双基因共表达稳转株可以在核酸和蛋白水平通过沉默 Survivin 的表达来上调对 HT-29 结肠癌细胞中 hMLH1、hMSH2 表达, hMLH1 和 hMSH2 表达可以使错误的 DNA 链被降解和修复, 合成正确的 DNA 链, 可能通过提高结肠细胞 DNA MMR 的能力, 从而防止 DNA 复制错误积累放大, 进一步抑制肿瘤生长, 这为 Survivin shRNA-APC 双基因抑制结肠癌的治疗提供了新思路, hMLH1、hMSH2 有望成为临床治疗的新靶点, 但其具体作用机制尚不明确, 需要进一步探索。本研究仍存在一定的局限性, 如实验方法较单一, 可以继续监测 MSI, 未来还可用基因族谱等方法和技术去探究 Survivin shRNA-APC 双基因下游的相关靶点和具体发生机制。

### 参 考 文 献

[1] 袁禧先, 隋子奇, 孙理婷, 等. 慢病毒介导 Survivin shRNA 与结肠腺瘤癌肉易感基因片段联合对 HT-29 细胞的影响[J]. 世界华人消化

杂志, 2015, 23(14): 2250-2255.

- [2] 袁禧先, 段厚羽, 曹锋, 等. Survivin shRNA 和 APC 片段双基因的载体构建及其在 HT-29 细胞的表达[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(4): 369-374.
- [3] 袁禧先, 温超, 曹雅, 等. Survivin shRNA-APC 双基因共表达慢病毒载体对 HT-29 结肠癌细胞裸鼠皮下移植瘤生长情况的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(6): 584-590.
- [4] 袁禧先, 王凤荣, 袁晓岚, 等. Survivin shRNA-APC 双基因对结肠癌线粒体凋亡通路相关因子表达的影响[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(6): 595-601.
- [5] Si W, Kang S, Sun H, et al. Genetic polymorphisms in hMSH2 and hMLH1 genes are associated with prognosis in epithelial ovarian cancer patients[J]. Int J Gynecol Cancer, 2019, 29(7): 1148-1155.
- [6] 李中辉, 董旺, 陈敏, 等. 大黄素下调 ILK/PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌 CACO-2 细胞增殖的机制研究[J]. 今日药学, 2020, 30(2): 116-120.
- [7] 卢俊宇. 雌激素上调错配修复基因 MLH1 抑制结肠癌细胞增殖的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [8] 刘卓, 吴建新. DNA 错配修复系统组成和功能的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(6): 1160-1165.
- [9] 彭芳, 王志, 王建, 等. 结直肠癌错配修复蛋白 MLH1, PMS2, MSH2 和 MSH6 及 P16 的表达及意义[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(4): 617-618.
- [10] Sušac I, Ozretić P, Gregorić M, et al. Polymorphisms in Survivin (BIRC5 Gene) Are Associated with Age of Onset in Breast Cancer Patients[J]. J Oncol, 2019, 2019: 3483192.
- [11] Nørgaard K, Müller C, Christensen N, et al. Loss of mismatch repair signaling impairs the WNT-bone morphogenetic protein crosstalk and the colonic homeostasis[J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12(6): 410-423.
- [12] 袁禧先, 张书娟, 张玉健. Survivin shRNA-APC 双基因对结肠癌裸鼠皮下移植瘤细胞内质网通路中 GRP78、Caspase-12 表达的影响[J]. 临床内科杂志, 2019, 36(6): 415-418.
- [13] 聂慧玲, 温瑶, 周晶珠, 等. hMLH1 在肺癌中表达及其与 Survivin 的相关性研究[J]. 实用肿瘤学杂志, 2011, 25(1): 57-61.
- [14] Adamkov M, Furjelová M, Horáček J, et al. Relationship of mismatch repair proteins and survivin in colon polyps and carcinomas[J]. Acta Histochemica, 2014, 116(6): 1007-1014.
- [15] Castrilli G, Piantelli M, Artese L, et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in ameloblastoma[J]. J Oral Pathol Med, 2001, 30(5): 305-308.

