

in、N-cadherin 蛋白表达

用预冷的 PBS 洗涤各组 786-0 细胞 1 次,于冰上加入细胞裂解液提取细胞总蛋白。取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,设置电压为 100 V、电泳 100 mA。用湿式转膜装置将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,电流设置 30 mA。室温下,用封闭缓冲液孵育 5 h;然后用 E-cadherin (1 : 10 000)、N-cadherin (1 : 5 000)、GAPDH (1 : 2 500)一抗溶液孵育 PVDF 膜 2 h;随后用二抗溶液与 PVDF 膜反应 1 h。用化学发光试剂盒检测 PVDF 膜上的免疫条带,以 Image 软件测得相对灰度值表示目的蛋白表达水平。

1.2.6 RT-qPCR 检测 Linc00462、miR-2355-5p 表达

根据 TRIzol 试剂说明书提取各组 786-0 细胞总 RNA。利用 Prime Script 反转录试剂盒合成 cDNA,再用 SYBR Prime Script RT-qPCR 试剂盒进行 PCR 反应。Linc00462 正向引物 5'-ACT AGG TCC TTC TGG TGT TTT-3',反向引物 5'-GTA AAA CTT GCT GCT GAT G-3'; GAPDH 正向引物 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3',反向引物 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'; miR-2355-5p 正向引物 5'-ATC CCC AGA TAC AAT GGA CAA-3',反向引物 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; U6 正向引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',反向引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算靶基因表达水平。GAPDH 为 Linc00462 的内参,U6 为 miR-2355-5p 的内参。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验

为确定 Linc00462 与 miR-2355-5p 的靶向关系,利用 LipofectamineTM 2000 将 miR-2355-5p mimic 或 miR-NC 分别转染 miR-2355-5p 结合位点的 Linc00462 野生型 (wt-Linc00462) 及突变型 (mut-Linc00462) 荧光素酶报告载体。在转染后 48 h 利用双荧光素酶活性检测试剂盒分析荧光素酶活性。

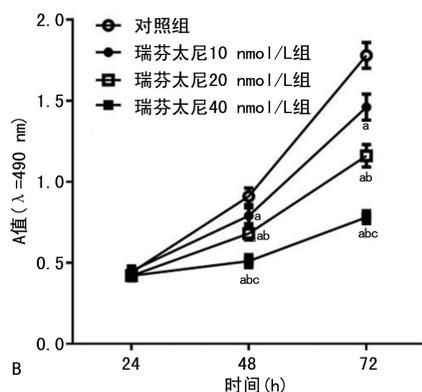
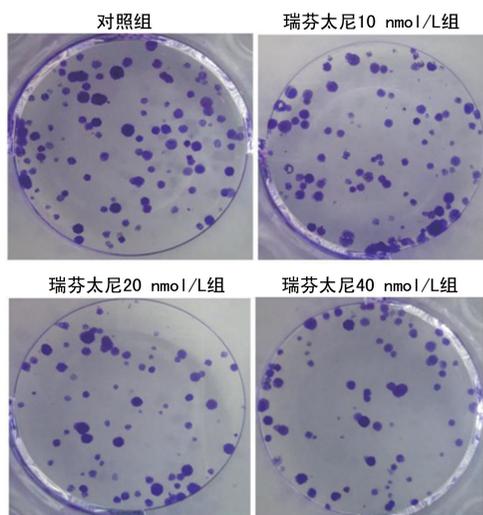
1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间数据比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上组间比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 瑞芬太尼对 786-0 细胞增殖及 Linc00462、miR-2355-5p 表达的影响

与对照组比较,瑞芬太尼 10、20、40 nmol/L 组 786-0 细胞克隆形成数、细胞 A 值 (48 h、72 h)、Linc00462 表达水平显著降低 (*P* < 0.05),miR-2355-5p 表达水平显著增加 (*P* < 0.05)。见图 1 和表 1。



A: 克隆形成实验; B: MTT 实验。^a: *P* < 0.05, 与对照组比较; ^b: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

图 1 瑞芬太尼抑制 786-0 细胞克隆形成和细胞活性

表 1 瑞芬太尼对 786-0 Linc00462、miR-2355-5p 表达水平和细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462	miR-2355-5p	克隆形成数(个)
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	132.67 ± 4.99
瑞芬太尼 10 nmol/L 组	0.78 ± 0.05 ^a	1.67 ± 0.06 ^a	112.33 ± 2.87 ^a
瑞芬太尼 20 nmol/L 组	0.47 ± 0.03 ^{ab}	2.71 ± 0.12 ^{ab}	85.00 ± 2.16 ^{ab}
瑞芬太尼 40 nmol/L 组	0.22 ± 0.01 ^{abc}	3.95 ± 0.15 ^{abc}	61.00 ± 1.63 ^{abc}
<i>F</i>	402.829	491.188	291.166
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

^a: *P* < 0.05, 与对照组比较; ^b: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

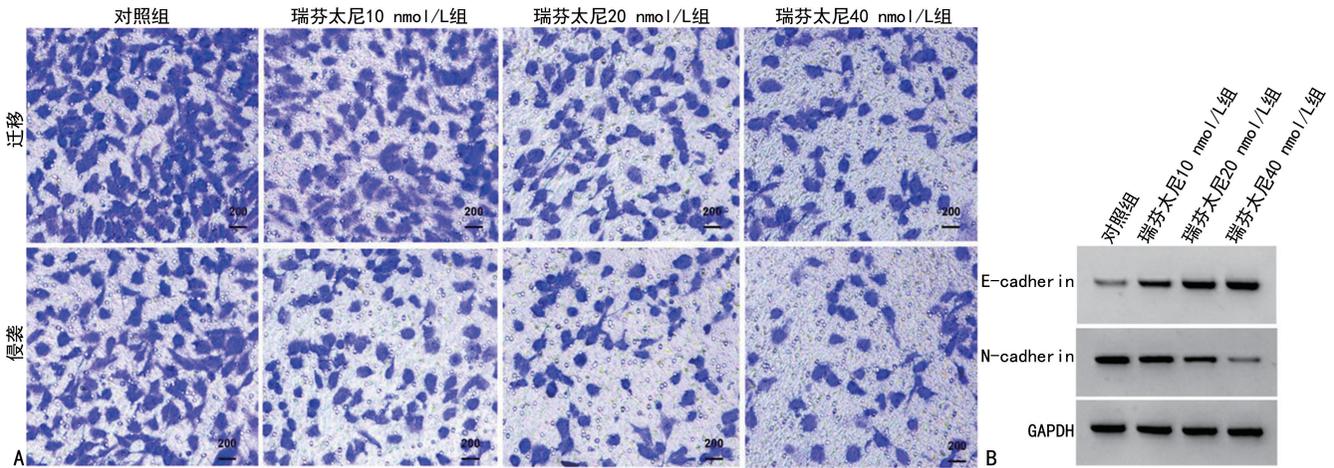
2.2 瑞芬太尼对 786-0 细胞迁移、侵袭的影响

与对照组比较,瑞芬太尼 10、20、40 nmol/L 组 786-0 细胞迁移数、侵袭数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05),E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 (*P* < 0.05)。见图 2 和表 2。

2.3 沉默 Linc00462 对 786-0 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

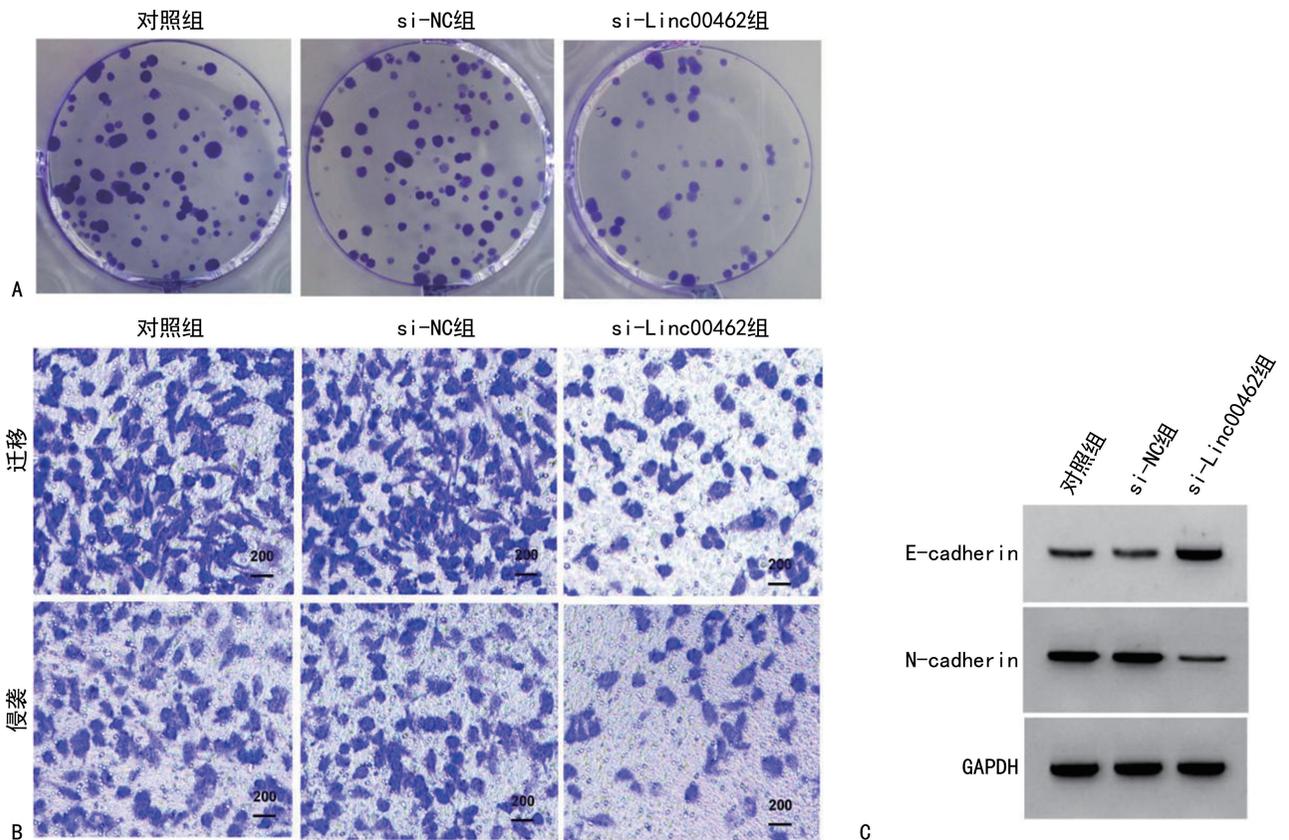
与对照组、si-NC 组比较,si-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05),E-

cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著增加($P<0.05$)。见图 3 和表 3。



A: Transwell 实验; B: Western blot.

图 2 瑞芬太尼抑制 786-0 迁移、侵袭



A: 克隆形成实验; B: Transwell 实验; C: Western blot.

图 3 沉默 Linc00462 抑制 786-0 细胞克隆形成、迁移、侵袭

表 2 瑞芬太尼对 786-0 组迁移、侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	迁移细胞数(n)	侵袭细胞数(n)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	185.67±5.31	135.67±3.86	0.24±0.02	0.79±0.05
瑞芬太尼 10 nmol/L 组	147.00±4.08 ^a	108.00±2.45 ^a	0.46±0.04 ^a	0.52±0.04 ^a
瑞芬太尼 20 nmol/L 组	106.67±3.86 ^{ab}	75.33±1.70 ^{ab}	0.67±0.04 ^{ab}	0.30±0.02 ^{ab}
瑞芬太尼 40 nmol/L 组	72.00±2.94 ^{abc}	43.33±1.25 ^{abc}	0.86±0.05 ^{abc}	0.14±0.01 ^{abc}
F	425.685	757.526	140.639	207.370
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: $P<0.05$, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

2.4 Linc00462 能逆转瑞芬太尼对 786-0 增殖、迁移、侵袭的影响

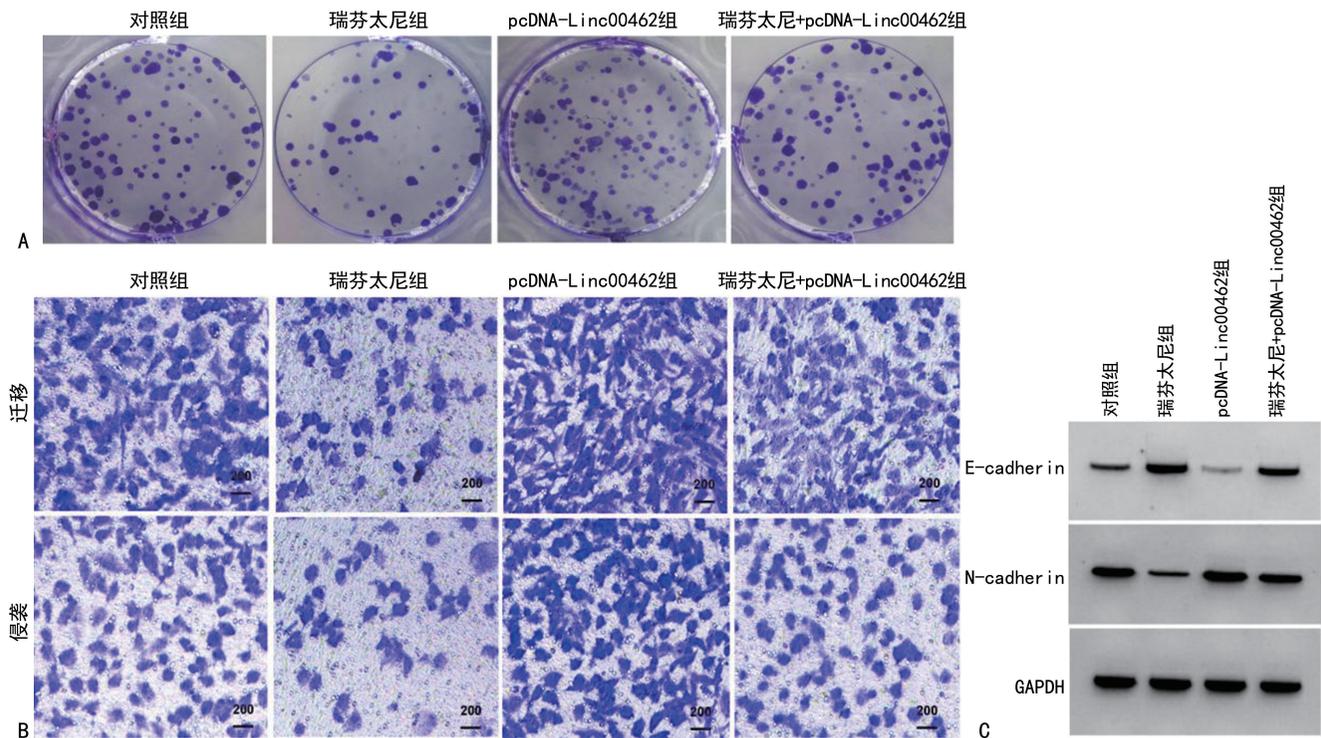
与对照组比较,瑞芬太尼组(40 nmol/L)786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著增加($P < 0.05$);与对照组比较,pcDNA-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭

数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著降低($P < 0.05$);与瑞芬太尼组比较,瑞芬太尼(40 nmol/L) + pcDNA-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 4 和表 4。

表 3 沉默 Linc00462 对 786-0 细胞克隆形成、迁移、侵袭及 Linc00462 及 miR-2355-5p 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462 基因	miR-2355-5p 基因	克隆形成数 (个)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	132.67 ± 6.65	187.33 ± 4.92	134.67 ± 5.44	0.25 ± 0.02	0.80 ± 0.06
si-NC 组	0.98 ± 0.02	1.01 ± 0.02	135.33 ± 7.13	183.67 ± 5.44	136.67 ± 4.11	0.24 ± 0.02	0.79 ± 0.07
si-Linc00462 组	0.13 ± 0.01 ^{ab}	4.73 ± 0.12 ^{ab}	46.00 ± 0.82 ^{ab}	51.33 ± 1.70 ^{ab}	34.33 ± 0.94 ^{ab}	0.94 ± 0.05 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}
F	4 439.400	2 812.642	242.844	953.165	650.598	439.182	193.640
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较。



A: 克隆形成实验; B: Transwell 实验; C: Western blot。

图 4 过表达 Linc00462 逆转瑞芬太尼对 786-0 克隆形成、迁移和侵袭的抑制作用

表 4 过表达 Linc00462 逆转瑞芬太尼对 786-0 克隆形成、迁移、侵袭的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462 基因	miR-2355-5p 基因	克隆形成数 (个)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	133.00 ± 5.89	187.33 ± 4.92	136.67 ± 3.86	0.25 ± 0.02	0.79 ± 0.06
瑞芬太尼组	0.22 ± 0.01 ^a	3.99 ± 0.20 ^a	60.67 ± 1.89 ^a	72.00 ± 4.08 ^a	44.00 ± 1.63 ^a	0.86 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.01 ^a
pcDNA-Linc00462 组	4.69 ± 0.12 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	189.00 ± 7.12 ^a	263.67 ± 6.13 ^a	208.00 ± 3.74 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	1.07 ± 0.08 ^a
瑞芬太尼+pcDNA-Linc00462 组	0.84 ± 0.04 ^b	1.42 ± 0.12 ^b	124.00 ± 5.10 ^b	172.67 ± 4.99 ^b	118.00 ± 2.94 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.04 ^b
F	3 070.677	645.099	288.365	720.959	1 356.043	300.533	155.650
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与瑞芬太尼组比较。

2.5 Linc00462 靶向 miR-2355-5p

Starbase 预测到 miR-2355-5p 是 Linc00462 的潜在靶基因, miR-2355-5p 与 Linc00462 之间的预测结合区域见图 5。进行双荧光素酶报告基因检测, miR-2355-5p mimics 和 wt-Linc00462 共转染后相对荧光素酶活性与 miR-2355-5p mimics 和 mut-Linc00462 共转染比较显著降低($P < 0.05$), 见表 5。

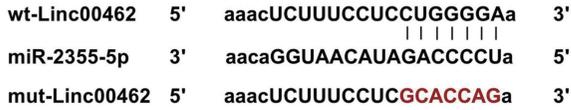


图 5 Starbase 预测 Linc00462 和 miR-2355-5p 的靶向关系

表 5 荧光素酶活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	wt-Linc00462	mut-Linc00462
miR-NC	0.95 ± 0.08	1.01 ± 0.09
miR-2355-5p mimics	0.28 ± 0.03 ^a	1.03 ± 0.12
<i>t</i>	13.582	0.231
<i>P</i>	<0.001	0.829

^a: $P < 0.05$, 与 miR-NC 组比较。

3 讨 论

麻醉是手术治疗的重要组成部分, 但手术过程中麻醉药与癌细胞的接触可能直接影响癌细胞生物学行为, 甚至影响癌症的复发和转移。因此, 探讨麻醉药对 RCC 细胞生物学行为的影响对临床治疗 RCC 意义重大。

瑞芬太尼因其起效快、麻醉苏醒时间短、不良反应发生率低、代谢可预测等优点在临床肿瘤切术中应用广泛^[8]。LU 等^[9]研究发现瑞芬太尼对宫颈癌根治术患者的认知功能、T 淋巴细胞和炎症因子的影响相对较小。唐优仕等^[10]、赵莉等^[11]证实瑞芬太尼在体外能抑制胰腺癌细胞、结肠癌细胞增殖, 并促进其凋亡。孟俊青^[12]研究表明瑞芬太尼以剂量依赖方式诱导肺癌细胞 G₂/M 期周期阻滞和凋亡。可见, 瑞芬太尼对肿瘤细胞生物学行为具有重要影响。本研究以 10、20、40 nmol/L 瑞芬太尼处理 RCC 细胞 786-0, 结果表明 786-0 细胞活力、克隆能力、迁移和侵袭能力均显著下降, 且呈浓度依赖性, 提示瑞芬太尼对 RCC 细胞恶性表型具有抑制作用。E-cadherin 和 N-cadherin 参与细胞上皮间质转化(EMT)调控, N-cadherin 表达水平上调、E-cadherin 表达缺失是肿瘤细胞浸润、转移的重要机制, 通过调控二者的表达情况可有效调节肿瘤细胞迁移和侵袭行为^[13]。本研究中瑞芬太尼处理明显下调 N-cadherin 蛋白表达水平, 上调 E-cadherin 蛋白表达水平, 这与瑞芬太尼的抗迁移、抗侵袭作用相符和。以上研究表明瑞芬太尼对 RCC 细胞恶性生物学行为具有抑制作用。

lncRNA 通过在转录和转录后水平调控基因表达, 在细胞增殖、分化、凋亡和转移中具有关键作用,

与肿瘤发生、转移关系密切。Linc00462 是长度为 1 023 nt 的 lncRNA, 胰腺癌中 Linc00462 表达水平显著上调, 其表达水平与肿瘤大小、肿瘤分化、TNM 分期和远处转移有关, 过表达 Linc00462 显著抑制胰腺癌细胞凋亡和黏附, 促进胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和细胞周期过程^[14]。Linc00462 表达水平与肝癌患者生存相关, Linc00462 和其他 4 个 lncRNA 联合检测是肝癌预后的可靠标志物^[15]。本研究探讨 Linc00462 在 RCC 中的功能, 结果表明转染 si-Linc00462 沉默 Linc00462 表达可明显抑制 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭能力, 抑制 N-cadherin 蛋白表达, 促进 E-cadherin 蛋白表达, 而转染 pcDNA-Linc00462 过表达 Linc00462 则增强 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭能力, 提示 Linc00462 在 RCC 中表现出肿瘤促进功能。同时, 本研究发现瑞芬太尼处理后 786-0 细胞中 Linc00462 表达水平以剂量依赖方式降低, 且瑞芬太尼与沉默 Linc00462 的抗癌效果类似, 提示瑞芬太尼可能通过下调 Linc00462 在 RCC 中发挥抗癌功能。深入研究显示, 过表达 Linc00462 还可明显削弱瑞芬太尼对 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭的抑制作用, 并改变 N-cadherin 和 E-cadherin 蛋白表达水平。

多项研究证实 lncRNA 充当 miRNA 海绵作用是其参与调控肿瘤进展的重要机制, 例如 lncRNA 面生殖发育不良基因 5 反义 RNA1(FGD5-AS1)通过靶向抑制 miR-5590-3p 促进 RCC 细胞增殖、迁移、EMT 和侵袭^[16]。研究表明 miR-2355-5p 在膀胱癌中表达水平减少, 过表达 miR-2355-5p 能够抑制膀胱癌恶性表型^[17]。miR-2355-5p 可作为 lncRNA WD 重复和 FYVE 结构域蛋白 3 反义 RNA2(WDFY3-AS2)的靶基因, 介导 WDFY3-AS2 对食管鳞癌细胞增殖、迁移的促进作用^[18]。此外, lncRNA 受体活性修饰蛋白 2-反义 RNA(RAMP2-AS1)通过下调 miR-2355-5p 表达促进血管生成^[19]。本研究证实 miR-2355-5p 是 Linc00462 的靶基因, 且 miR-2355-5p 的表达受到 Linc00462 的负性调控。瑞芬太尼处理后 miR-2355-5p 表达上调, 这与沉默 Linc00462 上调 miR-2355-5p 表达的作用一致, 提示瑞芬太尼可能通过调控 Linc00462/miR-2355-5p 通路对 RCC 具有抗癌作用。然而, 本研究仍存在不足之处, 如敲低或过表达 miR-2355-5p 对 RCC 细胞生物学行为的影响仍需验证。

综上所述, 本研究首次证实瑞芬太尼对 RCC 细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用, 其机制可能与下调 Linc00462/miR-2355-5p 通路有关, 这些发现为瑞芬太尼在 RCC 治疗中的应用奠定了理论基础, 为 RCC 的基因治疗提供潜在有效靶点。

参考文献

- [1] NOGUCHI G, NAKAIGAWA N, TAGURI M, et al. Time-dependent change in relapse sites of renal cell carcinoma after curative surgery[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(1/2): 69-75.
- [2] DING S, MA H, WANG G, et al. Effect of remifentanyl combined anesthesia on cytokines and oxidative stress in patients undergoing laparoscopic surgery for colon cancer[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(1): 8-11.
- [3] XU J, XU P, LI Z, et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β in glioma cell apoptosis induced by remifentanyl[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(4): 494-506.
- [4] 陈晓军, 沈鑫宁, 陈亮. 瑞芬太尼通过 miR-206/GOLPH3 调控胃癌细胞增殖和凋亡的实验研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(4): 25-34.
- [5] 孙成成, 刘宇, 胡旭明. 瑞芬太尼通过 miR-519d-3p/STAT3 对胃癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(16): 20-26.
- [6] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981.
- [7] GONG J, QI X, ZHANG Y, et al. Long noncoding RNA linc00462 promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(1): 40-47.
- [8] 龙晓静, 周玉娜. 分析瑞芬太尼用于甲状腺切除手术的麻醉效果[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(69): 153-154.
- [9] LU X Y, CHEN M, CHEN D H, et al. Remifentanyl on T lymphocytes, cognitive function and inflammatory cytokines of patients undergoing radical surgery for cervical cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2854-2859.
- [10] 唐优仕, 玉龙, 马浩文, 等. 瑞芬太尼对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *中国热带医学*, 2017, 17(12): 1193-1197.
- [11] 赵莉, 王志红, 李学斌, 等. 瑞芬太尼对人结肠癌 COLO205 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(5): 401-403.
- [12] 孟俊青. 芬太尼和瑞芬太尼对人肺癌细胞 A549 细胞活力的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [13] WANG G, ZHANG Z J, JIAN W G, et al. Novel long noncoding RNA OTUD6B-AS1 indicates poor prognosis and inhibits clear cell renal cell carcinoma proliferation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 15-25.
- [14] ZHOU B, GUO W, SUN C, et al. Linc00462 promotes pancreatic cancer invasiveness through the miR-665/TGFBR1-TGFBR2/SMAD2/3 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 706-716.
- [15] SUN J R, KONG C F, XIAO K M, et al. Integrated analysis of lncRNA-mediated ceRNA network reveals a prognostic signature for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*, 2020, 11(1): 602542-602552.
- [16] YANG Y, DONG M H, HU H M, et al. LncRNA FGD5-AS1/miR-5590-3p axis facilitates the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma through ERK/AKT signalling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17): 8756-8766.
- [17] CHEN D, CHEN J, GAO J, et al. LncRNA DDX11-AS1 promotes bladder cancer occurrence via protecting LAMB3 from downregulation by sponging miR-2355-5p[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(5): 319-328.
- [18] ZHANG Q, GUAN F, FAN T, et al. LncRNA WDFY3-AS2 suppresses proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-2355-5p/SOCS2 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 8206-8220.
- [19] CHENG C, ZHANG Z, CHENG F, et al. Exosomal lncRNA RAMP2-AS1 derived from chondrosarcoma cells promotes angiogenesis through miR-2355-5p/VEGFR2 Axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13(1): 3291-3301.