(收稿日期: 2020-01-10)

(本文编辑: 张一冰)



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.09.013

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.09.013

## · 论著摘要 ·

# 涎液化糖链蛋白-6 在慢性阻塞性肺疾病患者血清中的表达及其与疾病严重程度的关系

陈实 李承红

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 涎液化糖链蛋白-6; 炎症介质

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种慢性非特异性炎症性疾病, 反复炎症刺激和氧化应激反应可导致肺损伤<sup>[1]</sup>, 目前认为

有多种炎症介质参与 COPD 气道炎症发生发展的过程, 这些炎症因子破坏肺的结构并促进炎症反应和免疫应答, 最终引起肺泡壁破坏, 甚至导致肺纤维化。涎液化糖链蛋白 (KL)-6 主要表达于 II 型肺泡上皮细胞, 当肺泡上皮损伤时, II 型肺泡上皮细胞增生, KL-6 水平增加, 故认为该指标可能是一种可衡量肺组织损伤的特异性炎症介质。本研究通过检测 COPD 患者血清

基金项目: 武汉市卫生和计划生育委员会医学科研项目 (WX17D39)

作者单位: 430015 武汉, 江汉大学附属医院 武汉市第六医院呼吸与危重症医学科

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

KL-6 水平,探讨其与 COPD 相关的气道炎症指标及病情严重程度之间的关系,进一步了解其参与 COPD 发病的可能机制。

### 对象与方法

1. 对象:随机纳入 2017 年 4 月~2018 年 9 月于我院确诊为 COPD 的患者 200 例,其中急性加重期患者 100 例(急性加重期组),稳定期患者 100 例(稳定期组),另随机选择同期于我院体检的健康体检者 80 例作为对照组。其中急性加重期组男 54 例,女 46 例,年龄 53~72 岁,平均年龄(60.85±6.39)岁,病程 5.21~10.80 年,平均病程(8.93±0.97)年;稳定期组男 48 例,女 52 例,年龄 54~76 岁,平均年龄(61.16±6.51)岁,病程 3.73~12.42 年,平均病程(9.12±1.19)年;对照组男 40 例,女 40 例,年龄 50~71 岁,平均年龄(60.92±6.43)岁,3 组受试者性别、年龄比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),急性加重期组和稳定期组患者病程比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。纳入标准:所有 COPD 患者均符合中华医学会呼吸病学分会《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)》中关于 COPD 的诊断标准<sup>[1]</sup>。排除标准:(1)合并肺部感染、间质性肺病、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺结核、糖尿病、血管性疾病、结缔组织疾病、肿瘤、精神疾病;(2)近期全身使用皮质类固醇、性激素等药物。根据第 1 秒用力呼气容积( $FEV_1$ )占预测值的百分比( $FEV_1\%$  pred)进行 COPD 全球倡议(GOLD)分级,其中 GOLD 1 级( $FEV_1\%$  pred  $\geq 80\%$ )42 例、GOLD 2 级( $50\% \leq FEV_1\%$  pred  $\leq 79\%$ )74 例、GOLD 3 级( $30\% \leq FEV_1\%$  pred  $\leq 49\%$ )62 例、GOLD 4 级( $FEV_1\%$  pred  $< 30\%$ )22 例。本研究通过我院医学伦理委员会审核批准,所有患者均知情同意。

### 2. 方法

(1)COPD 评估测试(CAT)评分:急性加重期患者于入院当天进行 CAT 评分,稳定期组患者于门诊就诊时进行 CAT 评分。由课题组专人采用 CAT 问卷进行评估。CAT 评分为 COPD 综合性评分,CAT 问卷共包括 8 个问题,通过评估咳嗽、咳痰、胸闷、睡眠、精力、情绪及活动能力观察 COPD 对患者的影响,患者根据自身情况对每个问题作出相应评分(0~5 分),总分为 0~40 分,0~10 分为轻微影响,11~20 分为中度影响,21~30 分为严重影响,31~40 分为非常严重影响。