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1154.014.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1154.014.html(2021-12-16))

普罗布考对脑出血模型小鼠血肿周围脑组织 MST1 和 LATS1 及 YAP 蛋白表达的影响*

董晓柳¹,刘蔚然¹,高 铭¹,司味鑫¹,张秀清¹,宋丽华¹,张 利²,董 伟²

(河北省唐山市人民医院:1.神经康复科;2.神经外科 063000)

[摘要] **目的** 观察普罗布考对脑出血(ICH)小鼠血肿周围脑组织哺乳动物不育系 20 样激酶(MST1)、大肿瘤抑制因子 1(LATS1)及 Yes 相关蛋白-1(YAP)表达的影响,探寻普罗布考发挥脑保护作用的可能机制。**方法** 将 54 只雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为假手术组(sham 组)、ICH 模型组(ICH 组)、ICH 模型+普罗布考治疗组(ICH+PB 组),每组 18 只。采用胶原酶法制作 ICH 模型。ICH+PB 组于造模后 6 h 开始灌胃给药普罗布考($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),sham 组和 ICH 组于相应时间点给予等体积的生理盐水。在 ICH 后 1、3 d 采用神经功能损伤(mNSS)评分对小鼠进行神经功能学评价;在 ICH 后第 3 天,采用伊文思蓝(EB)渗透法检测小鼠脑组织 EB 含量;采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测血肿周围脑组织神经元细胞凋亡情况;采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测血肿周围脑组织 MST1、LATS1 和 YAP 的表达水平。**结果** 与 sham 组比较,ICH 组小鼠脑组织含水量、EB 含量、血肿周围脑组织中神经元细胞凋亡数、磷酸化 MST1(p-MST1)和 p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显升高,mNSS 评分也明显增加($P < 0.05$)。与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠脑组织含水量、EB 含量、血肿周围脑组织中神经元细胞凋亡数及 p-MST1、p-LATS1 和 p-YAP 表达水平明显下降,mNSS 评分也明显降低($P < 0.05$)。**结论** 普罗布考可通过下调 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达,发挥对 ICH 模型小鼠的脑保护作用。

[关键词] 脑出血;普罗布考;哺乳动物不育系 20 样激酶;大肿瘤抑制因子 1;Yes 相关蛋白-1**[中图法分类号]** R743.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1100-06

Effects of probucol on the expression of MST1, LATS1 and YAP protein in brain tissue around hematoma in the model mice with intracerebral hemorrhage*

DONG Xiaoliu¹, LIU Weiran¹, GAO Ming¹, SI Weixin¹, ZHAGN Xiuqing¹,SONG Lihua¹, ZHAGN Li², DONG Wei²

(1. Department of Neurorehabilitation; 2. Department of Neurosurgery,

Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of probucol on the expression of mammalian sterile 20-like kinase 1 (MST1), large tumor suppressor 1 (LATS1) and Yes associated protein (YAP) in the brain tissue around hematoma of the intracerebral hemorrhage (ICH) mice, and to explore the possible mechanism of probucol's brain protection. **Methods** A total of 54 male C57BL/6J mice were randomly divided into the sham operation group (the sham group), the ICH model group (the ICH group) and the ICH model + probucol treatment group (the ICH+PB group) by random number table method, with 18 mice in each group. Collagenase method was used to make the ICH model. The ICH+PB group was given probucol intragastric administration ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) at six hours after modeling, while the sham group and ICH group were given equal volume of normal saline at the corresponding time points. MNSS scores were used to evaluate the neurological function of the mice on the 1st and 3rd day after the ICH. On the 3rd day after the ICH, the Evans Blue (EB) leakage method was used to detect the content of EB in the brain tissue of the mice. Deoxyribonucleotide terminal transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the cell apoptosis in the brain tissue around the hematoma. Western-blot method was used to detect the expression levels of MST1, LATS1

* 基金项目:唐山市人才资助项目(CA202010019);河北省医学科学研究课题计划项目(20211512)。 作者简介:董晓柳(1981-),副主任医师,博士,主要从事脑血管疾病的临床及基础研究。

and YAP in the brain tissue around the hematoma. **Results** Compared with those of the sham group, the water content, EB content, apoptosis number in the brain tissue around hematoma, mNSS score, p-MST1, p-LATS1 and p-YAP protein expression levels in the ICH group significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those of the ICH group, the water content, EB content, apoptosis number in the brain tissue around hematoma, mNSS score, p-MST1, p-LATS1 and p-YAP protein expression levels in the ICH + PB group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Probuco can protect the brain of the ICH model mice by down-regulating the expression levels of p-MST1, p-LATS1 and p-YAP.

[Key words] intracerebral hemorrhage; probuconol; mammalian sterile 20-like kinase 1; large tumor suppressor 1; Yes associated protein

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是指非外伤性脑实质内出血, 临床症状主要表现为脑卒中发作, 出现头痛、呕吐、偏身瘫痪及(或)感觉障碍甚至意识障碍等, 仅有 20% 的患者在 ICH 后 6 个月达到功能独立^[1-2], 是死亡率和致残率较高的疾病。因此, 截至目前 ICH 的防治仍是我国疾病防控的重点。普罗布考不仅具有降脂、抗氧化等作用, 亦具有抗炎、减轻脑水肿、改善认知功能、减轻神经功能障碍等脑保护作用^[3], 但其发挥保护作用的具体机制目前尚不清楚。Hippo 信号通路是首次在果蝇体内被发现^[4], 在组织修复、调控组织器官大小、调节细胞增殖与凋亡等方面具有重要的作用^[5]。哺乳动物不育系 20 样激酶(MST1)是 Hippo 信号通路的核心组件, 大肿瘤抑制因子 1(LATS1)是 Hippo 通路的核心激酶^[6], 其下游分子 Yes 相关蛋白-1(YAP)是 Hippo 通路的主要转录调控激活因子^[7]。有研究报道, 在 ICH 中, 抑制 Hippo 通路可减轻脑损伤^[8]。然而, 普罗布考是否通过 Hippo 通路在 ICH 脑损伤中发挥保护作用目前尚不明确。因此本研究通过观察普罗布考对 MST1 和 LATS1 及 YAP 表达的影响, 为急性期 ICH 临床治疗寻找新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

正常健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号: SCXK(京)2019-0008]。实验动物在华北理工大学屏障环境动物实验室由专人饲养, 饲养条件为通风, 清洁, 自然光线 12 h/12 h 昼夜交替照明, 昼夜室温控制在 20~25 °C, 相对湿度控制在 45%~55%, 分笼饲养, 避免强光及噪音, 给予充足自来水和标准颗粒饲料喂养。动物适应性喂养 7 d 后进行造模, 在实验设计及实际操作过程中尽可能降低实验动物的需要量, 尽量避免实验动物因不合理操作导致死亡, 同时减轻其在实验过程中所承受的痛苦。

1.2 药物与试剂

普罗布考片(齐鲁制药有限公司, 批准文号: 国药准字 H10980054); 兔抗 MST1 抗体、兔抗 p-MST1 抗体、兔抗 p-YAP 抗体、兔抗 YAP 抗体、兔抗 p-LATS1、兔抗 LATS1(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 49332、14946、13008、14074、8654、

3477); 兔抗 Neun 抗体(美国 Abcam 公司, 批号: ab177487); 兔抗 β -肌动蛋白抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗(北京中山金桥, 货号: TA-09、87768); 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒、伊文思蓝(EB)染液(北京索莱宝科技有限公司, 货号: T2190、314-13-6)。

1.3 主要仪器

脑立体定位仪(北京金洋万达科技有限公司); Tissuelyser-192 组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司); 12003153 型凝胶成像仪、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。CM1900 型冰冻切片机(德国 Leica 公司); 免疫荧光显微镜(日本 Nikon 公司); -80 °C 冰箱(海尔公司); 恒温水浴箱(美国 Amersham Biosciences 公司)。

1.4 动物分组及给药方法

采用随机数字表法将实验小鼠分为假手术组(sham 组)、ICH 模型组(ICH 组)、ICH 模型+普罗布考治疗组(ICH+PB 组), 每组 18 只。ICH+PB 组于造模后 6 h 开始灌胃给药普罗布考($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), sham 组和 ICH 组于相应时间点给予等体积的生理盐水。

1.5 模型制备

采用胶原酶法制作小鼠 ICH 模型^[9]。将 0.037 5 U 的细菌胶原酶溶于 0.5 μL 0.9% 生理盐水, 避光放置于冰上备用。造模前 12 h 禁食, 4 h 禁饮, 5% 水合氯醛(0.7 mL/kg)腹腔注射麻醉小鼠, 将其固定在脑立体定位仪上, 沿矢状位作一长 1 cm 的皮肤切口, 前囟为原点, 向前 0.5 mm、向右 2.3 mm 处钻一直径为 1 mm 小圆孔作为注射孔, 将吸入细菌胶原酶溶液的微量注射器固定好, 针头沿注射孔垂直缓慢插入脑实质, 深度约 3.7 mm, 以 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度注入细菌胶原酶溶液, 注射完毕后停针 10 min, 缓慢向上拔针, 每向上拔针 1 mm 停针 5 min, 直至全部拔出^[10]。最后用骨蜡封闭注射孔, 手术线缝合伤口, 碘伏消毒。sham 组除不注射细菌胶原酶溶液外, 其余操作均与 ICH 组一致。根据 BEDERSON 等^[11]的评定方法分为 3 级, 0 级: 没有神经缺失症状; 1 级: 提尾, 瘫痪侧前肢回收屈曲腹下, 健侧前肢向地面伸展; 2 级: 除了有 1 级体征外, 向瘫痪侧推小鼠时手所受到的阻力较对侧明显变小; 3 级: 除以上体征外, 小

鼠行走时向瘫痪侧旋转或倾倒。ICH 后 1 h 对小鼠进行评定。评定达 1、2、3 级判断为造模成功。

1.6 神经功能行为学评价

神经功能评估采用改良的神经功能损伤(mNSS)评分,主要包括感觉、运动、反射及平衡功能^[12]等,分别在 ICH 后第 1、3 天分别进行。0 分无神经功能缺损;1~6 分为轻度神经功能缺损;7~12 分为中度神经功能缺损;13~18 分为重度神经功能缺损。

1.7 脑组织含水量测定

采用经典干湿重法测量各组小鼠脑组织含水量,含水量的多少可以反映脑水肿的严重程度。于 ICH 后第 3 天水肿高峰期时,采用颈椎脱臼法处死小鼠,取新鲜脑组织,自中线将大脑切分为左右两个半球,并分离出小脑组织。电子天平称得 3 部分组织湿重并记录(精确到 0.1 mg)。测完后分别用锡纸包裹好,迅速置于 100 °C 烤箱中,24 h 后再称重,此时称得的重量即为干重。计算脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.8 血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)渗透性测定

采用 EB 作为示踪剂来评估 BBB 渗透性。于 ICH 后第 3 天,尾静脉注射 2% EB(2 mL/kg),注射成功标志:小鼠巩膜、耳廓、手掌、脚掌等部位迅速变为蓝色。注射成功 2 h 后,行心脏灌注后断头取脑,去掉嗅球及小脑,将取得的大脑半球在精度为 0.1 mg 的电子天平上称质量后将脑组织匀浆,并将其加入装有 5 mL 二甲基甲酰胺的试管中,于 60 °C 恒温水浴锅孵育 72 h,离心弃去沉淀,取上清液检测。采用分光光度计于波长 450 nm 的波谱处分析、测定吸光度(A)值,绘制标准曲线,根据以下方程计算脑组织 EB 含量:脑组织中 EB 含量($\mu\text{g/g}$)=EB 浓度×二甲基甲酰胺体积(mL)/湿重(g)。

1.9 神经元细胞凋亡检测方法

采用 TUNEL 法检测神经元细胞凋亡情况。于 ICH 后第 3 天,行心脏灌注取脑,脑组织冰冻切片均采用 0.3% Triton-X100 打孔,3% 牛血清清蛋白(BSA)封闭,PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加神经元标志蛋白 Neun 一抗(1:500),4 °C 过夜,在预先混合好的 TUNEL 反应液中加入荧光二抗,滴加 40 μL 于玻片上,37 °C 湿盒内避光孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,封片,荧光显微镜下观察免疫荧光结果。

1.10 MST1、LATS1、YAP 表达情况检测

采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测血肿周围脑组织 MST1、LATS1 和 YAP 的表达变化。于给药后第 3 天,行心脏灌注取脑,取 200 mg 脑组织,加入 1 mL 预冷的(RIPA)缓冲液及 10 μL 苯甲基磺酰氟(PMSF)裂解组织,组织匀浆仪研磨后,冰上放置 30 min。将匀浆好的脑组织移入离心管中,离心,取上清液。应用蛋白浓度测量仪测定蛋白浓度,将提取的蛋白加入 4×上样缓冲液,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,用 TBST 于摇床上摇洗 3 次,每次 10

min,洗完后将 PVDF 膜放入含有 5% 脱脂奶粉的容器中,常温慢摇 1 h 进行封闭。将膜与一抗(兔抗 MST1 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 p-MST1 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 P-YAP 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 YAP 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 P-LATS1 稀释比例 1:1 000;兔抗 LATS1 稀释比例 1:1 000;兔抗 β -肌动蛋白抗体稀释比例 1:2 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,分别加入二抗(HRP 标记山羊抗兔抗体稀释比例 1:5 000),室温孵育 1 h。使用增强型化学发光(美国 Cell Signaling Technology 公司)试剂使印迹可视化。Bio-rad Quantity One4.4.0 成像仪显影。目的条带采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

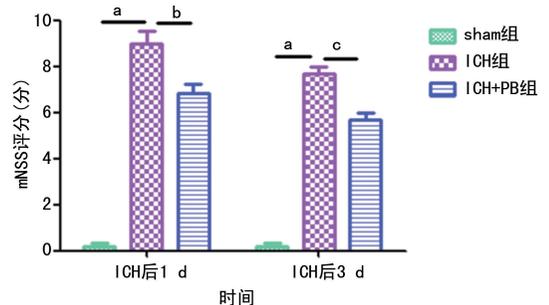
1.11 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分比较

与 sham 组比较,ICH 组小鼠在 ICH 后第 1、3 天 mNSS 评分明显增加($P<0.01$);与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 1、3 天 mNSS 评分明显减低($P<0.05$)。见图 1。

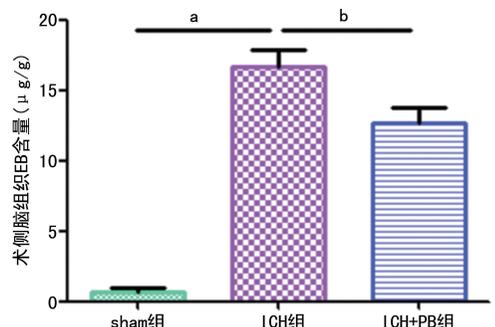


^a: $P<0.01$,与 sham 组比较; ^b: $P<0.05$; ^c: $P<0.01$,与 ICH 组比较。

图 1 小鼠 ICH 后 mNSS 评分比较

2.2 BBB 渗透性测定

与 sham 组比较,ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天 EB 含量明显增加($P<0.01$);与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天 EB 含量明显降低($P<0.05$)。见图 2。



^a: $P<0.01$,与 sham 组比较; ^b: $P<0.05$,与 ICH 组比较。

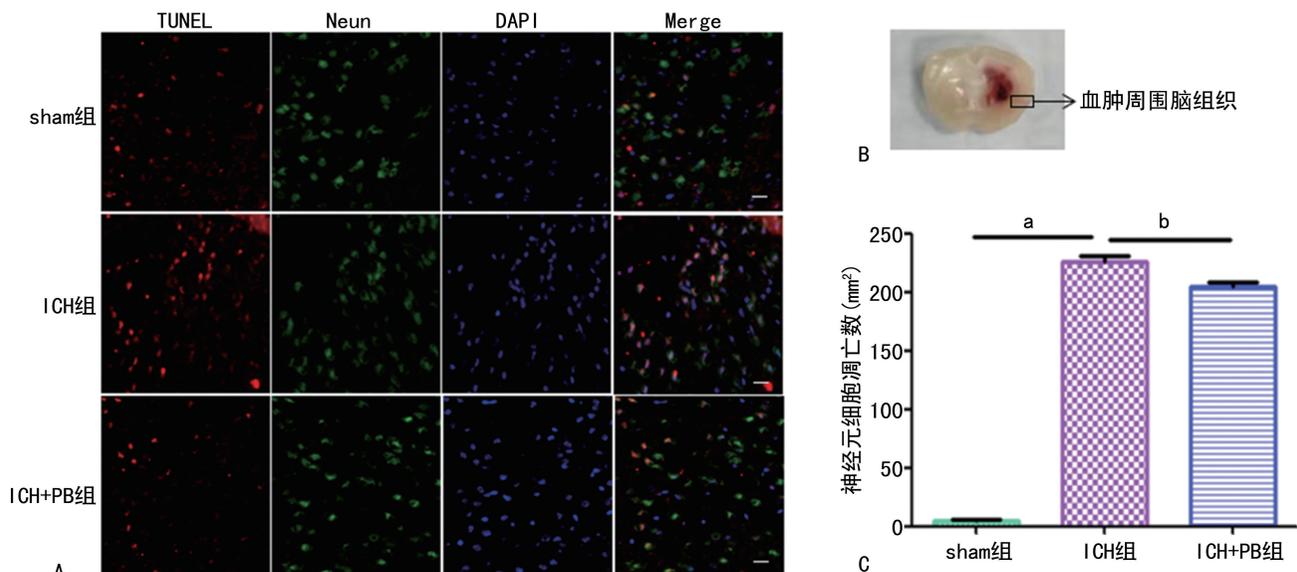
图 2 小鼠 BBB 渗漏测定

2.3 凋亡细胞数检测

与 sham 组比较, ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织神经元细胞数凋亡明显增加 ($P < 0.01$); 与 ICH 组比较, ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织神经元细胞数凋亡明显减少 ($P < 0.05$)。见图 3。

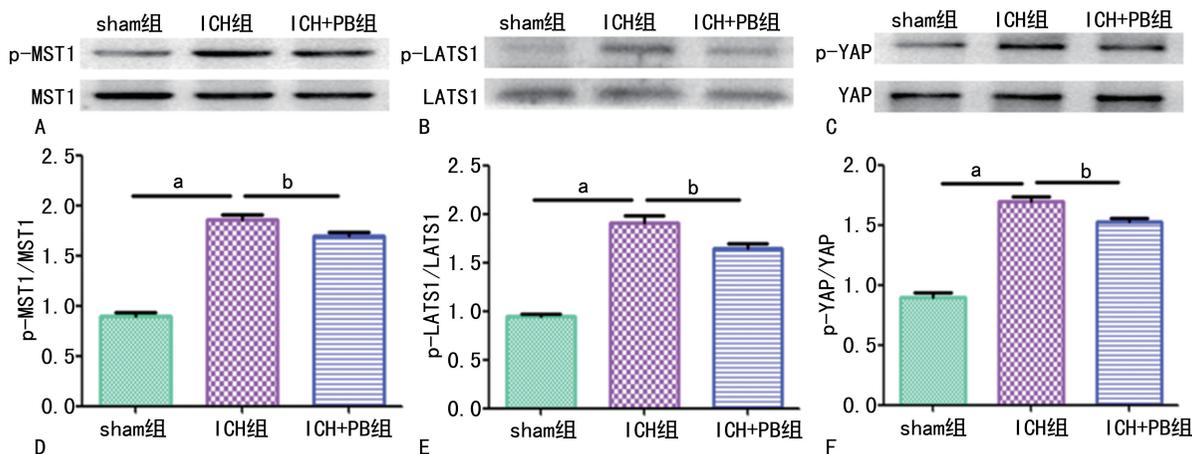
2.4 MST1、LATS1、YAP 表达检测结果

与 sham 组比较, ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显增加 ($P < 0.05$); 与 ICH 组比较, ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显减低 ($P < 0.05$)。见图 4。



A: TUNEL 荧光图; B: 血肿周围组织; C: 血肿周围神经元细胞凋亡分析; ^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

图 3 血肿周围脑组织细胞凋亡数



A、B、C: Western blot 图; D、E、F: Western blot 定量分析图; ^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

图 4 血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平

3 讨论

ICH 后脑损伤机制主要包括各种信号通路的激活, 从而引发细胞的凋亡或者坏死。许多研究表明神经元细胞的凋亡和损伤是 ICH 后神经功能缺失的机制之一^[13], 是 ICH 后神经功能进行性发展、恶化的直接原因^[14]。ICH 后正常脑组织结构遭到破坏, 从而引发 BBB 完整性破坏, 导致有害物质进入脑组织而造成脑损害。研究表明, ICH 后继发的脑水肿危害巨大, 是导致神经功能障碍的关键因素, 其中 BBB 的破坏引起的血管源性脑水肿是继发性脑水肿的主要环节^[15], 并且 BBB 的破坏又能促进细胞凋亡、炎症反

应、氧化应激的放大等^[16-17], 从而加重 ICH 后多种继发性神经损害。既往动物实验研究表明, ICH 后第 3 天出现脑水肿和细胞凋亡高峰^[18], 一般最多持续 10~14 d^[19]。故本实验选择在 ICH 后第 3 天检测脑组织 BBB 渗透性及神经元细胞凋亡情况, 以评估脑损伤程度及给予干预措施后的治疗效果。

普罗布考属于新型调脂药, 相对分子质量小, 易透过 BBB。其作用除了调脂、抗氧化以外还具有下调炎症因子表达^[20]、改善血管内皮功能^[21]、改善认知^[22]、清除氧自由基、抗神经细胞凋亡^[23]等作用。研究表明, 在缺血再灌注模型中^[24], 给予普罗布考进行

干预后可减少梗死面积和血管渗漏,保持 BBB 的完整性,起到抗神经元细胞凋亡、改善神经功能障碍的作用。在血管性痴呆和阿尔茨海默病(AD)的早期,给予普罗布考可降低 BBB 通透性,从而改善认知^[25]。在生理状态下 EB 在血管内与蛋白结合,很难进入脑组织,只有在 BBB 结构受损、通透性升高的情况下,EB 才能进入脑组织,因此脑组织内 EB 含量可用来衡量 BBB 通透性的程度。本研究发现,ICH 后小鼠 BBB 通透性明显升高,脑组织 EB 含量升高,经普罗布考干预 3 d 后,小鼠脑组织 EB 含量明显降低,同时神经功能障碍得到改善,提示普罗布考可减轻 ICH 所致的脑损害。

Hippo 通路由丝氨酸激酶级联反应组成,通过激酶之间的相互作用和级联磷酸化来传导信号。Hippo 通路可调控与生长相关的基因,参与细胞的增殖和凋亡过程,控制组织器官中细胞的数量和组织的大小。在哺乳动物中,Hippo 通路的激活,可导致 p-MST1 水平升高,p-MST1 与 Sav 形成复合物,可以磷酸化并激活 LATS1,继而磷酸化 YAP/TAZ 使 p-YAP/TAZ 静置在细胞质中^[26],因此 YAP1 的凋亡抑制作用将会消失^[27],相反,YAP/TAZ 去磷酸化可以使其发生核转位并激活转录因子促进细胞增殖、抑制凋亡^[28]。既往研究表明,在 ICH 血模型中^[29],Hippo 信号通路的抑制可缓解缺血缺氧造成的 BBB 损伤,起到神经保护作用。在 ICH 模型中,Hippo 信号通路的抑制可减轻 ICH 期间的脑水肿、BBB 损伤和神经功能障碍^[30]。本研究发现,ICH 后血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显上升、EB 渗漏增加、神经元细胞凋亡数明显增多,与既往研究一致。给予普罗布考干预后,与 ICH 组比较,血肿周围脑组织中 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显下降,说明普罗布考可起到抑制 Hippo 通路的作用,并且给予普罗布考后 EB 渗漏降低、神经元细胞凋亡数减少,从而推测普罗布考可能通过抑制 Hippo 通路从而起到脑保护作用。

综上所述,普罗布考对 ICH 模型小鼠具有脑保护作用,该作用可能是通过抑制 Hippo 通路而发挥保护 BBB、抗神经元细胞凋亡、改善神经功能障碍的作用,从而减轻脑损伤。

参考文献

- [1] VAN ASCH C J, LUITSE M J, RINKEL G J, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2):167-176.
- [2] HANGGI D, STEIGER H J. Spontaneous intracerebral haemorrhage in adults: a literature overview [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2008, 150(4):371-379.
- [3] MAMO J C, LAM V, BROOK E, et al. Probu-col prevents blood-brain barrier dysfunction and cognitive decline in mice maintained on pro-diabetic diet [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2019, 16(1):87-97.
- [4] CREASY C L, CHERNOFF J. Cloning and characterization of a member of the MST sub-family of Ste20-like kinases [J]. *Gene*, 1995, 167(1/2):303-306.
- [5] HARVEY K, TAPON N. The salvador-warts-Hippo pathway-an emerging tumour-suppressor network [J]. *Nature Rev Cancer*, 2007, 7(3):182-191.
- [6] CHIYODA T, SUGIYAMA N, SHIMIZU T, et al. LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression, 2012, 197(5):625-641.
- [7] YU F X, ZHAO B, GUAN K L. Hippo Pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer [J]. *Cell*, 2015, 163:811-828.
- [8] CHEN X, XU C X, LIANG H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation alleviates brain injury after intracerebral hemorrhage in mice through the Hippo signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7):6306-6323.
- [9] LUAN D, ZHANG Y X, YUAN L L, et al. MST4 modulates the neuro-inflammatory response by regulating IkappaBalpha signaling pathway and affects the early outcome of experimental ischemic stroke in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154:43-50.
- [10] CHHOR V, LE CHARPENTIER T, LEBON S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2013, 32:70-85.
- [11] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [12] ZHAO J L, CHEN Y J, YU J, et al. ISO-alpha-acids improve the hematoma resolution and prevent peri-hematoma inflammations by transforming microglia via PPARgamma-CD36 axis in ICH rats [J]. *Int Immunopharmacol*,

- 2020,83:106396.
- [13] SHEN H, LIU C, ZHANG D, et al. Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2641.
- [14] ZHAO X R, GONZALES N, ARONOWSKI J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(4):357-366.
- [15] WILKINSON D A, PANDEY A S, THOMPSON B G, et al. Injury mechanisms in acute Intracerebral hemorrhage[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B), 240-248.
- [16] WONG S M, JACOBUS F A J, ZHANG C E, et al. Measuring subtle leakage of the blood-brain barrier in cerebrovascular disease with DCE-MRI: test-retest reproducibility and its influencing factors[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2017, 46(1):159-166.
- [17] LEE M J, CHA J, CHOI H A, et al. Blood-brain barrier breakdown in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: implications for pathophysiology and diagnosis[J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(3):454-466.
- [18] XI G, KEEP R F, HOFF J T. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats[J]. *J Neurosurg*, 1998, 89(6):991-996.
- [19] STAYKOV D, WAGNER I, VOLBERS B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2011, 42(9):2625-2629.
- [20] LI T, CHEN W, AN F, et al. Probucol attenuates inflammation and increases stability of vulnerable atherosclerotic plaques in rabbits[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2011, 225(1):23-34.
- [21] ZAPOLSKA-DOWNAR D, ZAPOLSKI-DOWNAR A, MARKIEWSKI M, et al. Selective inhibition by probucol of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 155(1):123-130.
- [22] POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(3):355-361.
- [23] ZHOU X, AI S, CHEN Z, et al. Probucol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Müller cells[J]. *Int Ophthalmol*, 2019, 39(12):2833-2842.
- [24] NAKAGAWA S, ARUGA J. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(3):1594-1606.
- [25] TAKECHI R, GALLOWAY S, PALLEBAGE-GAMARALLAGE M M, et al. Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(1):45-52.
- [26] GUMBINER B M, KIM N G. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127:709-717.
- [27] YU F X, GUAN K L. The Hippo pathway: regulators and regulations, 2013, 27(4):355-371.
- [28] HAO Y, CHUN A, CHEUNG K, et al. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283:5496-5509.
- [29] GONG P, ZHANG Z, ZOU C L, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356:8-17.
- [30] ZHANG P, WANG T, ZHANG D, et al. Exploration of MST1-mediated secondary brain injury induced by intracerebral hemorrhage in rats via hippo signaling pathway[J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(6):729-743.