(2)血清 KL-6 和炎症介质水平检测:急性加重期患者于入院第 2 天清晨、稳定期组患者预约时间、对照组受试者于体检时空腹抽血检测血清 KL-6 和炎症介质[白细胞介素(IL)-8、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、内皮素(ET)-1、超氧化物歧化酶(SOD)]水平,均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测。

(3)肺功能检查:3 组受试者均采用德国耶格肺功能测试仪

检测肺功能,记录吸入支气管扩张剂后  $FEV_1\%$  pred、 $FEV_1$ /用力肺活量(FVC)、肺活量(VC)、一氧化碳弥散量( $D_LCO$ ),每位受试者均重复 $\geq 3$ 次,选用图形及数据最好的 1 次作为最终结果,以减少数据误差,提高准确性。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 和 S-N-K 检验;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。相关分析采用 Spearman 相关分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 急性加重期组、稳定期组及对照组受试者血清 KL-6 和炎症介质水平比较:3 组受试者血清 KL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、ET-1 及 SOD 水平比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),而 3 组受试者血清 IL-6 水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),其中稳定期组和急性加重期组血清 KL-6、IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ 、ET-1 水平均高于对照组,血清 SOD 水平低于对照组,急性加重组血清 KL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、ET-1 水平均高于稳定期组,血清 SOD 水平低于稳定期组( $P<0.05$ ),而急性加重期组和稳定期组血清 IL-6 水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

2. 不同严重程度 COPD 患者血清 KL-6 和炎症介质水平比较:GOLD 1 级组、GOLD 2 级组、GOLD 3 级组、GOLD 4 级组患者血清 KL-6、IL-8、ET-1 及 SOD 水平比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),且随着 GOLD 分级的增加,血清 KL-6、IL-8、ET-1 水平均逐渐升高,血清 SOD 水平逐渐降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而 4 组患者血清 IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),但在 GOLD 1~3 级患者中,随着 GOLD 分级增加,血清 IL-6 水平逐渐升高( $P<0.05$ ),GOLD 3 级组和 GOLD 4 级组血清 IL-6 水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );在 GOLD 2~4 级患者中,随着 GOLD 分级增加,血清 TNF- $\alpha$  水平逐渐升高( $P<0.05$ ),GOLD 1 级组和 GOLD 2 级组血清 TNF- $\alpha$  水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

3. COPD 患者血清 KL-6 水平与其他炎症介质的相关性:Spearman 相关分析结果显示,COPD 患者血清 KL-6 水平与 IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ 、ET-1、SOD 水平均呈正相关( $r=0.81, P<0.001$ ;  $r=0.77, P<0.001$ ;  $r=0.65, P=0.013$ ;  $r=0.45, P=0.019$ ;  $r=0.48, P=0.022$ )。

4. COPD 患者血清 KL-6 水平与肺功能、CAT 评分的相关性:Spearman 相关分析结果显示,COPD 患者血清 KL-6 水平与  $D_LCO$  呈负相关( $r=-0.81, P<0.001$ ),与 CAT 评分呈正相关( $r=0.66, P<0.001$ ),但与  $FEV_1$  ( $r=0.37, P=0.613$ )、FVC

表 1 急性加重期组、稳定期组及对照组受试者血清 KL-6 和炎症介质水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	KL-6 (U/ml)	IL-8 (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	ET-1 (pg/ml)	SOD (ng/ml)
健康对照组	80	201.07±20.37	13.32±6.57	12.59±3.62	221.23±35.61	12.33±3.19	147.21±4.378
稳定期组	100	899.75±77.24 <sup>a</sup>	27.72±8.00 <sup>a</sup>	33.21±6.63 <sup>a</sup>	347.13±21.39 <sup>a</sup>	25.85±9.21 <sup>a</sup>	97.88±8.92 <sup>a</sup>
急性加重组	100	1 801.26±185.36 <sup>ab</sup>	48.33±9.26 <sup>ab</sup>	35.83±8.90 <sup>a</sup>	450.11±21.22 <sup>ab</sup>	40.34±10.63 <sup>ab</sup>	65.24±6.40 <sup>ab</sup>
F 值		287.503	199.270	52.082	229.800	173.700	89.224
P 值		<0.001	<0.001	0.062	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与稳定组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