(收稿日期:2021-10-29 修回日期:2021-12-25)

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211216.1136.005.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211216.1136.005.html(2021-12-16))

普罗布考对高脂血症大鼠脑缺血再灌注的 脑保护作用及机制研究*

王建平¹,张杰²,赵洪云¹

(河北省沧州市中心医院:1.神经内科;2.CT诊断科 061000)

[摘要] **目的** 探讨普罗布考对高脂血症大鼠脑缺血再灌注的脑保护作用及可能机制。**方法** 140 只 SD 大鼠随机分为普通组(20 只)和高脂组(120 只),分别给予普通饲料、高脂饲料喂养 8 周,全自动生化分析仪检测其血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)水平以判断高脂血症大鼠造模成功与否。100 只造模成功的高脂血症大鼠采用随机数字表法分为假手术组、缺血再灌注组、低剂量普罗布考组、高剂量普罗布考组,每组各 25 只。普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组分别给予 0.5%羧甲基纤维素(CMC)配制的普罗布考混悬液 100 mg/kg、500 mg/kg 灌胃,假手术组、缺血再灌注组同时给予相同剂量 0.5% CMC 灌胃,1 次/天,连续 4 周。缺血再灌注组、普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组采用改良 Longa 法建立大脑中动脉阻断模型,假手术组大鼠除不插鱼线外,其余手术步骤同前。造模成功大鼠缺血 2 h 后,于不同再灌注时间点(6、12、24、48、72 h)对大鼠进行神经功能缺损评分(mNSS);再灌注 24 h 后 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测脑梗死体积;ELISA 检测缺血脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测缺血脑组织核转录因子- κ B(NF- κ B)通路相关蛋白表达水平。**结果** 与普通组比较,高脂组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平升高,HDL-C 水平降低($P < 0.05$)。与假手术组比较,缺血再灌注组大鼠再灌注不同时间点 mNSS 降低,脑梗死体积增大,缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、p-p65 水平升高($P < 0.05$);与缺血再灌注组比较,普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组大鼠再灌注不同时间点 mNSS 升高,脑梗死体积减小,缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、p-p65 蛋白水平降低($P < 0.05$);与普罗布考低剂量组比较,普罗布考高剂量组大鼠再灌注 6、48、72 h mNSS 升高,脑梗死体积减小,缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、p-p65 水平降低($P < 0.05$)。**结论** 普罗布考对高脂血症大鼠脑缺血再灌注具有脑保护作用,机制可能与调控 NF- κ B 通路有关。

[关键词] 高脂血症;缺血再灌注;普罗布考;脑保护;核转录因子- κ B 通路

[中图分类号] R743.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)07-1106-06

Study on cerebral protective effect and mechanism of probucol on cerebral ischemia-reperfusion in hyperlipidemia rats*

WANG Jianping¹,ZHANG Jie²,ZHAO Hongyun¹(1. Department of Neurology;2. Department of CT Diagnosis, Cangzhou
Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the cerebral protective effect and possible mechanism of probucol on cerebral ischemia-reperfusion in hyperlipidemia rats. **Methods** A total of 110 SD rats were randomly divided into the normal group (10 rats) and the high-fat group (100 rats), and the rats were fed with normal diet and high-fat diet for 8 weeks, respectively. The levels of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipid cholesterol (LDL-C) and high-density lipid cholesterol (HDL-C) were detected by automatic biochemical analyzer, to judge whether the hyperlipidemia rat models were successfully established or not. A total of 100 successfully hyperlipidemia rats-models were randomly divided into the sham operation group, the ischemia-reperfusion group, the low-dose probucol group and the high-dose probucol group, with 25 rats in each

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20200305)。 作者简介:王建平(1980-),主治医师,硕士,主要从事脑血管病临床诊断与治疗研究。

group. The probucol low-dose group and high-dose group were given probucol suspension mad with 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) at the dose of 100 mg/kg, 500 mg/kg gavage, respectively; the sham operation group and the ischemia-reperfusion group were given the same dose of 0.5% CMC gavage, 1 time/d, for 4 weeks. The middle cerebral artery occlusion model was established by the modified Longa method in the ischemia-reperfusion group, the low-dose probucol group and the high-dose probucol group. The rats in the sham operation group were treated with the same procedure as those in the operation group before except that no fish line was inserted. After 2 h of ischemia, neurological deficit scores (mNSS) were evaluated at different reperfusion time points (6, 12, 24, 48, 72 h). Cerebral infarction volume was detected by 3,5-triphenyltetrazole chloride (TTC) staining after 24 h reperfusion. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in ischemic brain tissue were detected by ELISA. Western blot was used to detect the expression levels of nuclear transcription factor - κ B (NF- κ B) pathway-related proteins in the ischemic brain tissue. **Results** Compared with the normal group, the serum levels of TC, TG and LDL-C of rats in the the high-fat group were increased, while HDL-C serum levels was decreased ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the mNSS of rats in the model group at different time points after reperfusion decreased, the volume of cerebral infarction increased, and the levels of TNF- α , IL-1 β and p-p65 protein in the ischemic brain tissue increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mNSS of rats in the low-dose probucol group and the high-dose probucol group at different time points of reperfusion increased, the volume of cerebral infarction decreased, and the levels of TNF- α , IL-1 β and p-p65 protein in the ischemic brain tissue decreased ($P < 0.05$). Compared with the low-dose probucol group, the mNSS of rats in the high-dose probucol group at 6, 48, 72 h after reperfusion were increased, the volume of cerebral infarction was decreased, and the levels of TNF- α , IL-1 β and p-p65 protein in ischemic brain tissue were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Probucol has a cerebral protective effect on cerebral ischemia-reperfusion in hyperlipidemia rats, and the mechanism may be related to the regulation of NF- κ B pathway.

[Key words] hyperlipidemia; ischemia reperfusion; probucol; cerebral protection; NF- κ B pathway

脑卒中亦称“中风”，是 1 种急性脑血管疾病，包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中，其中，缺血性脑卒中占全部脑血管疾病的 70%~80%，具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率等特征^[1]。大动脉粥样硬化狭窄是缺血性脑卒中最常见的亚型，高脂血症是脑动脉狭窄的高危因素^[2-3]。目前，临床上有效治疗缺血性脑卒中的手段是在时间窗内通过溶栓或取栓等恢复半暗带的血氧供应，使闭塞血管血液得到再灌注，减轻脑组织缺血缺氧的损伤，改善患者预后^[4]。但再灌注同时会加重缺血细胞损伤，甚至发展为不可逆损伤即脑缺血再灌注损伤^[5]。因此，寻找有效减轻脑缺血再灌注损伤的药物对提高缺血性脑卒中的治疗效果，改善患者预后具有重要意义。普罗布考是 1 种新型降脂药物，具有抗氧化、抗炎，抑制动脉粥样硬化因子表达，减少动脉粥样硬化斑块及提高血管内皮舒张功能等作用^[6-7]。近年研究显示，普罗布考在脑出血高风险的缺血性脑卒中患者治疗中发挥了重要作用^[8]。本研究拟通过建立高脂血症大鼠中动脉阻断大鼠模型经普罗布考治疗并检测相关指标，探讨普罗布考对其脑缺血再灌注的脑保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无特定病原体 (SPF) 级 SD 大鼠 140 只，雌雄各半，7 周龄，体重 (220±20 g)，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证号：SCXK(京)2016-0011。饲养环境：温度 20~25℃，相对湿度 45%~55%，光照周期 12 h，根据国家实验动物管理条例进行喂养。本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.1.2 药品、主要试剂和仪器

普罗布考 0.25 克/片 (承德颈复康药业集团有限公司)；TTC (美国 Sigma 公司)；大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司)；兔抗鼠 p-p65、NF- κ B p65、 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司)；辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (英国 Abcam 公司)；全自动生化分析仪及配套试剂 (山东科生物产业有限公司)；多功能酶标仪 (美国 Molecular Device 公司)；蛋白凝胶电泳仪 (上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备^[9]

140 只 SD 大鼠分为:普通组(20 只),高脂组(120 只),采用自然进食法制备高脂血症模型。普通组给予普通饲料喂养,高脂组给予高脂饲料(基础饲料 79.3%、蛋黄粉 10%、胆固醇 5%、猪油 5%、猪胆盐 0.5%、丙硫氧嘧啶 0.2%)喂养 8 周,空腹 12 h 后取大鼠尾尖静脉血,全自动生化分析仪及配套试剂检测其血脂四项:总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(low-density lipid cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(high-density lipid cholesterol, HDL-C)。

1.2.2 分组及干预

120 只造模成功的高脂血症大鼠采用随机数字表法分为:高脂组、缺血再灌注组、低剂量普罗布考组、高剂量普罗布考组,每组 30 只。普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组分别给予 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)配制的普罗布考混悬液 100 mg/kg、500 mg/kg 灌胃,高脂组、缺血再灌注组同时给予相同剂量不含普罗布考的 0.5% CMC 灌胃,1 次/天,连续 4 周。

1.2.3 建立大脑中动脉阻断模型^[10]

缺血再灌注组、普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组采用改良 Longa 法建立大脑中动脉阻断模型,10%水合氯醛腹腔麻醉后,经颈正中切口,依次分离右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,结扎颈外动脉及颈总动脉近心端,在距颈总动脉分叉 5 mm 处剪一“V”形切口,将处理好的鱼线插入颈总动脉,深度约 18 mm,至大脑中动脉,结扎并固定鱼线,缝合皮肤,阻断血流 2 h 后,分别拔出鱼线进行再灌注。假手术组大鼠除不插鱼线外,其余步骤同前,根据 Longa 评分标准判断造模是否成功。评分原则,0 分:表现正常,无明显神经功能缺损症状和体征;1 分:左前肢屈曲无力,不能完全伸直;2 分:行走向左侧旋转;3 分:行走时向左侧倾倒,站立不稳;4 分:不能自行行走,意识障碍。1~3 分大鼠为造模成功。缺血再灌注组术后死亡 2 只,蛛网膜下腔出血死亡 1 只;普罗布考低剂量组和普罗布考高剂量组分别因蛛网膜下腔出血死亡 1 只。

1.2.4 各组大鼠神经功能缺损评分

造模成功大鼠根据再灌注不同时间点(6、12、24、48、72 h)分为 5 个亚组,每组取 5 只,对大鼠进行提尾反射测试、行走测试、感觉测试、平衡性测试、反常运动和反射缺失测试。根据 Garcia 评分细则^[11]进行神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS),得分最低 3 分,最高 18 分,分数越低表示神经功能障碍越重。

1.2.5 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测

各组大鼠脑梗死体积

造模成功大鼠缺血再灌注后 24 h 每组取 5 只,10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,快速断头取脑,将新鲜脑组织置于-20℃冰箱 20 min,脑组织切去小脑及低位脑干,沿脑组织冠状面依次切成 2 mm 厚的切片,立即放于 2% TTC 磷酸缓冲液中,37℃避光染色 30 min,4%甲醛固定,将已染色的脑组织规律摆放,进行照相后采用 Image Pro Plus 6.0 图像处理软件进行分析,计算脑梗死体积比(V)。计算公式: $V = [(A1 + A2) / (2 \times t)] / [(A3 + A4) / (2 \times t)] \times 100\%$,其中,A1 和 A2 为各脑片正反面梗死面积(mm²),A3 和 A4 为各脑片正反面面积(mm²),t 为切片厚度(mm)。

1.2.6 ELISA 检测缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平

取部分缺血脑组织,匀浆器将其充分匀浆,3 000 r/min(离心半径 8 cm)离心 20 min,收集上清液。设置空白孔、标准品孔及样品孔,标准品孔加 50 μ L 梯度稀释的标准品,样品孔先加 40 μ L 样品稀释液,再加 10 μ L 样品,振荡混匀后封板,37℃孵育 30 min,洗涤液清洗 5 次,除空白孔外每孔加 50 μ L 酶标试剂,混匀后封板,37℃孵育 1 h,洗涤液清洗 5 次,每孔加 100 μ L 显色液,混匀后 37℃避光显色 20 min,标准品孔出现颜色梯度变化时,每孔加 50 μ L 终止液,15 min 内以空白孔调零,酶标仪 450 nm 波长外测量各孔光密度(OD)值,以标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,采用 CurveExpert 软件绘制标准曲线,计算样品中 TNF- α 、IL-1 β 水平,实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测缺血脑组织 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平

取 120 mg 冷冻缺血脑组织,液氮研磨后加 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测蛋白浓度,蛋白煮沸变性,取等量总蛋白行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳条件:80 V 恒压电泳浓缩蛋白 20 min,100 V 恒压电泳分离蛋白约 1 h 至溴酚蓝接近蛋白胶板底端,转膜仪将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,转膜条件:300 mA 恒流转膜 1 h,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别用 1:1 000 稀释的 p-p65、NF- κ B p65、 β -actin 一抗 4℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再用 1:2 000 稀释的过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 化学发光液浸膜,暗室曝光显影, Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值/内参 β -actin 蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白表达水平,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS24.0 软件对实验数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多

组间比较采用单因素方差分析,进一步两两间比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普通组与高脂血症组大鼠血脂四项

大鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与普通组比较,高脂血症组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠 mNSS

大鼠 mNSS 组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,缺血再灌注组大鼠再灌注

不同时间点 mNSS 降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组大鼠再灌注不同时间点 mNSS 升高 ($P < 0.05$);与普罗布考低剂量组比较,普罗布考高剂量组大鼠再灌注 6、48、72 h mNSS 升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠血脂四项水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	<i>n</i>	TC	TG	LDL-C	HDL-C
普通组	20	1.42±0.13	0.39±0.04	0.42±0.05	1.37±0.11
高脂血症组	120	2.61±0.16	0.65±0.05	0.69±0.07	1.21±0.09
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 各组大鼠再灌注后不同时间点神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$, 分, $n=5$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	17.12±0.81	16.81±0.84	17.03±1.17	17.24±0.85	17.45±0.92
缺血再灌注组	11.54±0.96 ^a	10.61±0.95 ^a	8.25±0.85 ^a	8.78±0.72 ^a	9.87±0.73 ^a
普罗布考低剂量组	12.35±0.79 ^{ab}	12.12±0.71 ^{ab}	11.07±0.92 ^{ab}	10.98±0.77 ^{ab}	11.85±0.84 ^{ab}
普罗布考高剂量组	13.63±0.86 ^{abc}	12.45±0.89 ^{ab}	11.21±0.87 ^{ab}	12.06±0.81 ^{abc}	13.67±0.95 ^{abc}
<i>F</i>	41.212	48.905	73.626	103.322	69.613
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较; ^c: $P < 0.05$, 与普罗布考低剂量组比较。

2.3 各组大鼠脑梗死体积

大鼠脑梗死体积组间比较,差异有统计学意义 ($F=305.905, P < 0.001$)。与缺血再灌注组 [$(178.59 \pm 15.53) \text{ mm}^3$] 比较,普罗布考低剂量组 [$(119.82 \pm 10.42) \text{ mm}^3$]、普罗布考高剂量组 [$(97.34 \pm 11.61) \text{ mm}^3$] 大鼠脑梗死体积减小 ($P < 0.05$);与普罗布考低剂量组比较,普罗布考高剂量组大鼠脑梗死体积减小 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平

大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,缺血再灌注组大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$);与缺血再灌注组比较,普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$);与普罗布考低剂量组比较,普罗布考高剂量组大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 各组大鼠缺血脑组织 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平

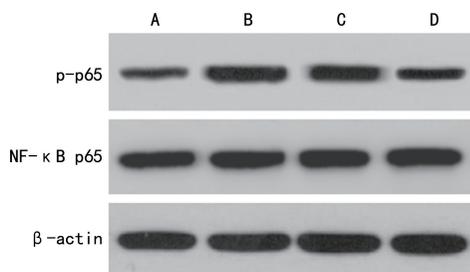
大鼠缺血脑组织 p-p65 蛋白表达水平组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,缺血再灌注组大鼠缺血脑组织 p-p65 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$);与缺血再灌注组比较,普罗布考低剂量组、普罗布考高剂量组大鼠缺血脑组织 p-p65 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$);与普罗布考低剂量组比较,普

罗布考高剂量组大鼠缺血脑组织 p-p65 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$),各组大鼠缺血脑组织 NF- κ B p65 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1,表 4。

表 3 各组大鼠缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
假手术组	174.52±26.51	79.68±8.97
缺血再灌注组	629.41±37.08 ^a	230.51±16.72 ^a
普罗布考低剂量组	394.12±28.13 ^{ab}	149.37±11.13 ^{ab}
普罗布考高剂量组	287.26±24.57 ^{abc}	124.06±10.57 ^{abc}
<i>F</i>	724.763	562.041
<i>P</i>	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较; ^c: $P < 0.05$, 与普罗布考低剂量组比较。



A: 假手术组; B: 缺血再灌注组; C: 普罗布考低剂量组; D: 普罗布考高剂量组。

图 1 大鼠缺血脑组织 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平

表 4 各组大鼠缺血脑组织 NF- κ B p65、p-p65 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NF- κ B p65	p-p65
假手术组	1.01±0.10	0.34±0.04
缺血再灌注组	1.05±0.11	0.97±0.07 ^a
普罗布考低剂量组	0.99±0.08	0.62±0.06 ^{ab}
普罗布考高剂量组	1.02±0.09	0.49±0.05 ^{abc}
F	0.205	68.857
P	0.890	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较; ^c: $P < 0.05$, 与普罗布考低剂量组比较。

3 讨论

脑血管病是全球主要的健康问题之一,包括脑动脉粥样硬化、脑动脉炎、脑动脉损伤、脑动脉瘤、颅内血管畸形和脑动静脉瘘等,大、小脑血管病变均可触发卒中^[12]。目前,我国每年脑血管病新发病例约 250 万,死亡人数约 150 万,而大概 75% 幸存患者留有不同程度的后遗症^[6]。其中,缺血性脑卒中是由于颈动脉和椎动脉等脑部供血动脉狭窄、闭塞引起脑组织缺血缺氧及缺血再灌注导致的炎症反应、酸中毒、自由基生成等一系列病理变化^[13-15]。脑缺血再灌注损伤包括血管通透性增加、血脑屏障破坏和脑水肿等,是导致缺血性脑卒中患者预后不良的关键因素^[16]。缺血性脑卒中患者死亡的脑细胞周围存在大量神经元,因此有效恢复血氧供应,减小动脉斑块面积,减轻神经细胞损伤及降低血脂可以显著改善患者的神经功能。临床上常以静脉溶栓和血管内血栓切除术进行快速再灌注,以及血压控制、胆固醇管理和抗血栓药物等二级预防方式^[17]进行处理。

普罗布考是 1 种具有抗氧化和抗炎特性的酚类化合物降脂剂,已用于临床治疗和预防心血管疾病^[18]。NAKAGAWA 等^[19]研究表明,普罗布考在体外血脑屏障模型中可减轻氧糖剥夺/复氧引起的跨内皮电阻降低和通透性增加;在小鼠大脑中动脉阻断再灌注模型中可减小术后脑梗死面积和血管渗漏并保持紧密连接蛋白的完整性。杨成等^[20]研究发现,普罗布考可以提高缺血再灌注损伤大鼠血及肾组织中超氧化物歧化酶活性,改善肾功能,降低血脂水平,减轻肾组织病理损伤,发挥肾脏保护作用。曾洪艳等^[21]研究显示,普罗布考可通过转化生长因子 β 1/Smad2/3 通路减轻大鼠脑缺血再灌注的炎症损伤。本研究建立高脂血症大鼠中动脉阻断大鼠模型,经普罗布考治疗后发现大鼠脑缺血再灌注不同时间点 mNSS 升高、脑梗死体积减小,缺血脑组织 TNF- α 、IL-1 β 水平降低,提示普罗布考可减轻高脂血症大鼠脑缺血再灌注损伤,发挥脑保护作用。

NF- κ B 是 1 种早期核转录因子,通过与靶基因启动子/增强子区域的特定序列结合并启动基因转录。静息状态下,NF- κ B 通常以 p50/p65 二聚体形式与 NF- κ B 抑制剂(I κ B)结合形成无活性异源复合体存在于细胞质中,细胞外信号刺激下,I κ B 激酶复合体将 I κ B 磷酸化,复合体解离并释放 NF- κ B,游离的 NF- κ B 从细胞质转移至细胞核,p65 亚基与靶基因 κ B 结合位点结合启动或增强基因如 TNF- α 、IL-1 β 等的转录,导致炎症反应^[22]。LIANG 等^[23]研究发现,远程缺血预处理可通过调控 NF- κ B 通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,发挥神经保护作用。WU 等^[24]研究表明,长春西汀通过调控 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/NF- κ B 通路抑制炎症反应,减轻脑缺血再灌注损伤。本研究结果显示,经普罗布考治疗后,高脂血症大鼠中动脉阻断大鼠缺血脑组织 p-p65 蛋白表达水平降低,提示普罗布考可能通过调控 NF- κ B 通路发挥对高脂血症大鼠中动脉阻断大鼠缺血再灌注的脑保护作用。

综上所述,普罗布考对高脂血症大鼠脑缺血再灌注具有脑保护作用,其机制可能与调控 NF- κ B 通路及下游相关炎症因子的表达有关。本研究为普罗布考应用于高脂血症合并缺血性脑卒中的临床治疗提供理论支持。

参考文献

- [1] BOURSIN P, PATERNOTTE S, DERCY B, et al. Semantics, epidemiology and semiology of stroke[J]. Soins, 2018, 63(828): 24-27.
- [2] WANG Y, LU Z, SUN S, et al. Risk factors, topographic patterns and mechanism analysis of intracranial atherosclerotic stenosis ischemic stroke[J]. Int J Neurosci, 2017, 127(3): 267-275.
- [3] KANG K, WANG Y, WU J, et al. Association between cumulative exposure to increased low-density lipoprotein cholesterol and the prevalence of asymptomatic intracranial atherosclerotic stenosis [J]. Front Neurol, 2020, 11: 555274.
- [4] BHASKAR S, STANWELL P, CORDATO D, et al. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? [J]. BMC Neurology, 2018, 18(1): 8.
- [5] HE J, ZHOU D, YAN B. Eriocitrin alleviates oxidative stress and inflammatory response in cerebral ischemia reperfusion rats by regulating phosphorylation levels of Nrf2/NQO-1/HO-1/

- NF- κ B p65 proteins[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(12):757.
- [6] 宗艳杰, 谷玉静, 钱娜, 等. 普罗布考联合阿托伐他汀治疗老年脑梗死的疗效观察[J]. *神经损伤与功能重建*, 2020, 15(1):44-46.
- [7] HUANG J L, YU C, SU M, et al. Probucol, a “non-statin” cholesterol-lowering drug, ameliorates D-galactose induced cognitive deficits by alleviating oxidative stress via Keap1/Nrf2 signaling pathway in mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(19):8542-8555.
- [8] KIM B J, LEE E J, KWON S U, et al. Prevention of cardiovascular events in Asian patients with ischaemic stroke at high risk of cerebral haemorrhage (PICASSO): a multicentre, randomised controlled trial [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(6):509-518.
- [9] 林玲, 刘芷君, 雷郑延, 等. 茶籽皂苷对高脂血症大鼠肠道菌群的影响研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(2):173-181.
- [10] 王国佐, 龚盛强, 兰斌, 等. 大脑中动脉阻断模型大鼠血浆差异蛋白筛选及其生物信息学分析[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(7):997-1000.
- [11] SUN S, GAO N, HU X, et al. SOD3 overexpression alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(10):e00831.
- [12] HU X, DE SILVA T M, CHEN J, et al. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2017, 120(3):449-471.
- [13] FOX K A A, LUCAS J E, PIEPER K S, et al. Improved risk stratification of patients with atrial fibrillation: an integrated GARFIELD-AF tool for the prediction of mortality, stroke and bleed in patients with and without anticoagulation [J]. *BMJ Open*, 2017, 7(12):e017157.
- [14] EITRINGHAM S A, KILNER K, GEE M, et al. Impact of dysphagia assessment and management on risk of stroke-associated pneumonia: a systematic review [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2018, 46(3/4):99-107.
- [15] PICCARDI B, GIRALT D, BUSTAMANTE A, et al. Blood markers of inflammation and endothelial dysfunction in cardioembolic stroke: systematic review and meta-analysis [J]. *Biomarkers*, 2017, 22(3/4):200-209.
- [16] ZUO G, ZHANG D, MU R, et al. Resolvin D2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1):9.
- [17] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1):70.
- [18] SANTOS D B, COLLE D, MOREIRA E L G, et al. Probucol protects neuronal cells against peroxide-induced damage and directly activates glutathione peroxidase-1 [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(8):3245-3257.
- [19] NAKAGAWA S, ARUGA J. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(3):1594-1606.
- [20] 杨成, 任星峰, 彭隽. 普罗布考对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 46(6):660-664.
- [21] 曾洪艳, 彭宇婕, 保丽玲. 普罗布考通过 TGF- β 1/Smad 2/3 通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(3):278-282, 291.
- [22] ZHANG Y, ZHOU X, ZHANG M M, et al. ZBTB20 promotes cell migration and invasion of gastric cancer by inhibiting I κ B α to induce NF- κ B activation [J]. *Artificial Cells*, 2019, 47(1):3862-3872.
- [23] LIANG W, LIN C, YUAN L, et al. Preactivation of Notch1 in remote ischemic preconditioning reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through crosstalk with the NF- κ B pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):181.
- [24] WU L R, LIU L, XIONG X Y, et al. Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):80315-80324.

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1826.014.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1826.014.html(2021-12-15))

自噬对噪声性耳聋急性损伤期毛细胞凋亡的作用机制研究*

李林¹,于佳雪¹,黄宏明²,崔勇²,盛晓丽^{2Δ}

(1.广东省人民医院珠海医院/广东省珠海市金湾中心医院耳鼻喉头颈外科 519040;

2.广东省医学科学院/广东省人民医院耳鼻咽喉头颈外科 510080)

[摘要] **目的** 探讨自噬在噪声性耳聋防治中的作用及机制。**方法** 建立大鼠噪声性耳聋模型。随机分为 3 个组:对照组(每次 2 mL 生理盐水);自噬激动剂雷帕霉素(RAP)组(每次 7.5 mg/kg);自噬抑制剂 3-甲基嘌呤(3MA)组(每次 30 mg/kg 3MA),以上各组均于噪声暴露前 24、暴露前 2 h 和暴露后即刻进行腹腔注射。听觉脑干反应(ABR)阈值检测评估大鼠 ABR 情况。应用双重免疫荧光染色检测氧化应激(OS)标记物 3-硝基酪氨酸(3-NT)阳性表达细胞。Western blot 检测自噬标记 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 表达水平。使用 TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果** 噪声暴露后小鼠 ABR 阈值较暴露前升高。RAP 组在噪声暴露后 1、12、24 h 各时间点的 ABR 阈值较对照组均明显增加;而 3MA 组在以上各时间点的 ABR 阈值较对照组则明显减少(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平较暴露前明显升高。RAP 组噪声暴露 1、12、24 h 耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平明显高于对照组,而 3MA 组以上各时间点耳蜗毛细胞自噬标记蛋白表达水平则明显低于对照组(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各组耳蜗毛细胞 3-NT 水平明显较暴露前增高,RAP 组暴露 1、12、24 h 3-NT 水平较对照组增加;而 3MA 组以上各时间点 3-NT 水平较对照组减少(均 $P < 0.05$);噪声暴露后各组耳蜗毛细胞凋亡较暴露前明显增加,RAP 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组增加,而 3MA 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组减少(均 $P < 0.05$)。**结论** 在噪声性耳聋损伤的急性期,自噬表达明显上调,并通过 OS 途径诱导毛细胞凋亡;抑制自噬能够明显改善毛细胞程序性凋亡的发生,进而改善听力。

[关键词] 自噬;噪声性耳聋;氧化应激;耳蜗;毛细胞**[中图分类号]** R764.433**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1112-05

Mechanism of autophagy on the apoptosis of hair cells during acute damage of noise deafness*

LI Lin¹, YU Jiaxue¹, HUANG Hongming², CUI Yong², SHENG Xiaoli^{2Δ}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhuhai Hospital of Guangdong Provincial People's Hospital / Zhuhai Golden Bay Central Hospital, Zhuhai, Guangdong 519040,

China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Guangdong Academy of Medicine Sciences/Guangdong General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and mechanism of autophagy in the prevention and treatment of noise-induced deafness. **Methods** The rat model of noise-induced deafness was established. The rats were randomly divided into three groups: the control group (2 mL saline daily); the autophagy agonist rapamycin (RAP) group (7.5 mg/kg daily); the autophagy inhibitor 3 methylpurine (3MA) group (30 mg/kg daily). Auditory brainstem response (ABR) threshold assay was used to assess the auditory threshold shift in rats. Double immunofluorescence staining was applied to detect positive cells for the reactive oxygen species (ROS) marker 3-nitrotyrosine (3-NT). Western blot was used to detect the expression levels of autophagy marker proteins LC3-II/LC3-I and Beclin-1. Apoptosis was detected by using the TUNEL method. **Results** The ABR threshold was higher after noise exposure than before exposure. Compared with the control group, the ABR thresholds of the RAP group at the time point of 1, 12, and 24 h after noise exposure were significantly increased; while the ABR thresholds of the 3MA group at the above time points were significantly lower than those of the control group (all $P < 0.05$). The expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(B2019095)。 作者简介:李林(1984-),副主任医师,本科,主要从事耳鸣、耳聋等治疗研究。

Δ 通信作者, E-mail: emp05939170j@163.com。

cells after exposure were significantly higher than those before exposure. The expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair cells in the RAP group were significantly higher than those in the control group after 1, 12, and 24 h of noise exposure, while the expression levels of autophagy marker proteins in cochlear hair cells in the 3MA group at the time points above were significantly lower than those in the control group (all $P < 0.05$). The level of 3-NT in cochlear hair cells after noise exposure was significantly higher than that before exposure. The level of 3-NT in cochlear hair cells in the RAP group was higher than that in the control group after noise exposure for 1, 12, and 24 h, while the expression level of autophagy 3-NT in cochlear hair cells in the 3MA group at the time points above were significantly lower than those in the control group (all $P < 0.05$). The apoptosis of cochlear hair cells after noise exposure was significantly increased compared with that before exposure, the apoptosis of cochlear hair cells in the RAP group was higher than that in the control group, however, the apoptosis of cochlear hair cells in the 3MA group was lower than that in the control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** In the acute stage of noise deafness injury, the expression of autophagy is significantly up-regulated, and the apoptosis of hair cells is induced through the OS pathway. Inhibiting autophagy can significantly improve the programmed apoptosis of hair cells, thereby improving hearing.

[Key words] autophagy; noise-induced deafness; oxidative stress; cochlear; hair cells

噪声性耳聋是感音神经性耳聋里最常见的原因之一,目前其发病机制及治疗是全世界共同难题之一。导致噪声性耳聋的一个关键因素是感觉毛细胞的氧化损伤。研究表明活性氧(ROS)的过度产生已成为各种内耳损伤的常见病理机制,如噪音暴露和耳毒性药物所致的耳蜗损伤^[1-2]。既往研究发现在噪声暴露前后给予抗氧化剂治疗能够有效减少噪声引起的毛细胞死亡从而有效改善噪声性耳聋的发生^[3-4]。越来越多的证据表明 ROS 会通过诱导自噬发生来保护细胞,这一过程是通过形成自噬小体来介导的,自噬小体与溶酶体融合,对吞噬的成分进行酶解^[4]。通过程序性地处理这些可能受损的细胞成分,包括受损的细胞器和错误折叠的蛋白,起到了限制病理进展的作用^[4-5]。

自噬与 ROS 表达水平的复杂关系表明自噬在噪声性耳聋的发生发展中起着潜在关键作用,然而其具体的调控机制仍不明确。越来越多的证据表明自噬诱导的氧化应激(OS)与耳聋密切相关^[6-8]。脂质过氧化、线粒体 DNA 氧化损伤和谷胱甘肽结合蛋白的过表达都被证明与小鼠耳蜗老化密切相关^[6,9-10]。因此,探寻自噬导致的耳蜗细胞变性的确切机制及可能导致耳聋的关键分子靶标,无疑对噪声性耳聋患者的治疗有着极为重要的意义。本研究拟观察自噬在噪声性耳聋中的确切表达情况,以及其对 ROS 水平的调控机制,进一步明确自噬和 ROS 与听觉阈值之间的相关性,为临床治疗噪声性耳聋奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

健康成年 SD 大鼠 48 只,雌雄不限,体重 220~240 g,由华南理工大学动物实验中心提供,分为 3 组:对照组,自噬抑制剂 3-甲基嘌呤(3MA)组和自噬激动剂雷帕霉素(RAP)组。RAP、3MA 购自上海宝曼生物科技有限公司;TUNEL 试剂盒购自瑞士 Roche 公司;酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;LE2202S

型电子天平购自德国 Sartorius 公司;Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);LeicaDC500 病理图像分析系统(德国 Leica 公司);H-7650 透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

1.2 噪声暴露

噪声性耳聋模型按既往文献进行造模^[11],即将大鼠放入暴露舱(0.5 m×1.5 m×0.5 m),用 UZ-3 型噪声发生器发声,平均声强为 106 dB。动物暴露范围内声扬不均匀度为±2 dB,噪声频率为 4 kHz,持续暴露 6 h。

1.3 腹腔注射给药

RAP 以 75 mg/mL 溶于 DMSO 并在 -20 °C 下储存;3-MA 以 30 mg/mL 溶于 0.9% 的生理盐水并在 -20 °C 下储存。根据文献报道使用剂量^[11],即每只大鼠共接受 3 次腹腔内注射,RAP 的剂量为每次 7.5 mg/kg,3-MA 的剂量为每次 30 mg/kg。使用时间为在噪声暴露前 24 h、前 2 h 和暴露后即刻进行腹腔注射。

1.4 听觉脑干反应(auditory brainstem response, ABR)

按以往文献描述对大鼠行 ABR 检测^[11]。即分别以 10% 水合氯醛(30 mg/kg)腹腔麻醉,在静电屏蔽室内采用 Nicolet Compass 系统测试 ABR。ABR 阈值即为观察到有刺激反应的最低刺激水平和无刺激反应的最高水平。所有的 ABR 阈值测量都由同一个实验者进行。

1.5 末端 DNA 转移酶 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法检测凋亡

耳蜗基底膜组织切片常规脱蜡至水,按照试剂盒说明书完成余下操作后,镜下观察耳蜗毛细胞凋亡情况,光镜下 400 倍视野观察拍照。细胞核呈绿色颗粒伴核形态不规则或固缩的即为凋亡细胞。

1.6 免疫荧光定量分析

按免疫荧光染色按试剂盒说明书操作,使用的一

抗分别为稀释浓度 1:50 的多克隆兔抗 LC3B(美国丹佛 Cell Signaling Technology 公司), 1:50 的多克隆兔抗 3-硝基酪氨酸(3-NT, 美国比尔里卡 EMD Millipore 公司)。Alexa Fluor 594 标记二抗的稀释浓度为 1:200, Alexa Fluor 488 标记的二抗的稀释浓度为 1:100(美国 Life Technologies 公司)。所有切片均置于电子显微镜下观察摄片, 并使用 ImageJ 软件量化处理。

1.7 Western blot

耳蜗基底膜组织切片经 PBS 清洗后按蛋白提取试剂盒说明书提取组织总蛋白, 100 °C 变性 5 min。然后各泳道等量蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白并转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。经 5% 的牛血清清蛋白(BSA)封闭 1 h 后加入相应的一抗(LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白一抗), 4 °C 过夜孵育。第 2 天加入相应二抗, 室温孵育 1.5 h。最后加入发光液, 以 GAPDH 为内参于凝胶成像仪进行曝光拍照并进行条带灰度值分析。

1.8 统计学处理

采用 Stata13.0 软件分析数据, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用非配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

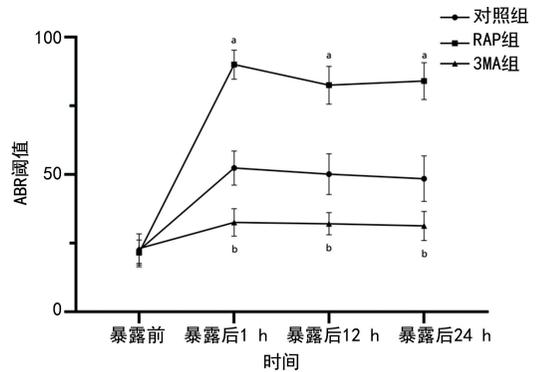
2.1 抑制自噬能够降低 ABR 阈值

噪声暴露后 1、12、24 h 检测各组 ABR 阈值后发现, 各组 ABR 阈值较暴露前升高。RAP 组在噪声暴露后 1、12、24 h 各时间点的 ABR 阈值较对照组均明显增加; 而 3MA 组在以上各时间点的 ABR 阈值较对

照组则明显减少(均 $P < 0.05$)。见图 1。

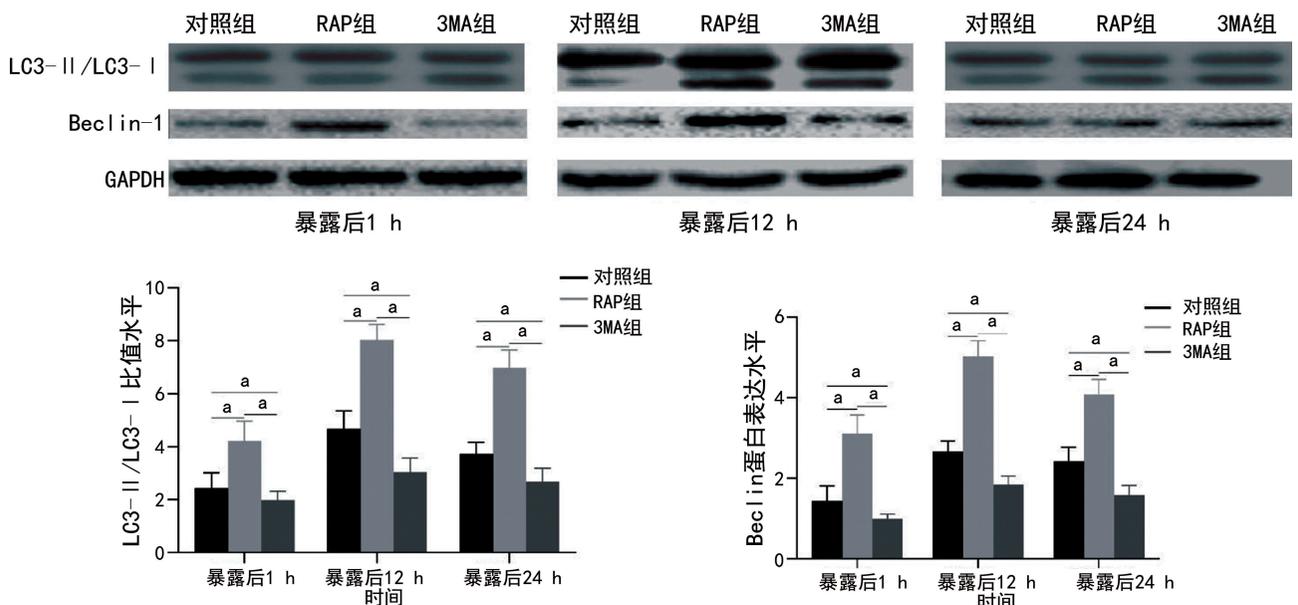
2.2 抑制自噬能够抑制耳蜗毛细胞中自噬标志蛋白和 ROS 表达水平

在噪声暴露后 1、12、24 h 分别检测各组耳蜗毛细胞自噬标志蛋白 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 发现, 各组噪声暴露后耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平明显升高。RAP 组噪声暴露 1、12、24 h 耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平明显高于对照组, 而 3MA 组以上各时间点耳蜗毛细胞自噬标志蛋白表达水平则明显低于对照组(均 $P < 0.05$), 见图 2。为进一步验证自噬表达与细胞程序性死亡的终末产物 ROS 水平的相关性, 本研究检测了噪声暴露后 1、12、24 h 3-NT 水平后发现, 噪声暴露后耳蜗毛细胞 3-NT 水平明显较暴露前增高, RAP 组暴露 1、12、24 h 3-NT 水平较对照组增加; 而 3MA 组以上各时间点 3-NT 水平较对照组减少(均 $P < 0.05$), 见图 3。



^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图1 噪声暴露后大鼠 ABR 阈值变化



A: Western blot; B: Western blot 定量分析图; ^a: $P < 0.05$ 。

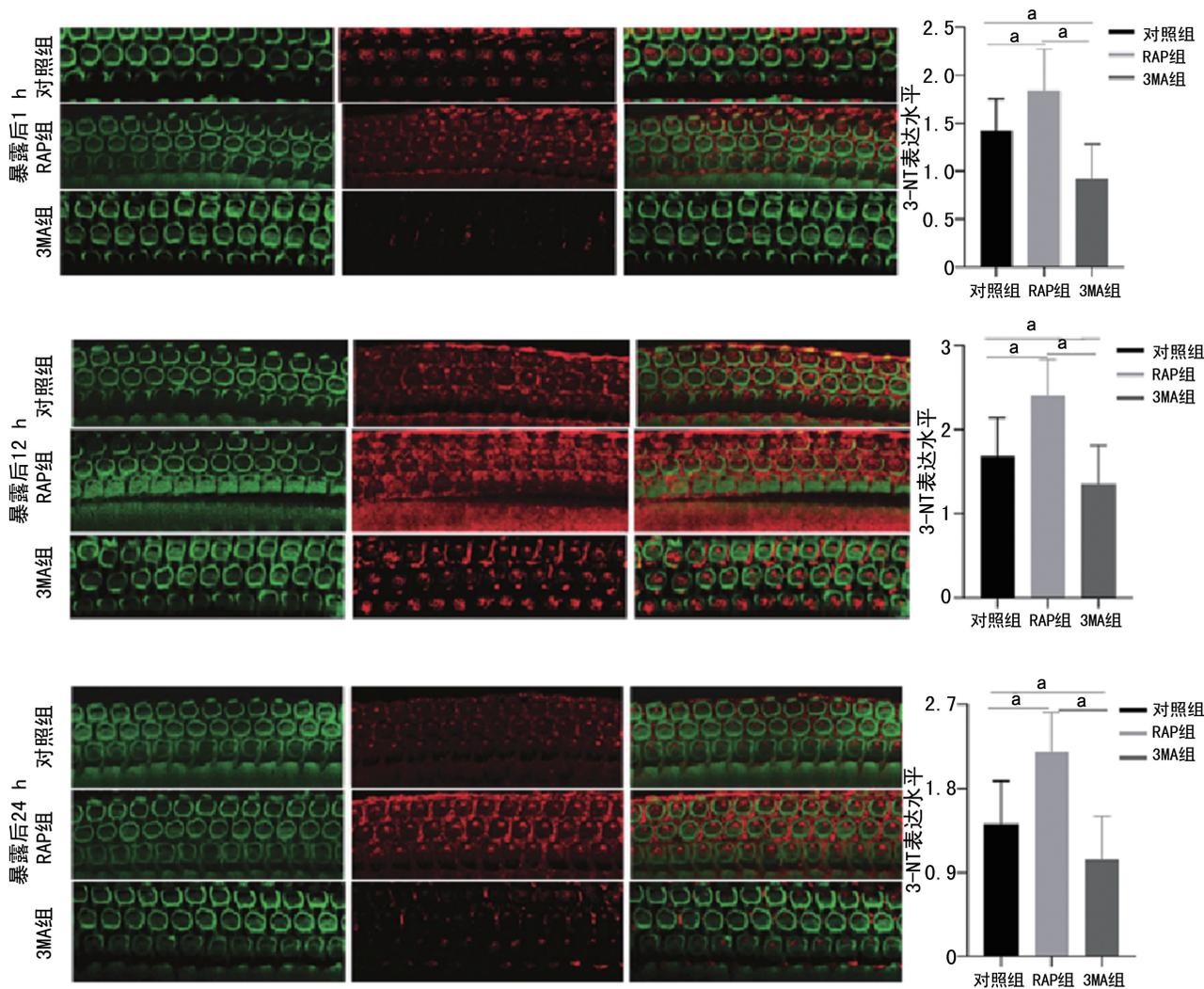
图2 各组大鼠毛细胞自噬标志蛋白表达分析

2.3 抑制自噬能够抑制毛细胞凋亡发生

为验证自噬是否会导致细胞程序性死亡, 本研究

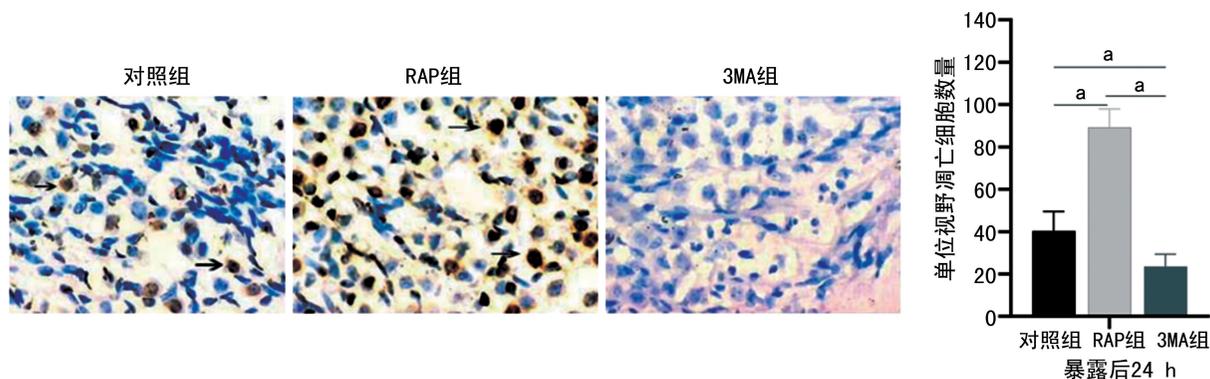
检测了噪声暴露后 24 h 的细胞凋亡情况。结果发现噪声暴露后各组耳蜗毛细胞凋亡较暴露前明显增加,

RAP 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组增加, 而 3MA 组耳蜗毛细胞凋亡较对照组减少(均 $P < 0.05$), 见图 4。



^a: $P < 0.05$ 。

图 3 双重免疫荧光检测各组毛细胞的 OS 损伤情况



^a: $P < 0.05$ 。

图 4 TUNEL(普通法)检测各组毛细胞凋亡的影响

3 讨论

耳蜗毛细胞属高度分化的终末细胞,毛细胞作为听觉传入的重要神经信号传导细胞,它的损伤程度直接反映了听力的受损程度。但毛细胞一旦损伤凋亡,则无法再生,进而出现感音神经性耳聋。因此如何保护毛细胞避免噪声性损伤导致毛细胞死亡成为防治

噪声性耳聋的首选策略。本研究发现,在噪声性耳聋发生时,自噬表达明显上调,OS 标记物如 3-NT 水平明显增加,进而导致毛细胞的程序性凋亡。抑制自噬能够有效改善毛细胞的 OS 损伤,同时明显抑制毛细胞凋亡的发生。

耳蜗毛细胞极易受到噪声的损伤,既往研究证明

噪声引起 OS,耳蜗组织蛋白 3-NT 水平明显增加^[10-12-13]。本研究进一步证明了这一结论,即噪声暴露会导致 OS,耳蜗毛细胞中 3-NT 的表达水平升高。值得注意的是尽管既往文献同时发现 OS 导致细胞凋亡的发生,但其具体途径仍未明确阐述^[14-16]。OS 的形成,如超氧化物、羟基自由基和一氧化氮,可能会根据压力的不同机制而发生。噪声暴露后耳蜗中 OS 系统激活的确切信号机制十分复杂。目前公认有以下几种可能:超氧自由基的增加是由于其他自由基的连锁反应形成,这一过程可能是由于线粒体氧化过程加强所致;组织末梢血管收缩引起的长时间组织缺氧也可能导致 OS 表达增加,或组织局部的缺血再灌注损伤^[14-16]。但在噪声性耳聋中针对毛细胞的损伤凋亡以上理论均有待商榷。

自噬也称为 II 型程序性细胞死亡,参与了许多退变性疾病的发生发展,如帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病,骨性关节炎、风湿性关节炎等^[17-19]。但在噪声性耳聋中,自噬的具体作用机制仍存在争议。自噬和 OS 的相关性仍缺乏系统研究。本研究揭示噪声性耳聋急性期的自噬和 OS 的确切作用机制,结果表明,急性损伤期毛细胞的自噬表达明显增加,诱导细胞通过 OS 系统进入程序性凋亡状态。在抑制自噬表达后 OS 标记蛋白 3-NT 随之下降,同时细胞凋亡数量也明显降低。

综上所述,强噪声暴露后耳蜗毛细胞在急性损伤期通过自噬途径诱导 OS 系统激活,进而诱导细胞程序性死亡。这一结论为噪声性耳聋特别是急性期的防治提供了新的思路和研究方向。通过深入研究自噬和噪声性耳聋的具体作用机制可以为防治噪声性耳聋提供新的药物作用靶点及基因治疗策略。

参考文献

- [1] 管连城,陈雨佳,张孟之,等.从维生素 D 与中医肾藏精、耳聋的关系探讨氨基糖苷类抗生素耳毒性机制[J].中医药导报,2019,25(17):118-120,132.
- [2] SHI X, NUTTALL A L. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress[J]. Brain Res, 2003, 967(1/2):1-10.
- [3] FETONI A R, DE BARTOLO P, ERAMO S L, et al. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense[J]. J Neurosci, 2013, 33(9):4011-4023.
- [4] FETONI A R, PACIELLO F, ROLES I R, et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 135:46-59.
- [5] 弓晶,解新科.内质网应激和细胞自噬对肝细胞凋亡的影响[J].临床肝胆病杂志,2019,35(12):2828-2832.
- [6] 石磊,蒋晴晴,于宁,等.氧化应激在噪声性听力损失中的作用机制及药物防治[J].中国听力语言康复科学杂志,2021,19(2):113-117.
- [7] 于慧柠,郑体花,郑庆印.氧化应激在年龄相关性耳聋中的作用研究进展[J].中华耳科学杂志,2019,17(5):777-782.
- [8] 毕丹,蒋睿果.葛根素注射液联合长春西汀治疗突发性耳聋的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(5):1430-1434.
- [9] 曾友根,朱欠元,曾宪晶,等.脑源性神经营养因子减轻神经性耳聋模型大鼠氧化应激反应的机制探究[J].重庆医学,2020,49(13):2077-2081.
- [10] 刘晓斌,尚万兵,管志江,等.耳复康口服液对豚鼠耳聋模型血清中 SOD、MDA 含量及耳蜗组织形态的影响[J].中医学报,2018,33(3):426-429,472.
- [11] YUAN H, WANG X, HILL K, et al. Autophagy attenuates noise-induced hearing loss by reducing oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(15):1308-1324.
- [12] 宋伟伟.鼓室内注射鼠神经生长因子联合泼尼松龙对突发性耳聋的影响[J].医学研究杂志,2016,45(6):180-183.
- [13] 陈立伟,于宁,翟所强.氧化应激反应与噪声性耳聋[J].中华耳科学杂志,2014(1):155-157.
- [14] 李芊芊.氧化应激诱导细胞凋亡通路的研究进展[J/CD].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2019,19(12):63-64.
- [15] 叶记林,于有江,吴爱莲,等.氧化应激在 TRAIL 诱导 Hela 细胞凋亡中的作用[J].安徽医药,2015,19(11):2090-2093.
- [16] 朱若岑,蒋维维,谭柱良,等.动物体内活性氧、氧化应激与细胞凋亡以及抗氧化剂研究进展[J].中兽医医药杂志,2015,34(3):21-25.
- [17] 杨梦馨,丁佩惠,王一玉,等.细胞自噬参与调控牙周病发病机制的研究进展[J].临床医学进展,2021,11(2):567-574.
- [18] 夏丹.细胞自噬调控的研究进展[J].临床医学进展,2019,9(3):163-179.
- [19] 赵丹,刘玉萍,吴继周,等.自噬与老年病的研究进展[J].生物医学,2017,7(3):31-36.

混合稀释血液透析滤过在维持性血液透析患者中的应用研究*

杨影,唐建英[△],牟娇,曾薇,王婧,杨璐
(重庆医科大学附属大学城医院肾病泌尿中心 401331)

[摘要] **目的** 研究混合稀释血液透析滤过(HDF)模式对维持性血液透析(MHD)患者的应用优势。**方法** 共纳入 132 例 MHD 患者,将其分为前稀释 HDF 组(44 例)、后稀释 HDF 组(44 例)、混合稀释 HDF 组(44 例),对比研究 3 组患者的尿毒素、炎症因子清除效果,瘙痒、骨痛缓解程度及不良反应发生率。**结果** 治疗 6 个月后,混合稀释 HDF 组血磷(P)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、甲状旁腺激素(iPTH)、C 反应蛋白(CRP)均低于前稀释 HDF 组、后稀释 HDF 组,差异有统计学意义(P :均 $P < 0.001$;Scr: $P = 0.009, 0.011$;BUN: $P = 0.004, 0.011$; β_2 -MG: $P = 0.004, 0.004$;iPTH: $P = 0.014, 0.023$;CRP: 均 $P < 0.001$);3 组患者瘙痒、骨痛程度均有所缓解,缓解率:混合稀释 HDF 组 > 前稀释 HDF 组 > 后稀释 HDF 组 ($2.08\% > 1.89\% > 1.59\%$, $4.73\% > 4.17\% > 3.98\%$),差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗期间,不良反应发生率:后稀释 HDF 组 > 前稀释 HDF 组 > 混合稀释 HDF 组 ($13.63\% > 9.09\% > 6.89\%$),差异有统计学意义($P < 0.05$);3 组均未发生过敏反应。**结论** MHD 治疗可明显改善患者微炎症状态、尿毒素水平及瘙痒、骨痛不适,且不良反应发生率较低,其中以混合稀释 HDF 模式透析效率及安全性最高。

[关键词] 血液透析滤过;前稀释;后稀释;混合稀释

[中图分类号] R692.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)07-1117-05

Application of mixed dilution hemodialysis filtration in maintenance hemodialysis patients*

YANG Ying, TANG Jianying[△], MOU Jiao, ZENG Wei, WANG Jing, YANG Lu
(Nephrology and Urology Center, University Town Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective** To study the advantages of mixed dilution hemodialysis filtration (HDF) mode for maintenance hemodialysis (MHD) patients. **Methods** A total of 132 MHD patients were included and divided into the pre-dilution HDF group (44 patients), the post-dilution HDF group (44 patients), and the mixed dilution HDF group (44 patients). The effects of toxin and inflammatory factor clearance, the degree of relief of pruritus and bone pain and the incidence of adverse effects in the three groups were compared and studied. **Results** After 6 months of treatment, the levels blood phosphorus (P), blood creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), β_2 microglobulin (β_2 -MG), parathyroid hormone (iPTH) and C-reactive protein (CRP) in the mixed dilution HDF group were lower than those in the pre-dilution HDF group and post-dilution HDF group, and the differences were statistically significant. (P : all $P < 0.001$; Scr: $P = 0.009, 0.011$; BUN: $P = 0.004, 0.011$; β_2 -MG: $P = 0.004, 0.004$; iPTH: $P = 0.014, 0.023$; CRP: all $P < 0.001$). The pruritus and bone pain was relieved in all three groups, and the remission rate: mixed diluted HDF group > pre-diluted HDF group > post-diluted HDF group ($2.08\% > 1.89\% > 1.59\%$, $4.73\% > 4.17\% > 3.98\%$), the differences were statistically significant ($P < 0.05$). During the treatment period, the incidence of adverse reactions: post-dilution HDF group > pre-dilution HDF group > mixed dilution HDF group ($13.63\% > 9.09\% > 6.89\%$), the differences were statistically significant ($P < 0.05$). No allergic reactions occurred in all three groups. **Conclusion** MHD treatment significantly improved the patients' microinflammatory status, urinary toxin level and relief pruritus and bone pain, and incidence of adverse reactions was low, with the highest efficiency and safety of dialysis in the mixed dilution HDF mode.