表 2 不同严重程度 COPD 患者血清 KL-6 和炎症介质水平比较(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	例数	KL-6 ( U/ml )	IL-8 ( ng/ml )	IL-6 ( ng/ml )	TNF- $\alpha$ ( ng/ml )	ET-1 ( pg/ml )	SOD ( ng/ml )
GOLD 1 级组	42	222.19 $\pm$ 28.75	18.92 $\pm$ 7.09	16.98 $\pm$ 5.07	232.56 $\pm$ 42.21	19.44 $\pm$ 6.24	104.77 $\pm$ 5.67
GOLD 2 级组	74	301.77 $\pm$ 31.37 <sup>a</sup>	23.03 $\pm$ 8.75 <sup>a</sup>	22.99 $\pm$ 5.62 <sup>a</sup>	267.38 $\pm$ 40.62	23.31 $\pm$ 5.22 <sup>a</sup>	84.52 $\pm$ 8.20 <sup>a</sup>
GOLD 3 级组	62	822.25 $\pm$ 65.75 <sup>ab</sup>	30.27 $\pm$ 9.55 <sup>ab</sup>	33.31 $\pm$ 7.92 <sup>ab</sup>	367.20 $\pm$ 30.42 <sup>ab</sup>	30.75 $\pm$ 9.98 <sup>ab</sup>	74.11 $\pm$ 7.48 <sup>ab</sup>
GOLD 4 级组	22	1 643.86 $\pm$ 136.66 <sup>abc</sup>	33.29 $\pm$ 7.36 <sup>abc</sup>	34.10 $\pm$ 9.90 <sup>ab</sup>	462.22 $\pm$ 19.12 <sup>abc</sup>	38.80 $\pm$ 9.36 <sup>abc</sup>	55.75 $\pm$ 8.38 <sup>abc</sup>
F 值		312.450	202.373	59.263	62.380	190.450	145.292
P 值		<0.001	0.038	0.074	0.069	0.031	0.027

注:与 GOLD 1 级组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 GOLD 2 级组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 GOLD 3 级组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

( $r = 0.25, P = 0.881$ ) 及  $FEV_1/FVC$  ( $r = 0.31, P = 0.734$ ) 均无相关性。

讨 论

我国最新的 COPD 流行病学研究结果显示,COPD 的患病率高达 8.6%,且随年龄增高,患病率越高,全国总患病人数为 9 990 万<sup>[2]</sup>。目前认为有多种炎症因子参与 COPD 气道炎症的发生发展,已经证实的包括 IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[3]</sup>。本研究结果显示,COPD 患者血清 IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$  水平明显高于健康对照者。同时也有研究发现上述炎症因子可破坏肺组织结构,使 COPD 患者气道黏膜中大量炎症细胞特别是中性粒细胞聚集、浸润,促进炎症反应和免疫应答,使肺脏反复出现损伤修复,最终引起肺泡壁的破坏和肺纤维化<sup>[4]</sup>。与此同时,存在于炎症反应各个靶点的氧化应激反应又通过氧化物导致肺损伤。有研究表明,SOD 通过催化氧自由基歧化生成过氧化氢,清除氧自由基,SOD 活力高低一定程度上可反映 COPD 患者的抗氧化能力<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,COPD 患者血清 SOD 水平明显降低,且与病情严重程度有关。当氧化应激和炎症反应等多种病理因素作用于肺脏时,内皮细胞产生急性应激,ET-1 分泌增多,引起血管增生、重塑、舒缩功能障碍,导致内皮细胞损伤,从而增加肺泡毛细血管壁的渗透性<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,COPD 患者血清 ET-1 水平明显升高,且随着病情加重而逐渐升高。