[Key words] hemodiafiltration; pre-dilution; post-dilution; mixed dilution

自 1970 年开始以对流为原理的血液滤过或血液透析滤过(hemodiafiltration, HDF)治疗模式在临床中得到了广泛的使用,治疗过程中血液动力学稳定,减少了透析相关性低血压的发生,对小、中分子和蛋白结合毒素等的清除率高,通过减少炎症状态改善营养状态和心血管功能等,最终使患者全因死亡、心脑血管死亡率下降,维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者生存质量提高^[1]。本研究通过增加输液泵和 Y 型接头,改良现有的前稀释或后稀释 HDF 为前后混合稀释,对 MHD 患者在不同血液透析滤过治疗模式下的相关检查、不良反应等进行前瞻性研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院肾病泌尿中心符合入选标准的患者。纳入标准:(1)原发病为慢性肾炎的 MHD 患者,稳定透析 6 个月以上;(2)年龄 18~70 周岁;(3)每周透析 3 次,每周 1 次 HDF,每次 4 h;(4)血管通路为自体动

静脉内瘘,且血流量均能达到 250 mL/min;(5)签署知情同意书。排除标准:(1)血流量欠佳患者;(2)不能耐受 HDF 及不配合治疗患者;(3)严重心、肺、肝功能障碍患者;(4)严重感染及恶性肿瘤患者;(5)高凝状态患者(凝血酶原时间小于 11.0 s,部分凝血酶原时间小于 28 s,国际标准化比值小于 0.8);(6)精神疾病及未成年人。剔除标准:(1)治疗过程中出现严重不良反应而未完成治疗者;(2)中途退出试验者。本研究获得本院伦理委员会批准(LL-202126)。

1.2 前瞻性分析

2021 年 1—6 月于本院肾病泌尿中心规律透析的原发病为慢性肾炎的患者 150 例,根据纳入排除标准排除其中 18 例,剩余 132 例,其中男 90 例,女 42 例。入组患者分为前稀释 HDF 组(前稀释 HDF 组)、后稀释 HDF 组(后稀释 HDF 组)及混合稀释 HDF 组(混合稀释 HDF 组),每组患者 44 例(男=30 例,女=14 例)。3 组患者入组前的基本临床资料组间差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 3 组患者的基本临床资料($\bar{x}\pm s$)

项目	前稀释 HDF 组($n=44$)	后稀释 HDF 组($n=44$)	混合稀释 HDF 组($n=44$)	F/χ^2	P
男性[$n(\%)$]	30(68.2)	30(68.2)	30(68.2)	0.000	1.000
体重(kg)	62.09±9.83	61.68±10.77	61.51±10.74	0.036	0.964
透析龄(月)	28.20±11.01	28.45±10.18	27.77±11.60	0.044	0.957
P(mmol/L)	2.08±0.67	2.18±0.72	1.84±0.72	2.886	0.059
Scr($\mu\text{mol/L}$)	958.75±397.77	1 013.67±323.98	901.26±283.83	1.213	0.301
BUN($\times 10^3$ mg/L)	22.57±6.98	23.78±6.91	21.04±8.81	1.426	0.244
$\beta 2$ -MG($\times 10^3$ mg/L)	28.58±13.04	30.66±11.16	32.60±11.93	1.219	0.299
iPTH($\times 10^3$ pg/L)	333.19±181.41	347.99±210.68	312.90±194.09	1.061	0.349
CRP(mg/L)	10.59±2.20	10.91±2.38	11.00±2.35	0.383	0.682

P:血磷;Scr:肌酐;BUN:尿素氮; $\beta 2$ -MG: $\beta 2$ 微球蛋白;iPTH:甲状旁腺激素;CRP:C 反应蛋白。

1.2 方法

选用德国费森尤司 4008HOn-line 血液透析滤过机及德国费森尤司 4008S 血液透析机、碳酸氢盐透析液、聚砜膜 F $\times 80$ 血滤器。透析液的流速设置为 500~600 mL/min,血液流速设置为 200~300 mL/min,置换液由透析机进行连续制备,确保其无菌、无热源。前稀释法向动脉壶内注入置换液,根据机器跨膜压的变化及患者个体状况调整置换液量。后稀释法向静脉壶内注入置换液,置换液量换算公式为:置换液量=每分钟血流量 \times 透析时间 $\times 30\%$ 超滤量,患者低分子肝素使用量遵循常规用量。混合稀释在滤器前、后两端同时补充置换液,前、后两端补充置换液量相同,总体补充速度为 60 mL/min。

1.3 检测指标

入组前及试验 6 个月后由体外循环管路动脉端口取血样本 5 mL 进行化验,送检 P、Scr、BUN、iPTH、 $\beta 2$ -MG、CRP。通过视觉模拟评分(VAS)法对

患者皮肤瘙痒及骨痛程度进行评估,缓解率=(试验前分数-试验后分数)/试验前分数 $\times 100\%$ 。观察透析器管路及透析器内血液颜色,血液是否变深变暗,动、静脉壶壁是否有血液黏附或小凝块。如果壶壁干净,说明无循环管路凝血,否则有。观察有无皮肤黏膜淤点、瘀斑、牙龈出血、痰中带血、穿刺部位渗血或拔针后凝血不良等出血情况。观察透析过程中高血压($\geq 140/90$ mm Hg)、低血压($< 90/60$ mm Hg)、过敏(皮疹等)情况。

1.4 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组内比较采用配对样本 t 检验;计数资料采用百分率($\%$)描述,比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组治疗前、后比较

进行自身对照发现,所有患者治疗前、后其 P、Scr、BUN、iPTH、 β 2-MG、CRP 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 3 组患者组内比较($\bar{x} \pm s, n = 132$)

项目	前稀释 HDF 组	后稀释 HDF 过组	混合稀释 HDF 组	$t_{\text{合计}}$	$P_{\text{合计}}$
P(mmol/L)				1.993	0.048
治疗前	2.08±0.67	2.18±0.72	1.84±0.72		
治疗后	1.99±0.54	2.12±0.53	1.62±0.69		
Scr(μ mmol/L)				5.891	<0.001
治疗前	958.75±397.77	1 013.67±323.98	901.26±283.83		
治疗后	875.52±342.05	973.25±342.32	795.26±287.32		
BUN($\times 10^3$ mg/L)				8.635	<0.001
治疗前	22.57±6.98	23.78±6.91	21.04±8.81		
治疗后	20.42±5.12	20.41±5.77	16.61±7.11		
β 2-MG($\times 10^3$ mg/L)				9.346	<0.001
治疗前	28.58±13.04	30.66±11.16	32.60±11.93		
治疗后	21.48±6.62	21.02±6.32	16.96±6.44		
iPTH($\times 10^3$ pg/L)				3.775	<0.001
治疗前	333.19±181.41	347.99±210.68	312.90±194.09		
治疗后	286.96±186.05	277.09±164.17	246.21±145.59		
CRP(mg/L)				16.469	<0.001
治疗前	10.59±2.20	10.91±2.38	11.00±2.35		
治疗后	9.23±2.11	8.82±2.44	7.13±2.13		

2.2 各组尿毒素及炎症因子清除情况比较

各组治疗后 P、Scr、BUN、iPTH、 β 2-MG、CRP 差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。通过 LSD 分析发现,治疗 6 个月后,混合稀释 HDF 组 P、Scr、BUN、 β 2-MG、iPTH、CRP 均小于前稀释 HDF 组及后稀释 HDF 组,差异有统计学意义(P :均 $P \leq 0.001$; Scr: $P = 0.009, 0.011$; BUN: $P = 0.004, 0.011$; β 2-MG: $P = 0.004, 0.004$; iPTH: $P = 0.014, 0.023$; CRP:均 $P < 0.001$),见表 4。

表 3 3 组患者治疗后的尿毒素及炎症因子等指标的比较($\bar{x} \pm s, n = 132$)

项目	前稀释 HDF 组	后稀释 HDF 过组	混合稀释 HDF 组	P
P	1.99±0.54	2.12±0.53	1.62±0.69	<0.001
Scr	875.52±342.05	973.25±342.32	795.26±287.32	0.040
BUN	20.42±5.12	20.41±5.77	16.61±7.11	0.004
β 2-MG	21.48±6.62	21.02±6.32	16.96±6.44	0.002
iPTH	286.96±186.05	277.09±164.17	246.21±145.59	0.045
CRP	9.23±2.11	8.82±2.44	7.13±2.13	<0.001

2.3 各组患者瘙痒及骨痛缓解率比较

治疗前、后通过 VAS 对患者瘙痒及骨痛程度进行评估,结果显示 3 组患者瘙痒、骨痛程度均有所缓解,缓解率:混合稀释 HDF 组 > 前稀释 HDF 组 > 后稀释 HDF 组(2.08% > 1.89% > 1.59%, 4.73% >

4.17% > 3.98%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 3 组患者治疗后的毒素及炎症因子指标的 LSD 分析(P)

项目	组别	前稀释 HDF 组	后稀释 HDF 组	混合稀释 HDF 组
P	前稀释 HDF 组	—	0.766	<0.001
	后稀释 HDF 过组	0.766	—	0.001
	混合稀释 HDF 组	<0.001	0.001	—
Scr	前稀释 HDF 组	—	0.161	0.009
	后稀释 HDF 过组	0.161	—	0.011
	混合稀释 HDF 组	0.009	0.011	—
BUN	前稀释 HDF 组	—	0.991	0.004
	后稀释 HDF 过组	0.991	—	0.011
	混合稀释 HDF 组	0.004	0.011	—
β 2-MG	前稀释 HDF 组	—	0.739	0.004
	后稀释 HDF 过组	0.739	—	0.004
	混合稀释 HDF 组	0.004	0.004	—
iPTH	前稀释 HDF 组	—	0.112	0.014
	后稀释 HDF 过组	0.112	—	0.023
	混合稀释 HDF 组	0.014	0.023	—
CRP	前稀释 HDF 组	—	0.383	<0.001
	后稀释 HDF 过组	0.383	—	0.001
	混合稀释 HDF 组	<0.001	0.001	—

—:此项无数据。

2.4 各组不良反应发生率比较

治疗期间,不良反应发生率比较结果为:后稀释 HDF 过组 > 前稀释 HDF 组 > 混合稀释 HDF 组 (13.63% > 9.09% > 6.89%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 3 组患者治疗期间的不良反应比较

项目	前稀释 HDF 组	后稀释 HDF 过组	混合稀释 HDF 组
过敏(<i>n</i>)	0	0	0
低血压(<i>n</i>)	1	2	1
高血压(<i>n</i>)	3	0	2
出血(<i>n</i>)	0	1	0
凝血(<i>n</i>)	0	3	0
不良反应发生率(%)	9.09	13.63	6.89

3 讨 论

以弥散原理清除毒素的血液透析,主要清除尿素氮等水溶性小分子毒素,是目前终末期肾衰竭患者最广泛使用的治疗模式,但随着透析时间延长,心脑血管疾病、感染等并发症成为 MHD 患者的主要死因,其年死亡率高达 10%~20%^[2]。随着对中大分子、蛋白结合毒素的认识,对流方式逐渐现世,其涉及的是在外力作用下溶质、溶剂或整个溶液传质过程,PAWEENA 等^[3]通过对约 65 项试验进行总结发现:与血液透析相比,对流疗法明显降低全因死亡率、心血管死亡率、全因住院率及透析相关低血压发生率,对低分子量、中等大小分子量和蛋白质结合的溶质及炎症介质有较好清除效果,且其对心脏形态和功能参数、血压和贫血参数都无影响。这与 NISTOR 等^[4]、FRANCISCO 等^[5]得出的结论一致。HDF 由于使用高通量滤器并结合了弥散与对流的溶质清除原理,既有利于低分子量、中等大小分子量及蛋白结合溶质的清除,同时也有利于炎症介质的清除,改善患者营养状态,最终使患者全因死亡率、心脑血管死亡率下降,患者生存质量提高。依据置换液进入血液位置,HDF 分为前稀释、后稀释和前后混合稀释、中间稀释 4 种治疗模式^[6]。

前稀释是置换液从透析器前进入血液,透析器内血液稀释,一方面使体外循环管路凝血风险下降,减少了抗凝剂的需求^[7-8],且滤器中血液处于良好的流变学及压力状态,明显提高了置换液交换量。另一方面,血液稀释有助于蛋白结合毒素的游离,增加蛋白结合毒素的清除,且血液稀释后,血浆和血液细胞之间的毒素浓度梯度将导致其从细胞内到细胞外的转移,使得前稀释清除率更高。其次血液稀释还可减少血细胞与透析膜的接触、减少自由基的产生等,提高生物相容性^[9-10]。但血液稀释导致透析膜两侧溶质浓度差下降,最终导致毒素清除率下降,且置换液总量高,增加了透析成本。2007 年一项研究显示,在其他条件相同的情况下,随着置换液流量增加,尿素清除

率在后稀释模式下逐步增加,而前稀释模式则逐步下降^[11]。说明小分子溶质随着输入速度增加总清除率下降,前稀释若想通过无限制增加置换液剂量达到理想溶质清除效果可能会适得其反。

理论上后稀释是最有效的 HDF 模式,透析器内血液未稀释,能够最有效地清除毒素,且所需置换液总量低,透析成本较低^[12],然而一方面由于置换液从透析器后进入血液,透析器内血液浓缩,导致凝血风险增加,肝素使用量大,因此不宜用于高血球压积、高血液黏滞度、抗凝剂使用禁忌的患者,且大剂量肝素应用常导致血小板减少、血脂异常、自发性出血、瘙痒、骨质疏松等^[13],引起出血的并发症也居高不下;另一方面,由于血流阻力大,在治疗后期机器跨膜压报警率高,血泵停泵概率高,且血液中蛋白在透析膜表面易沉积形成蛋白膜,导致毒素清除率下降、蛋白丢失高^[14],因此不宜用于糖尿病、老年、营养状态差的患者,并且滤器内流变学异常及血液浓缩,导致蛋白变性、血细胞之间相互作用增强、血细胞破坏,导致部分患者不能耐受 HDF 治疗,在治疗过程中出现穿刺血管痉挛,疼痛难忍,上机后胸闷不适(排除其他原因)等^[15-16]。且长期进行后稀释将导致滤器及体外循环管路寿命减低,透析成本增高^[17]。

混合稀释是置换液分别从滤器前和滤器后进入,这需要具备 2 个置换液泵的透析设备;中间稀释需要特殊的透析器,透析器内纤维素为 U 型,与置换液流向相同的纤维素为前稀释,反向的为后稀释^[18]。这 2 种置换模式均为同时进行前稀释和后稀释,通过增加前稀释剂量弥补受血流量影响后稀释置换剂量的不足,改善滤器凝血,减少肝素使用剂量,降低机器跨膜压报警概率,改善患者治疗舒适度,增加尿素素及炎症介质清除,减少蛋白丢失等。2012 年法国罗恩大学开展 1 项试验,共纳入 38 例患者,分为混合稀释与前稀释,结果发现混合稀释清除效果优于前稀释,蛋白丢失低于前稀释。同时 POTIER 等^[19]、苟晶琦^[20]也发现混合稀释较前稀释、后稀释在溶质清除率方面更具优势,回顾本研究结果,亦表明混合稀释能更大程度地清除患者尿毒素,改善患者微炎症状态,减少相应并发症。同时本研究也发现,混合稀释不良反应发生率较前、后稀释更低,特别是滤器凝血方面,在整个试验过程中未发生 1 例凝血事件,说明混合稀释能在保证透析质量的情况下,获得更高安全性,极大地延长了体外循环管路及滤器使用寿命,这与张敏等^[21]、PEDRINI 等^[22]的研究结果也一致。

本研究局限性在于病例数较少,随访时间相对较短,着重分析了小中分子清除效率,未考虑蛋白结合毒素的清除效率,关注的炎症因子较为单一,对于不同透析模式对心血管系统的长期影响、患者生活质量及生存率未进一步研究,治疗过程中未排除护理人员的资质与操作对试验结果的影响,这些因素仍有待进一步考虑。

本研究通过对前稀释 HDF、后稀释 HDF、混合稀释 HDF 方法治疗前、后 P、Scr、BUN、iPTH、 β 2-MG、CRP、不良反应及瘙痒、骨痛情况进行分析,发现 HDF 能充分保证 MHD 患者治疗有效性,其中混合稀释法对溶质清除效果更佳,可明显改善患者骨痛、瘙痒不适,治疗过程中不良反应发生率低,安全性更高,值得临床推广。

参考文献

- [1] AKIZAWA T, KOIWA F. Clinical expectation of online hemodiafiltration: a Japanese perspective[J]. *Blood Purif*, 2015, 40(Suppl 1): 12-6.
- [2] MOSTOVAYA I M, BLANKESTIJN P J, BOTS M L, et al. Clinical evidence on hemodiafiltration: a systematic review and a meta-analysis[J]. *Semin Dial*, 2014, 27(2): 119-127.
- [3] PAWEENA S, MONCHAI S, JABER B L. Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013(11): 2859-2874.
- [4] NISTOR I, PALMER S C, CRAIG J C, et al. Convective versus diffusive dialysis therapies for chronic kidney failure: an updated systematic review of randomized controlled trials[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 63(6): 954-967.
- [5] FRANCISCO R C, ALOHA M, RAMÓN P S. Effects of high-efficiency postdilution online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis on serum phosphorus and cardiac structure and function in patients with end-stage renal disease[J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(5): 1373-1378.
- [6] TATTERSALL J E, WARD R A, EUDIAL group, et al. Online haemodiafiltration: definition, dose quantification and safety revisited[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(3): 542-550.
- [7] 刘伟. 在线血液透析滤过不同稀释模式和稀释比例对溶质清除效率的影响[D]. 唐山: 华北理工大学, 2016(3): 49.
- [8] 李密, 谢琼, 蒲军, 等. 联机血液透析滤过前后交替稀释法对肝素用量的影响[J]. *西部医学*, 2012, 2(24): 248-249.
- [9] MASAKANE I, ESASHI S, IGARASHI H. Biocompatibility of predilution on-line hemodiafiltration[J]. *Blood Purif*, 2013, 35(s1): 34-38.
- [10] TSUCHIDA K, MINAKUCHI J. Clinical benefits of predilution on-line hemodiafiltration[J]. *Blood Purification*, 2013, 35(s1): 18-22.
- [11] 龚德华. 血液透析滤过中前稀释和后稀释的选择[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2016(4): 356-357.
- [12] MOSTOVAYA I M, GROOTEMAN M P, BASILE C, et al. High convection volume in online post-dilution haemodiafiltration: relevance, safety and costs[J]. *Clin Kidney J*, 2015, 8(4): 368-373.
- [13] 何长民, 张训. 肾脏替代治疗学[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2006: 66-70.
- [14] YAMASHITA, AKIHIRO C. Diafilters for predilution and postdilution on-line hemodiafiltration[J]. *Blood Purification*, 2013, 35(s1): 29-33.
- [15] 赵景宏. 血液透析滤过: 选择前稀释还是后稀释[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2016, 35(4): 354-355.
- [16] SAKURAI K, SAITO T, YAMAUCHI F, et al. Comparison of the effects of predilution and postdilution hemodiafiltration on neutrophils, lymphocytes and platelets[J]. *J Artif Organs*, 2013, 16(3): 316-321.
- [17] 张凌. 连续性肾脏替代治疗体外循环寿命的影响因素[J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(10): 580.
- [18] SUSANTITAPHONG P, TIRANATHANAGUL K, KATAVETIN P, et al. Efficacy Comparison between simple mixed-dilution and simple mid-dilution on-line hemodiafiltration techniques: a cross-over study[J]. *Artificial Organs*, 2012, 36(12): 1059-1065.
- [19] POTIER J, LE ROY F, FAUCON J P, et al. Elevated removal of middle molecules without significant albumin loss with mixed-dilution hemodiafiltration for patients unable to provide sufficient blood flow rates[J]. *Blood Purification*, 2013, 36(2): 78-83.
- [20] 苟晶绮. 混合稀释法在高原地区血液透析滤过治疗中的应用及护理观察[J]. *中国血液净化*, 2019, 18(10): 728-731.
- [21] 张敏, 段棣飞, 张凌, 等. 2 种不同稀释方式在连续性静脉-静脉血液透析滤过治疗中应用效果分析[J]. *中国血液净化*, 2019, 18(12): 822-825.
- [22] PEDRINI L A, WIESEN G. Overcoming the limitations of post-dilution on-line hemodiafiltration: mixed dilution hemodiafiltration. [J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 175: 129-140.

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.008

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1150.010.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1150.010.html(2021-12-16))

鱼腥草素钠联合亚胺培南西司他丁钠对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌作用的研究*

周孟杰¹,毛建梅¹,蔡燕^{2,3△}

(川北医学院附属医院:1.检验科;2.产前诊断中心;3.风湿免疫研究所,四川南充 637000)

[摘要] **目的** 探讨鱼腥草素钠联合亚胺培南西司他丁钠对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)的联合抑菌作用。**方法** 选取 10 株 CRAB 为实验对象,采用微量肉汤稀释法、琼脂二倍稀释法测定鱼腥草素钠、亚胺培南西司他丁钠单药及联合用药对 CRAB 菌株生长的影响。**结果** 鱼腥草素钠能抑制 CRAB 生长,微量肉汤稀释法测得鱼腥草素钠对 CRAB 的最低抑菌浓度(MIC)在 1 500~3 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$;琼脂二倍稀释法测得鱼腥草素钠对 CRAB 的最低抑菌浓度在 2 500~3 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$;2 种方法检测鱼腥草素钠与亚胺培南西司他丁钠的部分抑菌浓度指数(FICI)均在 0.5~1.0,抑菌效应表现为相加作用。**结论** 鱼腥草素钠能抑制 CRAB 菌株生长,与亚胺培南西司他丁钠联合具有相加作用。

[关键词] 鱼腥草素钠;亚胺培南西司他丁钠;耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌;相加作用

[中图分类号] R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1122-05

Antibacterial effects of sodium houttuynon combined with imipenem cilastatin sodium against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro*

ZHOU Mengjie¹, MAO Jianmei¹, CAI Yan^{2,3△}

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Prenatal Diagnosis Center; 3. Institute of Rheumatism and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the combined antibacterial effect of sodium houttuynon combined with imipenem cilastatin sodium on carbapenem-resistant acinetobacter baumannii (CRAB). **Methods** A total of ten clinical strains of CARB were selected as study subjects. Microdilution broth method and double agar dilution method were used to detect the effects of sodium houttuynon and imipenem cilastatin sodium and their combination on the growth of the CRAB strain. **Results** Sodium houttuynon had a bacteriostatic effect on the CRAB. The minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium houttuynon of the microdilution broth method was 1 500—3 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while that of the double agar dilution method was 2 500—3 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of sodium houttuynon and imipenem cilastatin sodium detected by the two methods were 0.5—1.0, and the bacteriostatic effect showed an additive effect. **Conclusion** Sodium houttuynon has the bacteriostasis against effect on CRAB and has an additive effect with imipenem cilastatin sodium.

[Key words] sodium houttuynon; imipenem cilastatin sodium; carbapenem-resistance acinetobacter baumannii; additive effect

鲍曼不动杆菌是医院感染中重要的多重耐药细菌之一,其感染死亡率可达 35%^[1]。2019 年全国细菌耐药监测数据显示,鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率高达 55.5%和 57.1%,并呈现多重耐药^[2],致使临床能选择的抗菌药物越来越少。鱼腥草具有抗菌作用,对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等

均具有抑菌作用^[3],复方鱼腥草能抑制鲍曼不动杆菌生长^[4]。本研究以鱼腥草挥发油中的活性成分癸酰乙醛亚硫酸钠加成物(即鱼腥草素钠)为研究对象^[3],对鱼腥草素钠联合亚胺培南西司他丁钠对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌(carbapenem resistant acinetobacter baumannii, CRAB)的抑菌效果进行研究,以期

* 基金项目:四川省卫生健康委员会科研课题(20PJ145);2019 年南充市市校科技战略合作专项(19SXHZ0291)。作者简介:周孟杰(1988—),检验技师,硕士,主要从事细菌耐药机制研究。△ 通信作者, E-mail: caiyandd@163.com。

为中药治疗 CRAB 感染提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 实验菌株来源

收集 2018 年 1—4 月川北医学院附属医院微生物室鉴定分离的 10 株 CRAB, 均为呼吸道来源标本; 质控菌株 ATCC19606 为川北医学院附属医院风湿免疫研究所保存的菌株。

1.1.2 仪器和主要试剂、药品

SJ-CJ-2FD 超净工作台、THZ-92A 恒温空气摇床、DHP 420 电热恒温培养箱、P200+超微量核酸蛋白分析仪、Tecan 微孔板酶标仪。鱼腥草素钠(西安开来生物工程有限公司, 规格 10.0 g, 批号 K187155); 亚胺培南西司他丁钠(美国 Merck Sharp & Dohme Corp 公司, 规格 1.0 g, 其中含亚胺培南 500 mg, 西司他丁钠 500 mg, 批号 S026857); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 德国 BioFroxx 公司, 批号 EZ6688D183); 水解酪蛋白(MH)培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司), MH 琼脂培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司), 二甲基亚砷(DMSO, 成都市科隆化学制品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备

将 10 株 CRAB 及 ATCC19606 在 MH 琼脂平板中划线培养 9~12 h, 挑取单克隆菌落接种于 1 mL MH 肉汤培养基中, 置于 37 °C 空气恒温摇床(120 r/min)培养 10~12 h。将过夜培养的菌液离心(8 000 r/min)3 min, 去上清液, 加入 1 mL 生理盐水重悬菌液; 用超微量核酸蛋白分析仪在 600 nm 处检测菌液吸光度(A)值, 并用生理盐水将菌液 A 值调至 1.0 (约等于 0.5 麦氏浊度, 菌量约 1.5×10^8 cfu/mL), 再用 MH 液体培养基将菌液稀释 1 000 倍, 放置于 4 °C 冰箱中, 30 min 内使用。

1.2.2 微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)

1.2.2.1 MH 肉汤培养基制备

称取 6.25 g MH 肉汤培养基于螺口试剂瓶中, 加入 250 mL 去离子水, 震荡摇匀使培养基溶解, 121 °C 高压灭菌 20 min, 生物安全柜放凉备用。

1.2.2.2 药物配制

电子天平准确称取鱼腥草素钠粉剂, 加入灭菌 MH 肉汤培养基, 用漩涡震荡仪震荡混匀, 配制成浓度为 500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000、4 500、5 000、5 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鱼腥草素钠 MH 溶液; 吸取 1 mg/mL 的亚胺培南西司他丁钠原液, 按上述方法配制成浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的亚胺培南西司他丁钠 MH 溶液; 用生理盐水配制浓度为 5 mg/mL MTT 溶液, 以上溶液用 0.25 μm 的细菌滤器过滤后备用, 放置于 4 °C 冰箱避光保存。

1.2.2.3 接种

取无菌的 96 孔板, 各取 20 μL 稀释好的菌悬液和含药 MH 液体培养基 80 μL 接种到 96 孔板对应的孔中, 设置不含细菌的亚胺培南西司他丁钠药物对照、不含细菌的鱼腥草素钠药物对照、不含细菌及药物的 MH 阴性对照、不含药物的细菌阳性对照; 每孔液体总体积 100 μL , 不足者以 MH 培养基补入。每个药物浓度设置 3 个复孔。加样完毕后置于 37 °C 空气摇床震荡(100 r/min)培养 8~9 h。到达培养时间后, 每孔加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL MTT, 放置于 37 °C 空气摇床震荡(100 r/min)培养 2 h, 加入 100 μL DMSO, 放置于震荡(100 r/min)摇床 10 min, 将肉眼观察无细菌生长的培养孔所对应的药物浓度作为相应菌株的 MIC。

1.2.3 琼脂二倍稀释法测定 MIC

1.2.3.1 含药 MH 琼脂平板制备

制备鱼腥草素钠含药 MH 琼脂平板浓度为 250、500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000、4 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 亚胺培南西司他丁钠含药 MH 琼脂平板浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。含药 MH 琼脂平板按 $V_{\text{药物}} : V_{\text{琼脂培养基}} = 1 : 9$ 比例, 总体积 10 mL。用电子天平称取鱼腥草素钠粉剂所需量及移液枪准确吸取所需亚胺培南西司他丁钠原液量并加入无菌试管, 加入 1 mL 灭菌 MH 液体培养基并混匀; MH 琼脂培养基用去离子水溶解后高压灭菌, 待冷却至 60 °C 左右用无菌吸管吸取 9 mL 至无菌试管, 吹打混匀后倒入无菌平板, 制成含药 MH 琼脂平板。凝固后密封保存, 放置于 4 °C 冰箱备用, 放置时间不要超过 10 d。

1.2.3.2 接种

用生理盐水将过夜培养的 10 株菌株及 ATCC19606 的菌液 A 值调至 1.0, 并用 MH 液体培养基将菌液稀释 1 000 倍备用。取 2 μL 接种于划区的含药 MH 琼脂平板, 设置 1 个平行对照, 放入 37 °C 孵箱中正面放置 30 min, 待干后将培养皿倒置, 培养 9~10 h 后, 在接种区域加入 5 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT, 放置于孵箱中孵育 1 h 后观察结果。将肉眼观察无细菌生长或生长明显受抑制的培养孔所对应的药物浓度作为相应菌株的 MIC, 实验重复 3 次。

1.2.4 微量肉汤稀释法-棋盘滴定法检测联合抑菌作用

根据 MIC 值分别设定 2 种药物终浓度为 2 MIC, 1 MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC, 采用棋盘滴定法测分级抑制浓度。设置药物对照、MH 阴性对照、阳性对照。每孔总体积 100 μL , 其中鱼腥草素钠 80 μL , 亚胺培南西司他丁钠 10 μL , 菌液 10 μL 。加样完毕后放置于 37 °C 空气摇床震荡(120 r/min)培养 9 h, 加入 MTT 10 μL , 放入 37 °C 空气摇床震荡(120 r/min)培养 1 h, 加入 100 μL DMSO, 轻轻震荡

混匀 10 min,肉眼观察以未出现细菌生长的孔对应的浓度为 MIC 值,实验重复 3 次。

1.3.5 琼脂二倍稀释法检测联合抑菌作用

根据菌株单药时 MIC 值设定联合用药浓度,鱼腥草素钠浓度值为 4 000、2 000、1 000、5 00、250、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与亚胺培南西司他丁钠浓度值 80、40、20、10、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 联合用药组合制作含药平板,设置阳性对照、空白对照。取 2 μL 菌液接种于划区的平皿,设置 1 个平行对照,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中正面放置 30 min,待干后将培养皿倒置,培养 9 h 后,在接种区域加入 5 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT,放置于孵箱中孵育 1 h,观察结果。将肉眼观察无细菌生长的培养孔所对应药物浓度作为相应菌株的 MIC,实验重复 3 次。

1.3.6 部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)和部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)计算

参照 PÁEZ 等^[5]和 ELEMAM 等^[6]方法, FIC 为 A 药或 B 药在联合用药中的 MIC 与同一实验中其单药 MIC 的比值,即 $FIC = A \text{ 药联合 MIC (或 B 药联合 MIC) / A 单药 MIC (或 B 单药 MIC)}$; FICI 为 A 药 FIC 值加上 B 药 FIC 值,即 $FICI = MIC(A \text{ 药联合}) / MIC(A \text{ 药单用}) + MIC(B \text{ 药联合}) / MIC(B \text{ 药单用})$ 。FICI 结果判读标准:当 $FICI < 0.5$ 时,2 种药为协同作用;当 FICI 为 0.5~1.0 时,2 种药为相加作用;当 FICI 为 1.0~<4.0 时,2 种药为无关作用;当 $FICI > 4.0$ 时,2 种药为拮抗作用。

2 结 果

2.1 微量肉汤稀释法和琼脂二倍稀释法单药 MIC 值

根据肉眼观察无细菌生长的培养孔对应的药物浓度作为 MIC 值,微量肉汤稀释法中亚胺培南西司他丁钠对 CRAB 的 MIC 在 20~45 $\mu\text{g}/\text{mL}$,琼脂二倍稀释法中亚胺培南西司他丁钠对 CRAB 的 MIC 在 25~55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。参照临床实验室标准化学会耐药折点药敏结果判定标准进行结果判读,10 株实验菌株均为亚胺培南西司他丁钠耐药菌株。鱼腥草素钠能抑制 CRAB 的生长,结果显示在微量肉汤稀释法中鱼腥草素钠对 CRAB 的 MIC 在 1 500~3 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,琼脂二倍稀释法中鱼腥草素钠对 CRAB 的 MIC 在 2 500~3 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见表 1。