KL-6 是 Kohno 等<sup>[7]</sup>于 1985 年研究肺腺癌时发现的大分子糖蛋白,主要表达于 II 型肺泡上皮细胞和支气管腺浆液细胞,部分表达于支气管上皮细胞,肺泡 I 型上皮细胞则不表达。COPD 患者由于炎症反应和氧化应激导致肺组织细胞损伤破坏后,II 型肺泡上皮细胞代偿性再生,肺泡内液中 KL-6 表达水平明显增加,并从肺泡渗漏到血液,使外周血中可检测到 KL-6<sup>[8]</sup>。既往研究已证实 KL-6 可作为肺损伤的血清学指标,用于监测肺纤维化的活动<sup>[9]</sup>及早期发现特发性肺纤维化的病情变化<sup>[10]</sup>。另有研究证实,KL-6 可衡量肺泡壁通透性是否增加和肺组织损伤的严重程度<sup>[11]</sup>。免疫组化研究结果提示,KL-6 可作为肺泡上皮细胞破坏的指标<sup>[12]</sup>。日本发布的《特发性间质性肺病的诊断和治疗指南》将肺泡灌洗液中 KL-6 水平升高作为特发性间质性肺病的诊断标准之一<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,稳定期和急性加重期 COPD 患者血清 KL-6 水平均明显高于对照组,且随着病情严重程度加重,血清 KL-6 水平逐渐升高,表明血清 KL-6 对于 COPD 的诊断和预后评估具有较为准确的效果。同时 COPD 患者血清 KL-6 水平与  $D_LCO$  呈负相关,与  $FEV_1$ 、FVC 及  $FEV_1/FVC$  均无相关性,表明 KL-6 主要与肺泡间

质病变引起的弥散功能下降有关。

综上所述,血清 KL-6 水平与 COPD 相关的气道炎症指标之间具有相关性,可能促使并加重 COPD 的发生和发展。血清 KL-6 水平有望成为反映 COPD 患者疾病状态的指标之一,为 COPD 的防治提供新思路 and 理论依据。

参 考 文 献

[1] 何权瀛. 慢性阻塞性肺疾病的早期诊断[J]. 临床内科杂志,2018, 35(11):787-789.

[2] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. Lancet, 2018, 391(10131):1706-1717.

[3] Crul T, Spruijt MA, Gayan-Ramirez G, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients[J]. Eur J Clin Invest, 2007, 37(11):897-904.

[4] Noguera A, Batle S, Miralles C, et al. Enhanced neutrophilic response in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Thorax, 2001, 56(6):432-437.

[5] Stanojkovic I, Kotur-Stevuljjevic J, Milenkovic B, et al. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation[J]. Respir Med, 2011, 105 Suppl 1:S31-S37.

[6] 张军营, 凌敏. 重叠综合征患者炎症因子与细胞免疫的关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 10(9):973-975.

[7] Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, et al. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma[J]. Jpn J Clin Oncol, 1988, 18(3):203-216.

[8] Kohno N, Awaya Y, Oyama T, et al. KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease[J]. Am Rev Respir Dis, 1993, 148(3):637-642.

[9] Fathi M, Barbasso Helmers S, Lundberg IE. KL-6: a serological biomarker for interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis[J]. J Intern Med, 2012, 271(6):589-597.

[10] Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, et al. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 Pt 1):1680-1684.

[11] Bonella F, Volpe A, Caramaschi P, et al. Surfactant protein D and KL-6 serum levels in systemic sclerosis: correlation with lung and systemic involvement[J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2011, 28(1):27-33.

[12] Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases[J]. Respirology, 2002, 7(1):15-21.

[13] 日本呼吸学会弥漫性肺疾患的诊断·治疗指南编制委员会. 特发性间质性肺病诊断和治疗手册[J]. 日本呼吸器学会杂志, 2011, 43(6):179-207.

(收稿日期:2020-01-17)  
(本文编辑:周三凤)