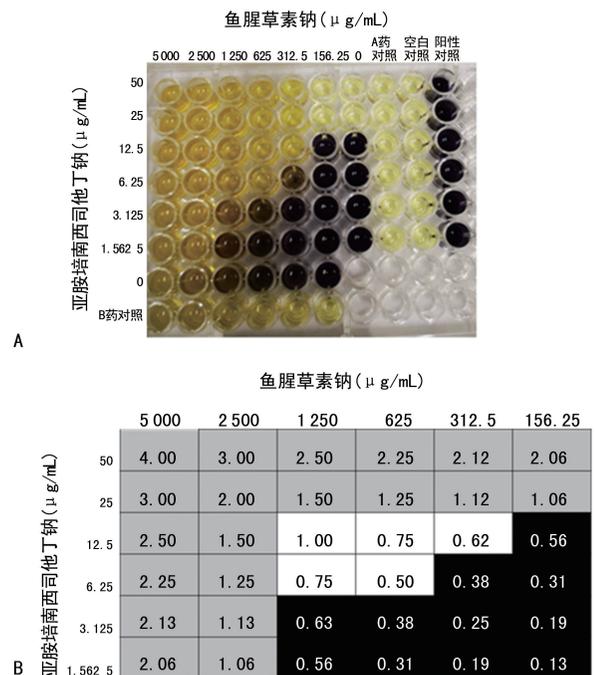
2.2 亚胺培南西司他丁钠和鱼腥草素钠的联合抑菌效果

本实验采用 2 种方法检测亚胺培南西司他丁钠(A 药)和鱼腥草素钠(B 药)的联合抑菌效果,在培养孔中未见细菌生长且 $FICI \leq 1$ 时其联合抑菌效果表现为协同作用。以 3 号菌株为例,在微量肉汤稀释法中亚胺培南西司他丁钠(A 药)MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,鱼腥草素钠(B 药)MIC 值为 2 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$;在琼脂二倍稀释法中亚胺培南西司他丁钠(A 药)MIC 值为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (解释:琼脂稀释法中鱼腥草素钠浓度采用

4 000、2 000、1 000、5 00、250、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚胺培南西司他丁钠浓度 80、40、20、10、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制作含药 MH 琼脂平板),鱼腥草素钠(B 药)MIC 值为 4 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,图 1B、图 2C 所示白色区域表示对应的培养孔中无肉眼可见细菌生长,且 2 种药物联合时 $FICI \leq 1$;3 号菌株 FICI 在 0.5~1.0,根据 FICI 值判读 2 种药物对 3 号菌株的联合抑菌效果为协同作用,见图 1、2。

表 1 微量肉汤稀释法和琼脂稀释法单药 MIC 值($\mu\text{g}/\text{mL}$)

菌株编号	微量肉汤稀释法		琼脂二倍稀释法	
	鱼腥草素钠 MIC	亚胺培南西司他丁钠 MIC	鱼腥草素钠 MIC	亚胺培南西司他丁钠 MIC
1	3 500	45	3 000	55
2	2 500	20	3 000	35
3	2 500	25	3 000	45
4	3 000	30	3 000	45
5	3 500	35	3 000	50
6	3 000	30	3 000	45
7	3 000	35	3 000	45
8	2 000	30	3 000	45
9	2 000	30	2 500	35
10	1 500	20	3 000	25
ATCC19606	2 000	<5	3 000	<10



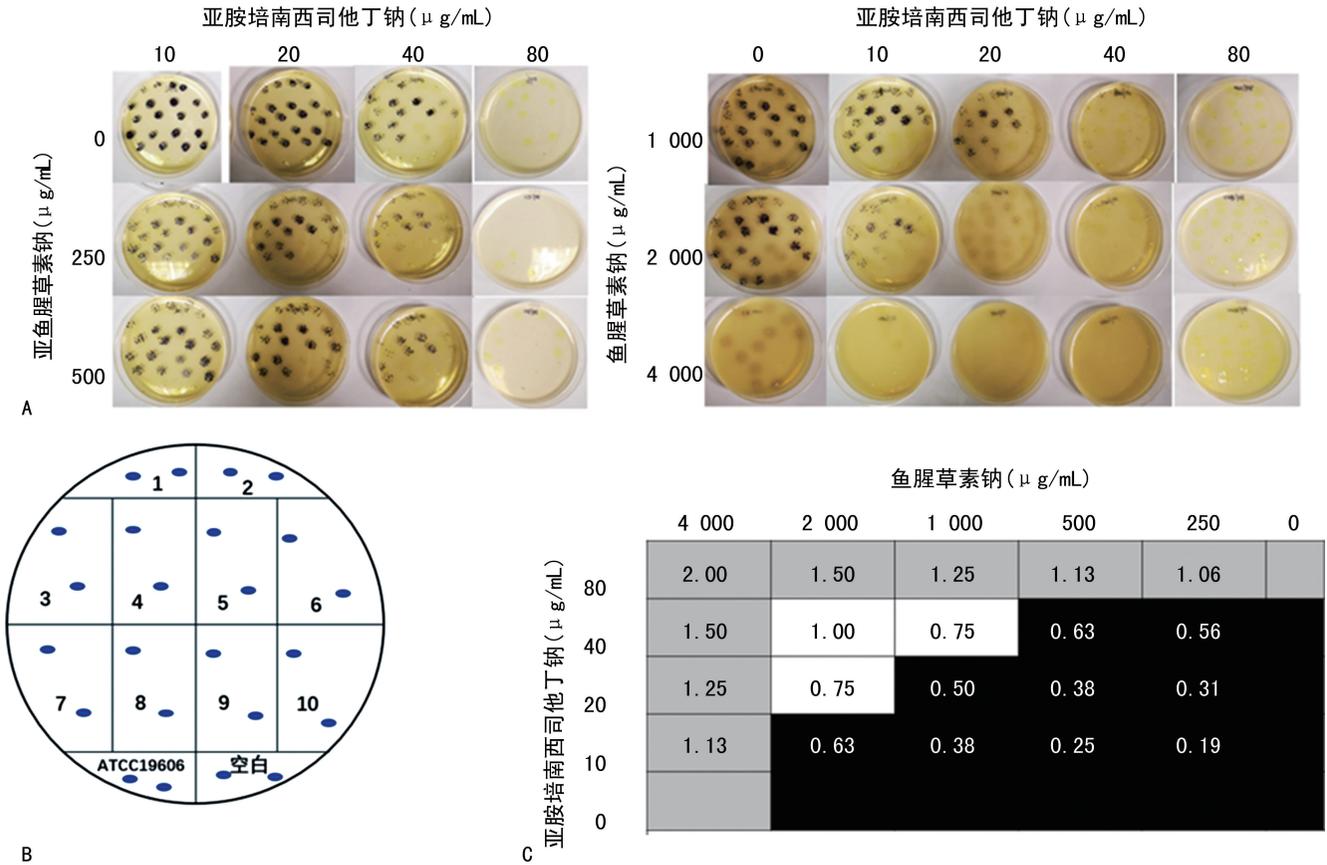
A: 微量肉汤稀释法-棋盘滴定法检测联合抑菌作用;B: 3号菌株联合用药结果。亚胺培南西司他丁钠(A药)MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,鱼腥草素钠(B药)MIC 值为 2 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。B图黑色区域表示对应的孔中有肉眼可见的细菌生长;灰色区域表示对应孔中无细菌生长,且 $FICI > 1.00$;白色区域中孔中无肉眼可见细菌生长,且 $FICI$ 在 0.50~1.00。3号菌株 FICI 在 0.50~1.00,两种药物对 3号菌株的联合抑菌效果为相加作用。

图 1 微量肉汤稀释法检测联合抑菌结果(3号菌株)

2.3 FIC 和最优 FICI

鱼腥草素钠对 CRAB 的 FIC 值与亚胺培南西司他丁钠对 CRAB 的 FIC 值相加,将数值最小的 FICI 值作为最优部分抑菌浓度指数,结果显示在微量肉汤稀释法和琼脂二倍稀释法中,其最优 FICI 值在 0.5~1.0,均表现为相加作用。在微量肉汤稀释法中,亚胺培南西司他丁钠与不同浓度鱼腥草素钠联合时,亚胺

培南西司他丁钠 MIC 值可下降 1~3 个稀释浓度;在琼脂二倍稀释法中亚胺培南西司他丁钠与鱼腥草素钠联用其 MIC 值可下降 1~2 个稀释浓度。根据 FICI 值结果判读标准,鱼腥草素钠联合亚胺培南西司他丁钠对 10 株 CRAB 的联合用药效果均表现为相加作用,且 2 种实验方法评价结果一致。见表 2。



A: 琼脂二倍稀释法检测联合抑菌作用;B: 琼脂二倍稀释法接种示意图;C: 3 号菌株联合用药结果。亚胺培南西司他丁钠(A 药)MIC 值为 80 µg/mL,鱼腥草素钠(B 药)MIC 值为 4 000 µg/mL。C: 黑色区域对应的孔中有肉眼可见的细菌生长;灰色区域对应孔是鱼腥草和培养基的颜色其中无细菌生长,且 FICI>1.00;白色区域对应孔中无肉眼可见细菌生长,且 FICI 在 0.50~1.00。3 号菌株 FICI 在 0.75~1.00,2 种药物的联合抑菌效果为相加作用。

图 2 琼脂二倍稀释法检测联合抑菌结果(3 号菌株)

表 2 微量肉汤稀释法和琼脂二倍稀释法联合抑菌最优 FICI 结果

菌株编号	微量肉汤稀释法			琼脂二倍稀释法		
	鱼腥草素钠 FIC	亚胺培南西司他丁钠 FIC	FICI	鱼腥草素钠 FIC	亚胺培南西司他丁钠 FIC	FICI
1	0.25	0.50	0.75	0.50	0.25	0.75
2	0.06	0.50	0.56	0.25	0.50	0.75
3	0.25	0.25	0.50	0.25	0.50	0.75
4	0.50	0.13	0.63	0.25	0.50	0.75
5	0.25	0.25	0.50	0.25	0.50	0.75
6	0.25	0.25	0.50	0.25	0.50	0.75
7	0.50	0.50	1.00	0.25	0.50	0.75
8	0.25	0.25	0.50	0.25	0.50	0.75
9	0.25	0.50	0.75	0.25	0.25	0.50
10	0.50	0.13	0.63	0.25	0.25	0.50

3 讨 论

随着社会老龄化趋势,医院中高龄的重症患者、多基础疾病患者数量增加,住院时间长、侵入性检查治疗等危险因素导致医院鲍曼不动杆菌感染率上升^[7]。亚胺培南是碳青霉烯类抗生素的代表药物,是非典型β-内酰胺类抗生素,其具有杀菌能力强、超广谱抗菌活性等优点^[8],是治疗鲍曼不动杆菌感染的常选药物。但随着亚胺培南西司他丁钠在临床上的广泛使用,以及鲍曼不动杆菌天然感受态特性,使其拥有获得外源性耐药基因的能力,CRAB 的检出率不断上升。鲍曼不动杆菌的耐药机制与产生抗菌药物相关的酶类、药物作用靶点改变、膜孔道蛋白的缺失、外排泵过度表达、可移动遗传元件如整合子、生物被膜等因素有关^[9]。多重耐药鲍曼不动杆菌感染可供选择的抗菌药物很少,即使菌株对替加环素和多粘菌素的敏感率相对较高,但单药治疗失败率高,且这些药物不良反应大。多粘菌素常见的不良反应有肾毒性,会造成急性肾损伤^[10];替加环素最常见不良反应有恶心、呕吐、腹泻等胃肠道反应^[11],给鲍曼不动杆菌感染的治疗带来困境。

随着细菌耐药形势的加剧,越来越多的目光聚集到传统医学。传统医学中抗菌植物是新型抗菌化合物的重要来源,世界范围内批准的药物中大部分来源于天然产品,大部分药物都是从天然植物中提取的^[12]。鱼腥草具有“中药抗生素”之称,其鱼腥草注射液临床上常用于上呼吸道感染、盆腔炎、尿路感染等疾病的治疗且价格便宜,但由于其可能导致严重过敏反应,限制了临床的广泛应用。中药复方制剂成分和药理作用复杂多样,可能造成药物不良事件。鱼腥草素钠在临床用药上以静脉注射、肌肉注射效果优于口服用药,但用药安全性和有效性的问题仍需解决,中药单体因纯度高、成分明确、活性高成为研究的重点。鱼腥草素钠具有抗氧化、抗肿瘤、调节免疫力、抑菌、抗病毒的作用^[13],对多种革兰阳性细菌和革兰阴性细菌如金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎双球菌、卡他球菌、白喉杆菌、变形杆菌、痢疾杆菌、肠炎杆菌等均有不同程度的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及枯草杆菌的抑菌结果较强^[14];鱼腥草素钠可增强金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌生物被膜早期黏附的清除作用,抑制生物被膜形成^[15]。

综上,本研究结果显示鱼腥草素钠能抑制耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌生长,在微量肉汤稀释法中检测到 MIC 在 1 500~3 500 μg/mL,琼脂二倍稀释法中 MIC 在 2 500~3 000 μg/mL,与亚胺培南西司他丁钠联用后能增加其抑菌效果,使亚胺培南西司他丁钠的 MIC 下降,其最优 FICI 在 0.5~1.0,2 种药物联合效

应为相加作用。采用微量肉汤稀释法和琼脂稀释法 2 种方法进行体外抑菌实验,2 种方法结果一致。但是鱼腥草素钠的抑菌机制目前暂不清楚,可能与抑制细菌生物被膜形成有关、抑制细菌主动外排泵、消除耐药质粒等有关,其机制需要进一步进行研究。

参考文献

- [1] ANTUNES L C, VISCA P, TOWNER K J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen[J]. *Pathog Dis*, 2014, 71 (3): 292-301.
- [2] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告[J]. *中国感染控制杂志*, 2021, 20(1): 15-31.
- [3] 张婷婷, 宋敏, 杭太俊, 等. 鱼腥草药材挥发油及其注射剂中癸酰乙醛的研究考证[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(9): 1422-1428.
- [4] 蔡燕, 韩雪梅, 叶红, 等. 复方鱼腥草对鲍曼不动杆菌体外培养生长的影响[J]. *川北医学院学报*, 2014, 29(6): 564-566.
- [5] PÁEZ P L, BAZÁN C M, BONGIOVANNI M E, et al. Oxidative stress and antimicrobial activity of chromium (III) and ruthenium (II) complexes on staphylococcus aureus and escherichia coli[J]. *BioMed Res Int*, 2013, 2013: 1-7.
- [6] ELEMAM A, RAHIMIAN J, DOYMAZ M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin b-resistant carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10): 3558-3562.
- [7] 李延鸿. 鲍曼不动杆菌感染的临床分析[J]. *中国处方药*, 2013, 11(4): 47-49.
- [8] 谭坪海, 陈利达, 郭鹏豪, 等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 182-188.
- [9] SKARIYACHAN S, TASKEEN N, GANTA M, et al. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2019, 45 (3): 315-333.
- [10] 黄晨, 肖永红. 多粘菌素临床应用与困局[J]. *医药导报*, 2020, 39(1): 10-16.
- [11] 宋淑萍, 苏伟, 郭丰, 等. 替加环素相关不良反应分析[J]. *中国继续医学教育*, 2019, 11(26): 131-133.

(下转第 1130 页)

基于 MRI 及临床参数的鼻咽癌远处转移风险 评估函数构建与评价*

杨勤顺,白雪冰,梁久平[△],沈龙,王豪,江时淦

(江西医学高等专科学校第一附属医院放射科,江西上饶 334000)

[摘要] **目的** 探讨判别函数对初发鼻咽癌(NPC)患者远处转移风险评估的临床应用价值,为临床治疗方案制订提供参考依据。**方法** 搜集具有完整影像检查及临床资料且随访 12 个月以上的初发 NPC 患者 131 例(111 例无肿瘤远处转移,20 例肿瘤远处转移);采用 Fisher 判别分析和 Bayes 判别分析对患者性别、年龄、是否涕血、T 分期因素、N 分期因素、T 分期、N 分期、临床分期、治疗前外周血生化指标及病理类型等变量进行逐步判别,筛选出具有显著判别能力的指标并建立判别函数,采用回顾性误判分析及交叉核实法误判分析对函数判别效能进行评价。**结果** 颈部Ⅳ区淋巴结转移(X_1)、肿瘤椎前肌侵犯(X_2)、外周血小板计数(X_3)和嗜酸性粒细胞绝对值(X_4),具有显著判别能力($P < 0.05$),并引入函数。Fisher 判别分析得出 1 组函数为 $Y = 1.116 + 1.588X_1 + 1.242X_2 - 0.010X_3 + 1.669X_4$,判别界值为 0.454 5。Bayes 判别分析得出 2 组函数为 $Y_1 = -8.10 + 0.277X_1 + 0.832X_2 + 0.058X_3 - 1.93X_4$, $Y_2 = -7.234 + 2.354X_1 + 2.457X_2 + 0.044X_3 + 0.254X_4$ 。回顾性误判分析结果显示,2 组函数肿瘤远处转移和无远处转移的判别符合率分别为 74.8%、75.0%,总体符合率为 74.8%;交叉核实法误判分析结果显示,2 组函数肿瘤远处转移和无远处转移的判别符合率分别为 73.9%、70.0%,总体符合率为 73.3%。**结论** 判别函数可以作为 NPC 患者治疗前远处转移风险评估的有效补充手段,为临床治疗方案制订提供参考依据。

[关键词] 鼻咽癌;磁共振;临床参数;转移;风险预测;判别函数

[中图分类号] R739

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)07-1127-04

Construction and evaluation of MRI and clinical parameters-based risk assessment function for distant metastasis of nasopharyngeal carcinoma*

YANG Qinshun, BAI Xuebing, LIANG Jiuping[△], SHEN Long, WANG Hao, JIANG Shigan

(Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College,
Shangrao, Jiangxi 334000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the clinical application value of discriminant function in assessing the risk of distant metastasis in patients with primary nasopharyngeal carcinoma (NPC) and to provide a reference basis for clinical treatment planning. **Methods** A total of 131 primary NPC patients (111 without and 20 with distant metastasis) with complete imaging and clinical data and more than twelve months of follow-up were collected. Fisher's discriminant analysis and Bayes' discriminant analysis were used to stepwise discriminate between variables such as patients' gender, age, bleeding, T-stage factors, N-stage factors, T-stage, N-stage, clinical stage, peripheral blood biochemical indexes before treatment and pathological type. Indicators with significant discriminatory power were screened and discriminant functions were established. The discriminatory power of the function was evaluated by using retrospective misclassification analysis and cross-check misclassification analysis. **Results** Lymph node metastasis in cervical region Ⅳ (X_1), tumor anterior vertebral muscle invasion (X_2), peripheral platelet count (X_3) and absolute eosinophil value (X_4) had significant discriminant power ($P < 0.05$), and were introduced function. Fisher's discriminant analysis yielded a set of functions: $Y = 1.116 + 1.588X_1 + 1.242X_2 - 0.01X_3 + 1.669X_4$, with a discriminant cut-off value of 0.454 5. Bayes' discriminant analysis yielded two set of functions: $Y_1 = -8.10 + 0.277X_1 + 0.832X_2 + 0.058X_3 - 1.93X_4$, $Y_2 =$

* 基金项目:江西省卫生健康委员会科技计划项目(202141030)。 作者简介:杨勤顺(1983-),副主任医师,本科,主要从事头颈部医学影像研究。 [△] 通信作者, E-mail:liangjp2007@163.com。

$-7.234+2.354X_1+2.457X_2+0.044X_3+0.254X_4$. The results of the retrospective misclassification analysis showed that the discrimination rates for the two set of functions were 74.8% and 75.0% for distant and no distant metastases respectively, with an overall compliance rate of 74.8%. The results of the cross-verification method misclassification analysis showed that the discriminatory compliance rates for distant and no distant metastases were 73.9% and 70.0% for the two sex of functions, respectively, and the overall compliance rate was 73.3%. **Conclusion** The discriminant function can be used as an effective complementary tool to assess the risk of distant metastasis in patients with NPC before treatment. It provides a reference basis for clinical treatment planning.

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; MRI; clinical parameter; metastasis; risk prediction; discriminant function

由于鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)解剖位置隐匿且首发症状缺乏特异性,大部分初治 NPC 患者就诊时已进入中晚期,新发 NPC 中 4%~10% 患者在初次诊断时就伴有远处转移,15%~30% 患者在根治性治疗后出现远处转移。研究表明早期 NPC 治疗效果良好,但局部晚期患者治疗效果较差,远处转移是 NPC 治疗失败的主要原因^[1-2],并且目前认为患者有亚临床转移时治疗失败。NPC 的治疗手段主要为放疗或以放疗为主的综合治疗,NPC 的初诊转移、治疗后转移及转移失败的治疗方案存在明显差异,患者预后亦明显不同,而基于错误诊断而进行的挽救治疗可能给患者带来严重的并发症,并且患者预后较差^[3-4];因此,治疗前对 NPC 远处转移风险评估对治疗方案的制订具有非常重要的临床意义,但目前研究主要针对 NPC 治疗后的复发或转移进行风险评估预测^[5-8]。本文收集 131 例具有完整影像检查及临床资料且随访 12 个月以上的初诊 NPC 患者的临床及影像学资料,借助统计学方法,建立 NPC 远处转移风险预测的判别函数,评估初诊 NPC 患者远处转移风险,为临床治疗方案的制订提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

搜集 2012 年 7 月至 2019 年 11 月行磁共振成像(MRI)检查的初发 NPC 患者 131 例,所有病例随访时间大于 12 个月;其中 111 例无肿瘤远处转移,20 例肿瘤远处转移(17 例初诊即确诊肿瘤远处转移并随访证实,3 例随访 12 个月内确诊肿瘤远处转移并随访证实;其中肝、肺、骨多发转移 2 例、多发骨转移 12 例、肺转移 2 例、肝转移 4 例),男 92 例,女 39 例,年龄 17~69 岁,平均(43.44±10.35)岁。9 例行鼻咽及颈部平扫检查,122 例行鼻咽及颈部平扫、增强计算机断层扫描(CT)检查。病例纳入标准:(1)经病理确诊 NPC 患者,有完整的临床及影像学资料;(2)随访 12 个月内出现远处转移患者。排除标准:(1)患者合并其他恶性肿瘤患者;(2)治疗后随访 12 个月以后出现复发或转移患者。

1.2 方法

1.2.1 影像检查并分析图像

采用 Siemens Verio 3.0T 及 Skyra3.0T 超导 MR 扫描仪,轴位 SE T1WI、T2WI 及冠状位抑脂 T2WI,层厚 3 mm,层间距 0.6 mm,FOV:230 mm×230 mm,矩阵:256 mm×256 mm。增强扫描为三平面 SE T1WI 成像,Gd-DTPA 0.2 mL/kg,流速 2~3 mL/s。所有患者影像资料经 2 位副高级医师职称医师共同阅片,分歧经讨论达成一致。按照国际抗癌联盟(UICC)NPC 第 8 版分期对每个患者进行 T 分期(鼻咽腔、口咽、鼻腔、咽旁间隙、椎前肌、翼内肌、翼外肌、鼻窦、颅底骨质、颅神经、下咽、眼眶、广泛软组织)、N 分期(咽后、I、II、III、IV、V、VI 及淋巴结最大径)、临床分期并记录。

1.2.2 血生化检查

记录患者外周血白细胞、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比、单核细胞百分比、嗜酸性粒细胞百分比、嗜碱性粒细胞百分比、中性粒细胞绝对值、淋巴细胞绝对值、单核细胞绝对值、嗜酸性粒细胞绝对值、嗜碱性粒细胞绝对值、红细胞、血红蛋白、红细胞比积、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白量、平均红细胞血红蛋白浓度、红细胞体积分布宽度、红细胞体积分布宽度变异系数、血小板、中性粒细胞/淋巴细胞比值、血小板/淋巴细胞比值、淋巴细胞/单核细胞比值及血浆 EB 病毒-DNA(EBV-DNA)抗体。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件分析数据,诊断实验用 Fisher 判别分析和 Bayes 判别分析,采用逐步判别方法,引入变量的标准为 $\alpha=0.05$,剔除变量的标准为 $\alpha=0.10$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。将肿瘤是否远处转移设为因变量 Y,自变量设为 X。判别效果评价采用回顾性误判分析和交叉核实法误判分析。

2 结果

2.1 判别因素分析

对患者性别、年龄、是否涕血、T 分期因素、N 分期因素、T 分期、N 分期、临床分期、治疗前外周血生

化指标、EBV-DNA 抗体及病理类型等变量进行 F 检验,结果显示颈部Ⅳ区淋巴结转移(X_1)、肿瘤椎前肌侵犯(X_2)、外周血小板计数(X_3)和嗜酸性粒细胞绝对值(X_4)对判别的作用差异有统计意义($P < 0.05$),当 X_1 引入判别方程时, $P = 0.002$;当 X_1 和 X_2 同时引入判别方程时, $P = 0.001$;当 X_1 、 X_2 和 X_3 同时引入判别方程时, $P < 0.001$;当 X_1 、 X_1 、 X_3 和 X_4 同时引入判别方程时, $P < 0.001$ 。

2.2 Fisher 判别分析

X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 的标准化判别函数系数分别为 0.656、0.597、-0.700 和 0.443,从绝对值大小来看, X_3 对判别的作用略大于其他 3 项指标。判别函数为 $Y = 1.116 + 1.588X_1 + 1.242X_2 - 0.01X_3 + 1.669X_4$,本例判别函数值各类的均数是:第 1 类(无肿瘤远处转移)为 -0.2,第 2 类(肿瘤远处转移)为 1.109,判别界值 $Y_c = (-0.2 + 1.109)/2 = 0.4545$,当 $Y < Y_c$ 时判为第 1 类,当 $Y > Y_c$ 时判为第 2 类, $Y = Y_c$ 时判为任意一类;当判别函数值越远离判别界值,误判的可能性越小。

2.3 Bayes 判别分析

设无肿瘤远处转移为 Y_1 ,肿瘤远处转移为 Y_2 ,可得 2 组函数,并将判别对象判为函数值最大的一类: $Y_1 = -8.10 + 0.277X_1 + 0.832X_2 + 0.058X_3 - 1.93X_4$; $Y_2 = -7.234 + 2.354X_1 + 2.457X_2 + 0.044X_3 + 0.254X_4$ 。

2.4 2 组函数判别效果评价

(1)回顾性误判分析结果显示,肿瘤远处转移和无肿瘤远处转移的判别符合率分别为 74.8%、75.0%,总体符合率为 74.8%。交叉核实法误判分析结果显示,肿瘤远处转移和无肿瘤远处转移的判别符合率分别为 73.9%、70.0%,总体符合率为 73.3%。见表 1。

表 1 判别效果评价[n(%)]

转移	回顾性误判分析		交叉核实法误判分析		合计
	无转移	转移	无转移	转移	
无	83(74.8)	28(25.2)	82(73.9)	29(26.1)	111(100)
有	5(25.0)	15(75.0)	6(30.0)	14(70.0)	20(100)

3 讨论

NPC 初诊远处转移患者首先推荐 4~6 个周期的以铂类为基础的两药或三药联合方案及联合高剂量 NPC 的原发灶放疗,对远处寡转移患者推荐在诱导化疗间歇期进行处理,有助于明显提高转移性 NPC 患者的总生存率及无进展生存率^[3]。目前 NPC 远处转移诊断主要依赖于 X 线片、超声、CT、MR 及发射型 CT 等影像学检查方法,但由于检查技术的缺陷及个人经验等因素导致部分早期转移患者可能存在假阴

性,而敏感性更高的正电子发射(PET)-CT/MR 由于费用昂贵,目前临床未能作为 NPC 患者治疗前常规检查项目,并且现有的检查技术无法对可能存在的亚临床远处转移做出诊断。TNM 分期系统是 NPC 预后判断和指导治疗的重要依据,但由于 NPC 存在生物学的差异,仅基于解剖学信息的 TNM 分期系统还不能准确地预测 NPC 患者的预后^[9-10]。采用基于临床和生化参数的预后评分系统,可以对转移性 NPC 患者进行危险分层。低风险评分的患者中,能有近 50% 的患者进行干预治疗而获得更好的预后。目前的研究主要针对 NPC 治疗后复发或转移的风险评估预测,研究对象均为治疗后复发或转移的 NPC 患者,而本研究聚焦于治疗前 NPC 远处转移风险预测,建立 NPC 远处转移判别函数,弥补现有检查手段对 NPC 远处转移诊断存在假阴性及亚临床转移无法识别的不足。

判别分析是通过明确所属类别及有关变量数值的一批训练样本信息,依据某种判别准则,构造出判别函数式,用以判定新样本所属类别的多元统计方法,辅助临床鉴别诊断。研究表明判别函数可进一步提高甲状腺结节和颈部咽部淋巴结性质诊断的准确性^[11-13],是临床辅助鉴别诊断的有效手段。本组病例结果显示,颈部Ⅳ区淋巴结转移、肿瘤椎前肌侵犯、外周血小板计数和嗜酸性粒细胞绝对值 4 个变量对判别的作用均有统计学差异,故纳入判别函数;而实际上用于判别分析指标不是越多越好,本研究采用逐步判别,选取具有判别作用的指标建立判别函数,使判别函数简洁,判别效果稳定。TANG 等^[8]构建了包含年龄、性别、体重指数、T 分期、N 分期、血浆 EBV-DNA 抗体、治疗前高反应性 C 蛋白水平、乳酸脱氢酶、血红蛋白水平等临床指标的列线图,结果显示,治疗前临床数据能对 NPC 患者治疗后复发起一定预测作用($C. index = 0.728$);而基于包括年龄、性别、总体分期、血红蛋白、血小板计数和放射组学特征构建的放射性组学模型可以成功将 NPC 患者区分为无进展生存期(PFS)的低风险组或高风险组($HR = 5.14$),并成功在验证集的患者进行了验证($HR = 7.28$)。本研究结果显示 Fisher 判别分析的判别界值为 0.4545,当 $Y < 0.4545$ 时判为第 1 类,提示患者合并肿瘤远处转移的风险较小;当 $Y > 0.4545$ 时判为第 2 类,提示患者合并肿瘤远处转移的风险较大;当 $Y = 0.4545$ 时判为任意一类,即无法判别转移风险;当判别函数值越远离 0.4545 时,误判的可能性越小。而 Bayes 判别分析结果可以得出 2 组函数 Y_1 、 Y_2 ,当 $Y_1 > Y_2$ 时,提示该患者肿瘤远处转移的风险较小;当 $Y_1 < Y_2$ 时,提示该患者具有较高的肿瘤远处转移风险。对 2 组函数进一步行判别效果评价,回顾性误判

分析及交叉核实法误判分析结果显示总体符合率分别为 74.8%、73.3%；说明该判别函数具有较高的判别效能，并且判别函数构成较为简单，可以作为肿瘤治疗前远处转移风险评估的有效手段，评估区分低转移风险与高转移风险患者，当判别函数判别为高转移风险患者，而现有影像学检查提示肿瘤远处转移为阴性时，应该进行进一步更为详细的或 PET-CT/MR 检查，以确定有无肿瘤远处转移，有利于治疗方案的制订，提高患者生存率，减少并发症。

综上所述，判别函数构成较为简单但对 NPC 远处转移风险评估具有较高的预测效能，可以作为肿瘤治疗前远处转移风险评估的有效补充手段，为临床治疗方案制订提供参考依据。

参考文献

- [1] 邱慧芝. 905 例鼻咽癌远期疗效及失败模式的探讨[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(6): 555-561.
- [2] GUO Q, LU T, LIN S, et al. Long-term survival of nasopharyngeal carcinoma patients with Stage II in intensity-modulated radiation therapy era[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(3): 241-247.
- [3] 陈晓钟, 李金高, 林少俊, 等. 转移性鼻咽癌治疗专家共识[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(1): 23-28.
- [4] 李金高, 陈晓钟, 林少俊, 等. 鼻咽癌复发, 转移诊断专家共识[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(1): 7-15.
- [5] ZHANG S, ZHANG B, TIAN J, et al. Radiomics features of multiparametric MRI as novel prognostic factors in advanced nasopharyngeal carcinoma. [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(15): 4259-4269.
- [6] 张璐, 罗小宁, 莫笑开, 等. 进展期鼻咽癌(III-IVb 期)远处转移风险分析模型的构建及验证[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(12): 1459-1464.
- [7] DU R, LEE V H F, YUAN H, et al. Radiomics model to predict early progression of nonmetastatic nasopharyngeal carcinoma after intensity modulation radiation therapy: a multicenter study[J]. Radiol Artif Intell, 2019, 1(4): e180075.
- [8] TANG L Q, LI C F, LI J, et al. Establishment and validation of prognostic nomograms for endemic nasopharyngeal carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 108(1): djv291.
- [9] 金龙, 付神波, 于娇. 治疗前 PLR 和 NLR 对鼻咽癌患者预后的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(7): 476-480.
- [10] CHEE J, LOH K S, THAM I, et al. Prognostic stratification of patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma using a clinical and biochemical scoring system[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(12): 2563-2570.
- [11] 李恒国, 卢绍辉, 梁久平, 等. 甲状腺结节的 CT 灌注评价[J]. 中华放射学杂志, 2011, 45(9): 831-834.
- [12] 梁久平, 徐茂盛, 宋建勋, 等. 颈部咽后淋巴结的 MRI 表现与鼻咽病变的关系[J]. 中国医学影像学杂志, 2014, 22(12): 904-907.
- [13] OUYANG F S, GUO B L, ZHANG B, et al. Exploration and validation of radiomics signature as an independent prognostic biomarker in stage III-IV b nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 74869-74879.
- [14] 王宁, 庞剑. 鱼腥草药理作用及对细菌耐药性的研究进程[J]. 中医临床研究, 2017, 9(17): 146-148.
- [15] 濮燕屏, 程惠娟, 段强军, 等. 鱼腥草素钠联合阿奇霉素对金黄色葡萄球菌生物被膜早期黏附的影响[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1813-1817.

(收稿日期: 2021-11-03 修回日期: 2021-12-23)

(上接第 1126 页)

- [12] RICHWAGEN N, LYLES J T, DALE B L F, et al. Antibacterial activity of kalanchoe mortagei and K. fedtschenkoi against ESKAPE pathogens[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 67.
- [13] 吴文英, 李露, 尹术华, 等. 鱼腥草挥发油提取、成分分析及应用的研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(3): 224-229.

(收稿日期: 2021-11-01 修回日期: 2021-12-08)

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.010

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1830.020.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1830.020.html(2021-12-15))

家庭参与式接纳和承诺疗法在青少年非自杀性自伤患者中的应用*

薛毅,周小艳,范征莉,吴清培,刘浩

(重庆市精神卫生中心心理科 401120)

[摘要] **目的** 分析家庭参与式接纳和承诺疗法在青少年非自杀性自伤患者中的应用效果。**方法** 选取 2020 年 1—12 月该中心收治的 120 例青少年非自杀性自伤患者为研究对象,分为对照组和干预组,每组 60 例。对照组使用常规治疗方法,干预组使用家庭参与式接纳和承诺疗法。比较治疗方案实施后 2 组患者在自伤行为、心理灵活性及家庭亲密度与适应性之间的得分差异。**结果** 治疗方案实施后干预组自伤行为减少、心理灵活性增加、家庭亲密度与适应性提升,与对照组比较差异均有统计意义($P < 0.05$)。**结论** 在青少年非自杀性自伤患者中实施家庭参与式接纳和承诺疗法是 1 种有效的心理治疗方法。

[关键词] 自伤;非自杀性;家庭参与;接纳和承诺疗法;青少年

[中图法分类号] R749

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)07-1131-04

Application of family participatory acceptance and commitment therapy in the adolescent patients with non-suicidal self-injury*

XUE Yi, ZHOU Xiaoyan, FAN Zhengli, WU Qingpei, LIU Hao

(Department of Psychology, Chongqing Mental Health Center, Chongqing 401120, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the application effect of family participatory acceptance and commitment therapy in the adolescent patients with non-suicidal self-injury. **Methods** A total of 120 adolescent patients with non-suicidal self-injury treated in the center from January to December 2020 were selected as study subjects and divided into the control group and the intervention group, 60 cases in each group. The control group received conventional treatment, while the intervention group received family participatory acceptance and commitment therapy. The scores of self injurious behavior, psychological flexibility, family cohesion and adaptability between the two groups were compared after the implementation of the treatment plan. **Results** After the implementation of the treatment plan, the self injurious behavior of the intervention group decreased, the psychological flexibility increased, the family cohesion and the adaptability increased when compared with the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** It is an effective psychotherapy method to implement family participatory acceptance and commitment therapy in the adolescent patients with non-suicidal self-injury.

[Key words] self-injury; non-suicidal; family participation; acceptance and commitment therapy; adolescents

非自杀性自伤是指个体在没有自杀意图情况下,对自身身体组织进行故意且直接的伤害^[1]。作为一种不被社会认可的行为,个体虽其本意上没有自杀的意图,但长期产生的自伤行为必然会使得个体对自伤行为产生脱敏现象,使得自伤者不断增强自伤行为力度,最终导致个体死亡的发生,给社会和家庭造成严重创伤^[2]。因青少年时期心理与生理之间发展不平

衡,使得青少年非自杀性自伤患病率远高于其他年龄段^[3-4],meta 分析结果显示青少年群体中非自杀性自伤行为检出率在国内已达到 16.6%^[5]。因此,加大对青少年群体非自杀性自伤行为的关注力度,寻求有效的治疗措施,对促进青少年群体身心健康发展意义重大。接纳和承诺疗法作为治疗心理疾病常用的方法,其在认知行为疗法的基础上加入了正念及接纳等新

* 基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目(2021MSXM286)。
儿童青少年非自杀性自伤研究。

作者简介:薛毅(1981—),本科,主管护师、心理治疗师,主要从事心理学、

的理念,对行为治疗更为合理^[6]。同时,家庭作为个体接触最多的外界环境,其在个体的生理-心理-认知发展中都扮演着重要的角色^[7]。和谐的家庭关系可以起到治愈心理疾病的作用,相反,失衡的家庭关系则会引发青少年的心理健康问题。因此,本研究将家庭参与式接纳和承诺疗法并用至青少年非自杀性自伤患者中,取得了满意的效果,具体过程及结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2020年1—12月本中心收治的120例青少年非自杀性自伤患者为干预对象。青少年非自杀性自伤患者的纳入标准:(1)年龄在8~18岁;(2)知情同意并愿意参与本研究。排除标准:(1)患有严重的躯体疾病;(2)存在明显的沟通障碍。根据入院的时间,将2020年1—6月的60例患者纳入对照组,采用常规治疗方法,2020年7—12月的60患者纳入干预组,采用家庭参与式接纳和承诺疗法。干预组要求患者的家庭成员至少有1名全程参与每次的治疗,家庭成员的纳入标准:(1)年龄在18岁以上;(2)和患者共同生活时间大于或等于6个月/年;(3)心理认知正

常;(4)知情同意并愿意参与本研究。干预组和对照组患者基线数据比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 2组患者基线资料比较

项目	干预组	对照组	t/χ^2	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	14.2±1.7	14.7±1.5	1.708	0.090
性别(n)			0.307	0.580
男	33	36		
女	27	24		
受教育水平(n)			0.422	0.526
初中以下	45	45		
高中及中专	13	15		
大专以上	2	0		

1.2 干预方法

对照组只实施非自杀性自伤患者临床常用的治疗措施,包括药物治疗及常用的认知行为疗法。干预组在临床常用治疗的基础上加入家庭参与式的接纳和承诺治疗。治疗共分为6次,要求患者的家庭成员至少有1名全程参与每次的治疗。具体治疗方法见表2。

表2 家庭参与式接纳和承诺疗法治疗步骤

时间	主题	形式及内容	干预时间 (min)
第1周	首次评估患者,讲述治疗规则	采用个体一对一的方式进行。心理治疗师与患者及其家庭成员进行沟通,评估患者的自伤程度,找出自伤的潜在原因,并向患者和家庭成员讲述接纳和承诺疗法的概念、方法及治疗的过程,	30
第2周	直观面对内心、接纳现在的自己	采用团体交流的方式进行。4~6例患者及其家庭成员为1组,先相互介绍,成员之间彼此熟悉。并使用3min的时间分享自身遭遇的问题,然后心理治疗师向患者及其家庭成员讲述接纳的益处及逃避的危害,让患者对接纳当下的自我产生积极效应。	50
第3周	解离现有认知,避免发生融合	采用团体游戏的方式进行。心理治疗师向患者讲述个体认知和客观事实之间的不同,帮助患者直观面对自己的心理问题,帮助患者正向控制自己行为。最后通过与家庭成员单向沟通的形式,让患者将自己心里想法表述出来。	50
第4周	告别昨日的我,认识现在的我	用团体游戏和正念冥想的方式进行。心理治疗师先向患者讲述影响自我关注当下的2个原因——概念化的过去和恐惧化的未来。然后通过告别门的形式,让患者在其家庭成员的见证下,挥别过去,关注现下的自我。最后通过15min的冥想训练帮助患者感知自我,认识新的自我。	50
第5周	明确自身价值,朝着理想前进	采用PPT讲座的方式进行。心理治疗师向患者讲述生活中树立正确价值观的重要性,帮助患者找到未来生活的方向,鼓励患者向着美好生活前进。最后要求青少年作出1个利于病情的承诺,并制订出实现承诺对应所需完成的短期、中期及长期目标,由家庭成员帮助其监督、记录及反馈计划实施的情况。	45
第6周	再次评估患者,记录治疗效果	采用个体一对一的方式进行。心理治疗师鼓励青少年患者表达治疗过程中的收获及现下对自身问题的看法,最后评估治疗效果。	30

1.3 资料收集

采用问卷调查法评估治疗前、后2组患者自伤行为、心理灵活性及家庭亲密度与适应性等指标的变化。(1)青少年自我伤害行为问卷:用于测评青少年

自伤行为的频率和程度,由郑莺^[8]制订。问卷由18个封闭问题和1个开放问题组成,以自我伤害频率(0~3级计分)和自我伤害程度(0~4级计分)的乘积评价青少年的自伤行为。得分越高表示自伤行为越

严重。本研究中该量表的内部一致性信度系数为 0.899。(2)接纳与行动量表:用于测量青少年个体经验性回避情况,是反映个体心理灵活性高低的 1 个有效指标,由 BOND 等^[9]研制,曹静等^[10]于 2013 年汉化。量表包含 7 个问题,采用 7 级评分法,从不到总是分别计为 1~7 分,总分越高表明心理灵活性越差。本研究中该量表的内部一致性信度系数为 0.835。(3)家庭亲密度与适应性量表^[10]:用于评价患者家庭功能情况,由费立鹏等^[11]于 1991 年汉化。量表共 30 个条目,分别评价家庭亲密度与适应性 2 个方面。采用 Likert 5 级计分,从不到总是分别计为 1~5 分,总分 150 分,得分越高表示家庭功能越好。本研究中该量表的内部一致性信度系数为 0.821。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行数据录入和统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用两独立样本 *t* 检验,计数资料使用频数及百分率(%)。分析使用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结 果

2.1 2 组患者治疗前、后自伤行为比较

治疗后干预组自我伤害行为问卷评分较对照组明显降低,自伤行为减少,差异有统计意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组患者治疗前、后自伤行为比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	治疗前	治疗后
干预组	129.43±22.58	74.39±14.79 ^a
对照组	128.45±26.21	108.98±19.77 ^a
<i>t</i>	-0.743	8.639
<i>P</i>	0.525	<0.001

^a: $P < 0.05$,与治疗前比较。

2.2 2 组青少年非自杀性自伤患者治疗前、后心理灵活性比较

治疗后干预组接纳与行动量表得分较对照组明显降低,心理灵活性提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 4 2 组患者治疗前、后心理灵活性比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	治疗前	治疗后
干预组	35.48±5.22	27.12±4.34 ^a
对照组	34.92±5.78	32.86±4.98
<i>t</i>	-1.457	4.772
<i>P</i>	0.446	<0.001

^a: $P < 0.05$,与治疗前比较。

2.3 2 组青少年非自杀性自伤患者治疗前、后家庭亲密度与适应性比较

治疗后干预组家庭亲密度与适应性得分较对照

组均增加,差异有统计意义($P < 0.05$),见表 5。

表 5 2 组患者治疗前、后家庭亲密度与适应性比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	治疗前		治疗后	
	亲密度	适应性	亲密度	适应性
干预组	68.56±6.63	49.21±7.12	73.56±6.23 ^a	53.27±7.13 ^a
对照组	69.52±7.61	51.28±6.16	65.27±6.61 ^a	44.28±6.16 ^a
<i>t</i>	0.501	1.147	-4.739	-4.979
<i>P</i>	0.618	0.255	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$,与治疗前比较。

3 讨 论

研究表明青少年非自杀性自伤患者实施自伤行为的主要原因是想要释放自身的不良情绪^[12]。然而,生活中负性事件经常存在,个体要认识到负性事件的常态性,学会调节情绪,选择合理的方式释放负性情绪,从而稳定心理健康状态^[13]。青少年非自杀性自伤患者因认知存在偏差,不能够接受负性事件的存在或容易受到外界大环境的引导,易采取极端行为抒发自己的负性情绪^[14]。接纳和承诺疗法作为认知行为疗法中的一个重要分支,此方法并不试图消除或改变个体的消极想法或情绪,更多的是通过鼓励患者接受这些消极想法或情绪的存在,引导个人向已确定和采纳的价值观迈进^[15]。

本研究结果发现家庭参与式接纳和承诺疗法可减少青少年患者非自杀性自伤行为,改善个体的心理灵活性。美国 1 项研究将接纳和承诺疗法实施于退伍军人中,结果显示此治疗方法能明显降低有自杀意念患者的抑郁和自杀意念^[16],本研究结果与其结果类似。心理病患者最常见的面对问题时的处理方式是经验性回避^[17],然而回避问题并不能从根本上解决问题,反而还会减少面对问题时采取有效行为的能力,使得不良行为应对率增大^[18]。接纳和承诺疗法作为正向积极的行为应对方法,其通过鼓励患者接受不良经历(包括思想、情感和感觉),并不排除患者的负性情绪,更加注重的是引导患者正视问题,直面负性情绪给生活带来的危害,直观暴露逃避问题给患者自身及周围人带来的伤害,通过引导患者接纳自我,破坏负性情绪的思维反刍过程,从而达到降低非自杀性自伤患者的自伤意识,减轻、减少自伤行为。与此同时,治疗过程中通过使用一系列训练练习来帮助青少年非自杀性自伤患者摆脱概念化的过去和恐惧化的未来,更加突出当下的重要性,加强患者对自我的认知,并树立明确的价值观,不断朝之努力,从而改变自身行为能力,提高心理灵活性。此外家庭成员的参与和陪伴,在患者的心理上予以更多的鼓励和陪伴,优化了接纳和承诺疗法的治疗效果。

本研究结果发现,家庭参与式接纳和承诺疗法能有效提高青少年非自杀性自伤患者的家庭亲密度与适应性。主要因为青少年非自杀性自伤患者在接纳和承诺治疗过程中,鼓励家庭成员参与,让家庭成员更加了解心理疾病发生的根本原因,使其共同面对,会产生更多的同理心^[19]。此外,家庭成员全程参与患者疾病的治疗,能对患者起到督促、陪伴的作用,提升患者与家庭成员的相处时间,增加家庭成员与患者的情感交流,从而提高家庭亲密度与适应性。

综上所述,家庭参与式接纳和承诺疗法可降低青少年非自杀性自伤患者的自伤行为,提高其心理灵活性,同时改善患者和家庭成员间的亲密度和适应性。这一结果提示精神卫生工作人员应加大对青少年非自杀性自伤患者行为发生原因的关注力度,号召家庭成员共同参与治疗过程,从而提高患者心理治疗的效果。

参考文献

- [1] HALICKA J, KIEJNA A. Non-suicidal self-injury (NSSI) and suicidal: criteria differentiation [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(2): 257-261.
- [2] ZHU J, CHEN Y, SU B. Non-suicidal self-injury in adolescence: longitudinal evidence of recursive associations with adolescent depression and parental rejection [J]. *J Adolesc*, 2020, 84: 36-44.
- [3] VOSS C, HOYER J, VENZ J, et al. Non-suicidal self-injury and its co-occurrence with suicidal behavior: an epidemiological-study among adolescents and young adults [J]. *Acta Psychiatr Scand*. 2020, 142(6): 496-508.
- [5] BROWN R C, PLENER P L. Non-suicidal self-injury in adolescence [J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2017, 19(3): 20.
- [5] 潘珍, 毛绍菊, 唐寒梅, 等. 中国大学生非自杀性自伤检出率的 meta 分析 [J]. *中国学校卫生*, 2016, 37(6): 878-881.
- [6] 胡知仲, 胡茂荣. 非自杀性自伤与接纳承诺疗法的多维解析 [J]. *医学与哲学*, 2020, 41(5): 48-51, 56.
- [7] 林明婧, 厉萍, 卢庆华. 青少年非自杀性自伤的研究现状 [J]. *精神医学杂志*, 2018, 31(1): 67-70.
- [8] 郑莺. 武汉市中学生自我伤害行为流行病学调查及其功能模型 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2006.
- [9] BOND F W, HAYES S C, BAER R A, et al. Preliminary psychometric properties of the Acceptance and Action Questionnaire- II : a revised measure of psychological inflexibility and experiential avoidance [J]. *Behav Ther*, 2011, 42(4): 676-688.
- [10] 曹静, 吉阳, 祝卓宏. 接纳与行动问卷第二版中文版测评大学生的信效度 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2013, 27(11): 873-877.
- [11] 费立鹏, 沈其杰, 郑延平, 等. “家庭亲密度和适应性量表”和“家庭环境量表”的初步评价——正常家庭与精神分裂症家庭成员对照研究 [J]. *中国心理卫生杂志*, 1991(5): 198-202, 238.
- [12] BUELENS T, LUYCKX K, GANDHI A, et al. Non-suicidal self-injury in adolescence: longitudinal associations with psychological distress and rumination [J]. *J Abnorm Child Psychol*, 2019, 47(9): 1569-1581.
- [13] 刘文, 张妮, 于增艳, 等. 情绪调节与儿童青少年心理健康关系的元分析 [J]. *中国临床心理学杂志*, 2020, 28(5): 1002-1008.
- [14] 温宇娇, 徐一凡, 乔丹, 等. 青少年非自杀性自伤行为的社会心理因素解释模型及干预研究 [J]. *国际精神病学杂志*, 2020, 47(5): 885-888.
- [15] 张婧, 王淑娟, 祝卓宏. 接纳和承诺疗法的心理病理模型和治疗模式 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2012, 26(5): 377-381.
- [16] WALSER R D, GARVERT D W, KARLIN B E, et al. Effectiveness of acceptance and commitment therapy in treating depression and suicidal ideation in veterans [J]. *Behav Res Ther*, 2015, 74: 25-31.
- [17] 陈澜, 赵若兰, 陈辉. 武汉市部分大学新生应对方式与非自杀性自我伤害行为关系的研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38(12): 1607-1610.
- [18] CHEN L, ZHAO R L, CHEN H. The effects of acceptance and commitment therapy on lifestyle and behavioral changes: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Perspect Psychiatr Care*, 2020, 56(3): 657-690.
- [19] 傅燕艳, 况荣华, 唐寒梅, 等. 青少年应对方式与非自杀性自伤关系的研究进展 [J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2018, 58(6): 94-97.

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.011

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1659.023.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1659.023.html(2021-12-16))

IVC_{max} 及 IVC-CI 预测结/直肠癌根治术患者全身麻醉诱导后低血压发生率的研究*

何福娟,秦晨光,彭晶,张继勤,王斌,赵莉

(贵州省人民医院麻醉科,贵阳 550002)

【摘要】 **目的** 探讨经胸超声测量下腔静脉最大值(IVC_{max})及下腔静脉塌陷指数(IVC-CI)预测结/直肠癌根治术患者全身麻醉诱导后低血压发生率的准确性,并探讨其最佳截断值。**方法** 选取拟择期在全身麻醉下行结/直肠癌根治手术患者 91 例,最终入选 71 例。麻醉诱导前经胸超声测量患者 IVC_{max} 及 IVC-CI。使用受试者工作特征曲线(ROC)评价 IVC_{max} 及 IVC-CI 预测全身麻醉诱导后患者发生低血压的效能和预测低血压发生的最佳截断值。**结果** 根据全身麻醉诱导后是否出现低血压将患者分为正常血压组及低血压组。麻醉诱导前 2 组 IVC-CI 比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。通过绘制 ROC 曲线,IVC_{max} 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.605(95%CI:0.474~0.735),最佳截断值为 1.85 cm(敏感度 29%,特异度 90%);IVC-CI 的 AUC 为 0.880(95%CI:0.790~0.960),最佳截断值为 42.5%(敏感度 73%,特异度 98%),术前 IVC-CI 与诱导后 MAP 下降率呈中等程度正相关($r = 0.536, P < 0.001$)。**结论** 超声测量 IVC-CI 预测结/直肠癌根治术患者全身麻醉诱导后低血压发生率的准确性较高。

【关键词】 下腔静脉最大宽度;下腔静脉塌陷指数;全身麻醉;低血压;结/直肠癌根治手术

【中图分类号】 R614

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-8348(2022)07-1135-05

Study on IVC_{max} and IVC-CI in predicting the incidence of hypotension induced by general anesthesia in the patients with colorectal cancer after radical surgery*

HE Fujuan, QIN Chengguang, PENG Jing, ZHANG Jiqin, WANG Bin, ZHAO Li

(Department of Anesthesiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the accuracy of the maximum value of inferior vena cava diameter (IVC_{max}) and the of inferior vena cava collapsibility index (IVC-CI) measured by transthoracic ultrasound in predicting the incidence of hypotension induced by general anesthesia in the patients with radical resection of colorectal cancer, and to explore the best cutoff value. **Methods** A total of 91 patients undergoing elective radical surgery for colon or rectal cancer under general anesthesia were selected, and finally 71 patients were included in the study. Transthoracic ultrasound was used to measure the IVC_{max} and IVC-CI of the patients before the anesthesia induction. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the efficacy of IVC_{max} and IVC-CI in predicting hypotension in the patients after induction of general anesthesia and the best cut off for predicting hypotension. **Results** According to whether hypotension occurred after the induction of general anesthesia, patients were divided into the normal blood pressure group and hypotension group. There was a statistical difference in IVC-CI between the two groups before the anesthesia induction ($P < 0.0001$). The ROC curve showed that the area under curve (AUC) of IVC_{max} was 0.605 (95%CI:0.474—0.735), and the best cut off was 1.85 cm, with 29% of sensitivity, and 90% of specificity. While the AUC of IVC-CI was 0.88 (95%CI:0.79—0.96), and the best cut off was 42.5% with 73% of sensitivity, and 98% of specificity. **Conclusion** IVC-CI has a high accuracy in predicting the incidence of hypotension induced by general anesthesia in patients with colorectal cancer.

【Key words】 maximum value of inferior vena cava diameter; the collapse index of inferior vena cava collapsibility index; general anesthesia; hypotension; radical surgery for colon or rectal cancer

有研究发现,择期手术患者在术前就处于低血容量状态较为常见^[1]。拟行结肠/直肠癌根治术的患者,由于基础疾病导致的体液异常丢失或分布(例如呕吐、腹泻)、胃肠减压、术前禁饮禁食、胃肠道灌肠准备等,麻醉诱导前就可能处于低血容量状态。同时一些麻醉方法/麻醉药物可导致血管扩张及心脏抑制,麻醉诱导后患者更容易发生低血压。术中严重低血压被认为是发生术后不良结局的独立危险因素,会导致如心肌梗死、脑卒中、心力衰竭、急性肾损伤、住院时间延长等,甚至增加术后 1 年内死亡率^[2]。有研究发现,全身麻醉诱导插管后至手术开始前的此段时间内低血压发生率较高,即使持续时间很短的低血压亦可能引起严重的围术期不良事件^[3-4]。

随着床旁超声技术的发展,经胸超声心动图(transthoracic echocardiography, TTE)可以测量一系列血流流速相关及腔静脉相关的血流动力学指标。相对于有创监测,超声具有无创、快速、便捷、价廉、可重复性好的优点。目前研究认为经胸超声测量下腔静脉内径最大值(maximum inferior vena cava diameter, IVC_{max})和下腔静脉塌陷指数(inferior vena cava collapsibility index, IVC-CI)可用于判断自主呼吸患者的血管内容量及容量反应性^[5-8]。本研究拟通过在麻醉诱导前用超声测量 IVC_{max}、IVC-CI,探究二者预测全身麻醉诱导后低血压发生的效能,为麻醉诱导期间的血压管理提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取拟择期在全身麻醉下行结/直肠癌根治术患者 91 例,根据纳入排除标准剔除 20 例患者,包括超声图像质量分级始终小于 3 级 16 例,未预料的困难气道 3 例,麻醉诱导前自动退出试验 1 例,最终 71 例患者纳入本研究。纳入标准:2019 年 4 月到 2021 年 1 月拟在全身麻醉下行结/直肠癌根治术的患者,性别不限,年龄 18~70 岁,美国麻醉医师协会(ASA)分级 I~III 级。排除标准:妊娠,心律失常,心脏瓣膜或主动脉瓣膜疾病,明显的心功能障碍,心力衰竭,心内分流,慢性阻塞性肺通气功能障碍,肺动脉高压,腹腔积气,腹腔巨大肿瘤,主动脉球囊反搏,不配合,超声图像质量分级始终小于 3 级。根据图像质量分级^[9],1 级:没有图像;2 级:很差或者不可用的图像;3 级:可用的图像;4 级:可接受或者图像质量好的图像;5 级:完美质量的图像。本研究已获得本院医学伦理委员会批准,患者或家属已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 监测方法

所有患者术前均按照常规要求禁食禁饮和肠道准备,入室后开放上肢静脉,常规吸氧,局部麻醉下行

桡动脉穿刺置管,监测有创动脉血压(ABP)、平均动脉血(MAP)、心电图(ECG)、心率(HR)、脉搏氧饱和度(SPO₂)、脑电双频指数(BIS)。平卧 10 min 待血流动力学稳定后,每 20 秒记录 MAP 和 HR,共 3 次,取平均值作为基础值。

1.2.2 超声测量方法

经胸超声(美国 GE Vivid E9)测量:患者平卧位,超声探头置于剑突下右肋缘,探头标记指向患者右侧头部,扫及剑突下四腔心切面后逆时针稍旋转探头,探头稍向左下倾斜,此切面可显示肝脏、右心房、房间隔、左心房、下腔静脉近心端,二维超声取下腔静脉纵切面,采用二维超声(B-mode)测量,取样位置位于下腔静脉右心房开口远心端 2~3 cm 处,记录 3 个呼吸周期图像,分别测量吸气末 IVC_{max} 和呼气末下腔静脉内径最小值(IVC_{min}),连续测量 3 次取平均值,根据公式计算自主呼吸时 IVC-CI。

$$IVC-CI = \frac{IVC_{max} - IVC_{min}}{IVC_{max} \times 100\%}$$

1.2.3 麻醉方法

超声测量完成后即行全身麻醉诱导,依次缓慢静脉注射咪达唑仑 0.04 mg/kg、依托咪酯 0.3 mg/kg、舒芬太尼 0.4 μg/kg 和罗库溴铵 0.6 mg/kg。麻醉深度达到插管条件后,由具有 2 年以上插管经验的麻醉医生行气管插管,插管成功后机械通气,设定潮气量 8 mL/kg,调整呼吸频率以维持呼气末二氧化碳(PET-CO₂) 35~45 mm Hg;调节吸入七氟烷 1%~3% 维持麻醉,使 BIS 维持在 40~60。

1.2.4 观察指标

患者入室后平卧 10 min 待血流动力学稳定后,每 20 秒记录 ABP 和 HR,共 3 次,取平均值作为基础值。经胸超声记录 3 个呼吸周期图像,分别测量 IVC_{max} 和 IVC_{min},根据公式计算 IVC-CI。计算记录麻醉诱导期间 MAP 及 HR 直至插管后 10 min,每分钟记录 1 次。当患者出现定义的低血压则记录并立即进行处理。根据麻醉诱导后是否发生低血压分为正常血压组及低血压组。

1.2.5 不良反应的定义及处理

低血压标准为 MAP 相对于基础值水平下降率大于或等于 20% 或 MAP ≤ 60 mm Hg^[10]。心动过缓定义为 HR < 50 次/分钟。低血压发生时给予去氧肾上腺素 50 μg,心动过缓则静脉推注阿托品 0.5 mg,必要时重复,直到 MAP 不低于基础值的 20%,HR ≥ 50 次/分钟。

1.3 统计学处理

采用 SPSS24.0 软件进行数据统计分析,服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不服从正态分布的则采用中位数和四分位间距[M(P₂₅, P₇₅)]表示。计

数资料的统计描述采用频数和百分率(%)。计量资料两两比较采用独立样本 *t* 检验,不满足正态分布的采用独立样本 Wilcoxon 秩和检验;绘制 IVC_{max}、IVC-CI 的受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线;采用约登(Youden)指数用于确定 IVC_{max}、IVC-CI 诊断麻醉诱导后发生低血压的最佳截断值,并计算其灵敏度和特异度。IVC_{max}、IVC-CI 与血压变化率之间的相关性采用散点图与 Spearman 相关检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本资料比较

正常血压组与低血压组间基线资料比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),具有可比性,见表1。正常血压组及低血压组间术前 IVC_{max} 差异无统计学意义

(*P* > 0.05),麻醉诱导前2组 IVC-CI 差异有统计学意义(*P* < 0.001),见表2。

2.2 ROC 曲线评价 IVC_{max} 和 IVC-CI 在预测全身麻醉后低血压的价值

ROC 曲线分析结果显示,IVC_{max} 的 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.61(95% CI: 0.48~0.74),*P* = 0.133,最佳截断值为 1.85 cm,灵敏度 29%,特异度 90%,见表3、图1;IVC-CI 的 AUC 为 0.88(95% CI: 0.79~0.96),*P* < 0.001,最佳截断值为 42.5%,灵敏度 73%,特异度 98%,见表3、图2。IVC_{max} 与诱导后 MAP 下降率呈负相关(*r* = -0.248,*P* = 0.037),相关程度为弱相关,见图3。IVC-CI 与诱导后 MAP 下降率呈正相关(*r* = 0.536,*P* < 0.001),相关程度为中等程度相关,见图4。

表 1 纳入患者基线资料比较

项目	正常血压组(<i>n</i> = 41)	低血压组(<i>n</i> = 30)	合计(<i>n</i> = 71)	<i>P</i>
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	57.2 ± 9.1	56.7 ± 9.2	56.7 ± 9.1	0.810
性别[<i>n</i> (%)]				0.901
男	24(33.8)	18(25.4)	42(59.2)	
女	17(23.9)	12(16.9)	29(40.8)	
高血压史	3(4.2)	7(9.9)	10(14.1)	
糖尿病史	3(4.2)	4(5.6)	7(9.8)	
BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	22.7 ± 3.4	22.9 ± 3.5	22.8 ± 3.4	0.754
HR($\bar{x} \pm s$, 次/分钟)	73.5 ± 8.5	69.9 ± 8.4	72.0 ± 8.6	0.083
ABP($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	90.5 ± 6.6	90.3 ± 5.8	90.4 ± 6.2	0.886

表 2 术前 IVC_{max} 与 IVC-CI

项目	正常血压组(<i>n</i> = 41)	低血压组(<i>n</i> = 30)	合计(<i>n</i> = 71)	<i>P</i>
IVC _{max} ($\bar{x} \pm s$, cm)	1.76 ± 0.17	1.70 ± 0.13	1.74 ± 0.15	0.072
IVC-CI($\bar{x} \pm s$, %)	32.00 ± 6.70	45.10 ± 8.10	37.50 ± 9.80	< 0.001

表 3 受试者工作曲线(ROC)评价 IVC_{max} 和 IVC-CI 的结果

变量	AUC (95%CI)	最佳截断值	灵敏度 (%)	特异度 (%)
IVC _{max}	0.61(0.48~0.74)	1.85 cm	29	90
IVC-CI	0.88(0.79~0.96)	42.5%	73	98

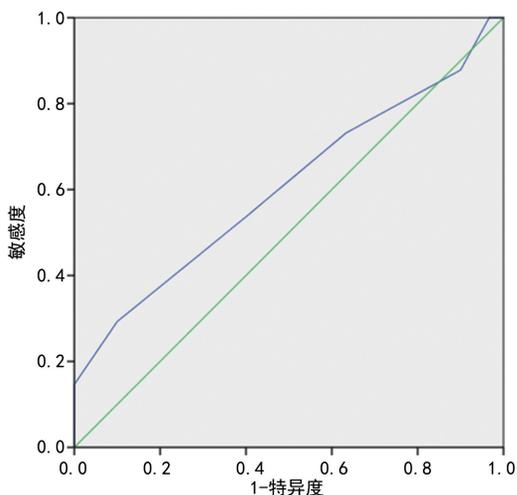


图 1 IVC_{max} 的 ROC 曲线

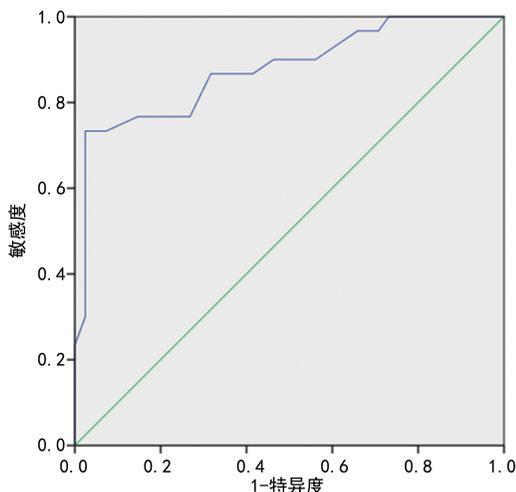


图 2 IVC-CI 的 ROC 曲线

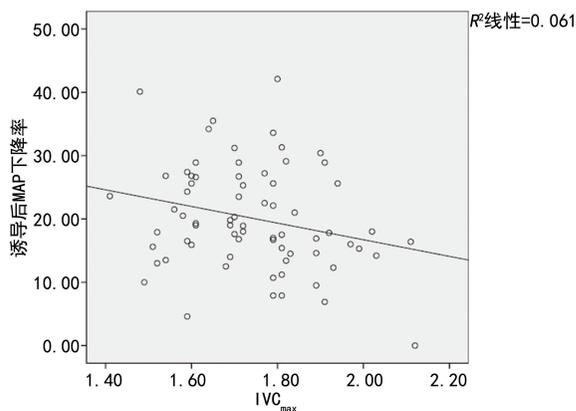


图3 IVC_{max}与诱导后MAP下降率之间的关系

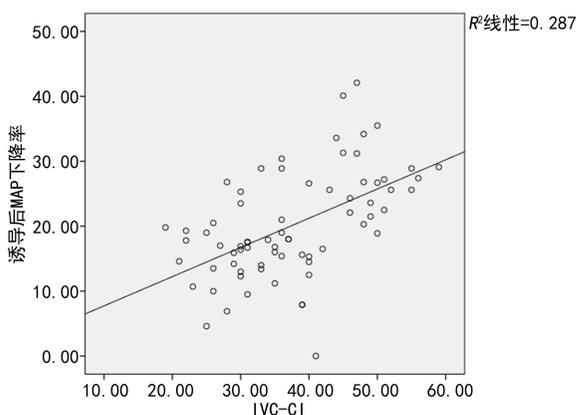


图4 IVC-CI与诱导后MAP下降率之间的关系

3 讨论

结直肠癌患者术前由于胃肠减压、胃肠道灌肠准备等原因,术前容易存在低血容量状态,再加上麻醉诱导的全身麻醉药种类、剂量、给药速度等因素亦会增加低血压的发生^[11]。因此,在诱导前对此类手术患者进行血容量评估,预测低血压的发生率,有着重要的临床意义。

本研究发现麻醉诱导前监测 IVC_{max} 及 IVC-CI 能为预测诱导后低血压的发生率提供一定的参考价值。其中 IVC-CI 预测全身麻醉诱导后低血压的发生率准确性较高,ROC AUC 为 0.88(95%CI:0.79~0.96),最佳截断值为 42.5%,灵敏度和特异度均较高,分别为 73% 和 98%。术前 IVC-CI 与诱导后 MAP 下降率呈中等程度正相关。而 IVC_{max} 预测全身麻醉诱导后低血压的发生率准确度较差,ROC AUC 仅为 0.61(95%CI:0.474~0.735),最佳截断值为 1.85 cm。

目前较多研究^[12-15]认为超声测量下腔静脉内径(IVC)及其变异度可以在自主呼吸和机械通气情况下用于判断血管容量和容量反应性。同时也有 meta 分析^[16]认为,尽管纳入的研究中,患者种类、扩容方式、诊断标准不同,但仍能证明超声测量 IVC 变异度用于诊断血管容量反应性有较大的价值。美国超声心动图学会指南支持使用 IVC_{max} 和 IVC-CI 来评估血管容量^[17]。

有学者在全身麻醉诱导前对自主呼吸患者的 IVC-CI 进行测量,并与麻醉诱导后低血压的发生率进行相关性研究,发现麻醉诱导前 IVC-CI>43% 时可以有效预测麻醉诱导后低血压的发生,其 ROC AUC 为 0.90(95%CI:0.82~0.95),并认为 IVC-CI 是预测全身麻醉诱导后低血压发生的独立预测因子^[18],这与本研究结果相似。本研究还发现,在麻醉诱导前,低血压组 IVC-CI 值大于正常血压组,且差异有统计学意义($P<0.001$)。提示对于拟行结/直肠癌根治手术患者,麻醉诱导前监测 IVC-CI 有一定的价值,当 IVC-CI>42.5% 时,应警惕患者在麻醉诱导后很可能发生低血压,特别是合并低血容量、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心功能不全等患者,更易发生低血压,提醒麻醉医师应做好应对准备。

近年来的研究提示一些功能性血流动力学的动态指标如:每搏量变异度(stroke volume variation, SVV)、脉搏压变异度(pulse pressure variation, PPV)、脉搏灌注指数变异度(pleth variability index, PVI)等也能用于容量的管理,且诊断准确度较高^[19-20]。但上述指标运用条件较为苛刻,只能用于机械通气的患者,不能运用于在全身麻醉诱导前的自主呼吸患者^[21],同时测量上述指标需要建立有创监测,存在穿刺并发症风险。而经胸超声测量的 IVC_{max} 及 IVC-CI 可用于自主呼吸患者,同时具备无创、快速、便捷、价廉、可重复性的优点。因此,对麻醉诱导前自主呼吸的患者监测 IVC-CI 以指导血管容量管理,维持麻醉诱导过程中血流动力学平稳,其准确度较高,且安全无创,有较实际的临床意义。

本研究的诱导药物选用依托咪酯而非丙泊酚,主要是为了避免丙泊酚诱导引起的血压降低。但本研究仍存在不足之处,由于超声扫查图像质量原因,排除的病例数较多,今后可通过增加病例数和提高扫查技术来避免。

由于 IVC-CI 预测全身麻醉诱导后低血压发生率的准确度较高,且经胸超声扫查 IVC 切面简单易得,麻醉医师可在诱导前关注患者的基础 IVC-CI。但当麻醉诱导前 IVC-CI>42.5% 时,是否可采取一定措施,如补液试验或小剂量血管活性药物来避免麻醉诱导期间患者血压剧烈波动,还需要进一步的大样本研究以确定其有效性和安全性。

参考文献

- [1] GAN T J, SOPPITT A, MAROOF M, et al. Goal-directed intraoperative fluid administration reduces length of hospital stay after major surgery[J]. Anesthesiology, 2002, 97(4): 820-826.
- [2] BIJKER J B, VAN KLEI W A, VERGOUWE

- Y, et al. Intraoperative hypotension and 1-year mortality after noncardiac surgery[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(6):1217-1226.
- [3] SÜDFELD S, BRECHNITZ S, WAGNER J Y, et al. Post-induction hypotension and early intraoperative hypotension associated with general anaesthesia[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(1):57-64.
- [4] SUBRAMANIAM B, SUBRAMANIAM K. Cautious optimism: can preoperative ultrasound predict postinduction hypotension? [J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(3):526-527.
- [5] MULLER L, BOBBIA X, TOUMI M, et al. Respiratory variations of inferior vena cava diameter to predict fluid responsiveness in spontaneously breathing patients with acute circulatory failure: need for a cautious use[J]. *Crit Care*, 2012, 16(5):R188.
- [6] FEISSEL M, MICHARD F, FALLER J P, et al. The respiratory variation in inferior vena cava diameter as a guide to fluid therapy[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9):1834-1837.
- [7] BARBIER C, LOUBIÈRES Y, SCHMIT C, et al. Respiratory changes in inferior vena cava diameter are helpful in predicting fluid responsiveness in ventilated septic patients[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9):1740-1746.
- [8] MACHARE-DELGADO E, DECARO M, MARIK P E. Inferior vena cava variation compared to pulse contour analysis as predictors of fluid responsiveness: a prospective cohort study[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 26(2):116-124.
- [9] JAKOBSEN C J, TORP P, SLOTH E. Perioperative feasibility of imaging the heart and pleura in patients with aortic stenosis undergoing aortic valve replacement[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, 24(7):589-595.
- [10] 薄禄龙, 邓小明. 2014 年国际麻醉领域指南回顾[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2015, 36(2):97-101.
- [11] MORT T C. Complications of emergency tracheal intubation: hemodynamic alterations—part I[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 22(3):157-165.
- [12] ILYAS A, ISHTIAQ W, ASSAD S. Correlation of IVC diameter and collapsibility index with central venous pressure in the assessment of intravascular volume in critically ill patients[J]. *Cureus*, 2017, 9(2):e1025.
- [13] 陶永康, 张国强, 王海峰, 等. 超声测量下腔静脉在脓毒症休克中的应用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2013, 22(11):1252-1255.
- [14] FEISSEL M, MICHARD F, FALLER J P, et al. The respiratory variation in inferior vena cava diameter as a guide to fluid therapy[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9):1834-1837.
- [15] BARBIER C, LOUBIÈRES Y, SCHMIT C, et al. Respiratory changes in inferior vena cava diameter are helpful in predicting fluid responsiveness in ventilated septic patients[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9):1740-1746.
- [16] AIRAPETIAN N, MAIZEL J, ALYAMANI O, et al. Does inferior vena cava respiratory variability predict fluid responsiveness in spontaneously breathing patients? [J]. *Crit Care*, 2015, 19:400.
- [17] RUDSKI L G, LAI W W, AFILALO J, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American society of echocardiography endorsed by the European association of echocardiography, a registered branch of the European society of cardiology, and the Canadian society of echocardiography[J]. *J Am Soc Echocardiogr*. 2010, 23(7):685-713.
- [18] ZHANG J, CRITCHLEY L A. Inferior vena cava ultrasonography before general anesthesia can predict hypotension after induction[J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(3):580-589.
- [19] ZHANG Z, LU B L, SHENG X Y, et al. Accuracy of stroke volume variation in predicting fluid responsiveness: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Anesth*, 2011, 25(6):904-916.
- [20] SISWOJO A S, WONG D M, PHAN T D, et al. Pleth variability index predicts fluid responsiveness in mechanically ventilated adults during general anesthesia for noncardiac surgery [J]. *Cardiothorac Vasc Anesth*, 2014, 28(6):1505-1509.
- [21] LANSDORP B, LEMSON J, VAN PUTTEN M J A M, et al. Dynamic indices do not predict volume responsiveness in routine clinical practice[J]. *Br J Anaesth*, 2012, 108(3):395-401.

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.012

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1147.006.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1147.006.html(2021-12-16))

渗出性胸腔积液在内科胸腔镜下特征比较及诊断相关因素分析*

凤 婧¹,罗凤鸣²,颜 浩¹

(1.成都市第二人民医院呼吸与危重症医学科,四川成都 610017;2.四川大学华西医院呼吸与危重症医学科,成都 610041)

[摘要] **目的** 对比不同原因渗出性胸腔积液在内科胸腔镜下的特征、实验室检查及临床表现上的差异,为不明原因渗出性胸腔积液鉴别诊断提供依据。**方法** 回顾性分析 2018 年 1 月至 2020 年 12 月于成都市第二人民医院行内科胸腔镜检查的 113 例渗出性胸腔积液患者的临床、检验和病理资料。**结果** 113 例患者中,108 例经胸腔镜和病理活检明确诊断,确诊率为 95.58%,根据胸膜活检结果,25.92%(28/108)患者为恶性肿瘤,66.67%(72/108)患者为结核性胸膜炎,4.63%(5/108)患者为急慢性非特异性炎症,2.78%(3/108)患者为化脓性胸膜炎。4 类患者的胸腔积液颜色和透明度以及白细胞(WBC)、乳酸脱氢酶(LDH)、腺苷脱氨酶(ADA)、C 反应蛋白(CRP)、淀粉酶(AMY)和葡萄糖(Glu)水平不同。LDH 与 ADA 比值(LDH/ADA)可助于区分结核性胸膜炎与其他胸膜渗出液疾病,LDH/ADA \leq 16.7 具有最佳的总体诊断效率,敏感度为 94.3%,特异度为 85.7%。胸腔镜检查显示,结核性胸膜炎患者镜下以胸膜充血水肿、广泛粘连、均匀一致结节为主(分别为 87.50%,51.39%,47.22%),恶性胸腔积液患者镜下以胸膜增生增厚、大小不等结节、肿块为主要表现(分别为 50.00%,75.00%,21.43%),炎性胸腔积液患者镜下以胸膜充血水肿、大小不等结节为主要表现(分别为 100%,80.00%),化脓性胸膜炎镜下以胸膜充血水肿及广泛粘连为主要表现(分别为 100%,66.67%)。**结论** 内科胸腔镜对渗出性胸腔积液的诊断具有重要的价值。结核性胸膜炎和恶性胸腔积液是渗出性胸腔积液最常见的病因。临床表现、胸腔积液常规和生化等指标及内镜下特征性表现对各类型渗出性胸腔积液鉴别有较大提示意义。

[关键词] 渗出性胸腔积液;内科胸腔镜;结核性胸膜炎;恶性胸腔积液;化脓性胸膜炎**[中图分类号]** R561.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1140-07

Comparison of characteristics and analysis of related factors for diagnosis of exudative pleural effusion under thoracoscopy

FENG Jing¹,LUO Fengming²,YAN Hao¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610017, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To compare the characteristics under medical thoracoscopy, laboratory examination and clinical manifestations among different causes of exudative pleural effusion, to provide the basis for the differential diagnosis of unexplained exudative pleural effusion. **Methods** The clinical, test and pathological data of 113 patients who underwent medical thoracoscopy of exudative pleural effusion who were hospitalized in the Chengdu Second People's Hospital from January 2018 to December 2020 were retrospective analyzed. **Results** Among the 113 patients, 108 cases were confirmed by thoracoscopy and pathological examination with a diagnosis rate of 95.58% (108/113). Pleural biopsy showed that 25.92% (28/108) of them were malignant pleural effusion, 66.67% (72/108) were tuberculosis, 4.63% (5/108) were acute and chronic inflammation, and 2.78% (3/108) were purulent. The color and transparency of pleural effusion and the levels of white blood cells (WBC), lactate dehydrogenase (LDH), adenosine deaminase (ADA), C reactive protein (CRP), amylase (AMY) and glucose (Glu) were different among tuberculosis, malignant, inflammation, and purulent

* 基金项目:四川省卫生健康适宜技术推广项目(20SYJS24);四川省医学会(恒瑞)科研基金专项科研课题(2021HR12)。作者简介:凤婧(1988—),主治医师,硕士,主要从事慢性气道炎症性疾病研究。△ 通信作者, E-mail: yanhaohxnk@126.com。

cases. The lactate dehydrogenase to adenosine dehydrogenase ratio (LDH/ADA) could help distinguish tuberculous pleurisy from other exudative pleural effusion. The LDH/ADA ratio ≤ 16.7 had the best overall diagnostic efficiency, with a sensitivity of 94.3% and a specificity of 85.7%. In the tuberculosis group the main microscopic manifestations were pleura hyperemia and edema, extensive adhesion and uniform small nodules (87.50%, 51.39%, 47.22%, respectively). In the malignant group the main microscopic manifestations were pleura hyperplasia and thicken, unequal size nodules and masses (50.00%, 75.00%, 21.43%, respectively). The main microscopic manifestations in inflammatory group were pleura hyperemia and edema and unequal size nodules (100%, 80.00%, respectively). The main microscopic manifestations in the purulent group were pleural hyperemia, edema and extensive adhesion (100%, 66.67%, respectively). **Conclusion** Medical thoracoscopy is an effective method for the diagnosis of unexplained exudative pleural effusion. Tuberculous pleurisy and malignant pleural effusion are the most common causes. Clinical manifestations, pleural fluid routine and biochemical indicators, as well as endoscopic characteristics, are of great significance for the differentiation of various types of exudative pleural effusion.

[Key words] exudative pleural effusion; medical thoracoscopy; tuberculous pleurisy; malignant pleural effusion; suppurative pleurisy

胸腔积液是许多疾病的临床表现, 常见原因有恶性肿瘤(原发性或继发性胸膜肿瘤)、感染(如结核或疾病)、全身性疾病(如充血性心力衰竭、肾衰竭、结缔组织疾病)、肺栓塞等, 20% 的呼吸系统疾病患者可伴有胸腔积液^[1]。自 19 世纪初以来, 胸腔穿刺术(对胸腔积液进行生化、细胞学和微生物分析)已成为确定胸腔积液原因的标准初始干预措施, 但是该方法假阴性率较高, 灵敏度约为 60%^[2]。1955 年, DEFRANCIS^[3] 首先提出使用闭式胸膜活检诊断不明原因的渗出性胸腔积液^[2], ZUBERI 等^[4] 报道, 其总体特异度为 78.7%。尽管进行了广泛的工作, 临床上仍有 15%~20% 的胸腔积液不能明确诊断。内科胸腔镜可以对大部分胸腔进行直观的观察, 在直视下钳取足量的标本进行胸膜活检, 还可以进行胸膜粘连烙断术、胸膜固定术等治疗性措施, 对恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE) 的诊断率在 91%~95%, 在结核发病率低的地区对结核性胸腔积液(tuberculous pleural effusion, TPE) 的诊断率接近 100%^[5], 被认为是不明原因渗出性胸腔积液诊断的金标准。本研究回顾性分析 2018 年 1 月至 2020 年 12 月于成都市第二人民医院行内科胸腔镜检查的 113 例渗出性胸腔积液患者的临床、检验和病理资料, 对比不同病因渗出性胸腔积液在临床上的表现差异、胸腔镜下特征, 为临床工作提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月于成都市第二人民医院住院治疗行内科胸腔镜检查的渗出性胸腔积液患者为研究对象, 共 113 例, 其中男 78 例, 平均年龄(47.65±18.10)岁; 女 35 例, 平均年龄(38.07±15.42)岁。男性患者中, 吸烟者 48 例, 平均吸烟指数(32.06±14.00); 女性患者中, 吸烟者 4 例, 中位吸烟指数 36.2。纳入标准:(1)临床资料健全者;(2)胸部

计算机断层扫描(CT)或 B 超发现胸腔积液, 且经诊断性穿刺, 根据 Light 标准诊断为渗出性胸腔积液者;(3)胸腔积液原因不明, 具有行内科胸腔镜指征。排除标准:(1)严重心肺疾病无法耐受手术者;(2)凝血功能明显异常, 或有出血倾向者;(3)广泛胸膜粘连无法行胸膜活检者。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则。本研究获得四川省成都市第二人民医院伦理委员会通过。

1.2 方法

1.2.1 胸腔镜检查

患者健侧卧位, 以腋中线或腋后线第 5~7 肋为进镜点, 常规消毒铺巾, 2% 利多卡因局部逐层麻醉至壁层胸膜。平行肋缘行一长度为 1.5~2.0 cm 切口, 止血钳逐层钝性分离至壁层胸膜, 插入 Trocar, 取出套管针芯, 插入胸腔镜观察胸膜, 抽取胸腔积液, 松解粘连带, 在有病灶或可疑病灶处取 5~8 块组织送检, 操作完毕后放置引流管接水封瓶行闭式引流, 缝合伤口。

1.2.2 观察指标

(1)纳入患者的一般情况: 年龄、性别、吸烟指数;(2)临床表现: 体温及临床症状(包括咳嗽、咳痰、胸闷、胸痛、盗汗、咯血、气促、体重下降);(3)胸腔积液常规、胸腔积液生化、胸腔积液肿瘤标志物[细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、鳞状细胞癌抗原(SCCA)、铁蛋白(FER)]、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、胸腔积液彩超;(4)胸腔镜下特征、胸膜活检的病理结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用独立样本 t 检验; 计数资料组间比较采用单向方差分析和 χ^2 检验, 绘制受试者工

作特征(ROC)曲线,计算曲线下面积(AUC)、临界值、敏感度、特异度,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胸膜活检病理结果及并发症情况

纳入113例患者中,108例患者诊断明确,确诊率95.58%。根据胸膜活检结果,恶性肿瘤28例,结核性胸膜炎72例,急慢性非特异性炎症5例,化脓性胸膜炎3例,见表1。术后共有38例患者出现并发症,发生率为35.19%,术后短暂发热11例,发生率为10.19%,伤口疼痛21例(19.44%),12例疼痛程度多轻微可耐受,9例疼痛较为明显,给予对症止痛后缓解),6例(5.56%)患者出现轻度皮下气肿,均自行吸收。术后平均置管时间为4.52 d。

2.2 108例渗出性胸腔积液患者的临床特征

根据病理检查结果将纳入患者分为恶性肿瘤、结核性胸膜炎、急慢性非特异性炎症、化脓性胸膜炎4组,各组患者性别、吸烟史、咳嗽、咳痰、胸闷、胸痛、咯血、气促的比例差异均无统计学意义($P>0.05$),但各组间的年龄、体温差异有统计学意义($P<0.05$),52.78%的结核性胸膜炎患者年龄在18~34岁,而恶性肿瘤患者中大于59岁患者所占比最高(占78.57%),恶性肿瘤患者体温多正常(占82.14%),结核性胸膜炎患者多为中度发热($>38\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$,占25.00%),化脓性胸膜炎患者的发热温度在 $>38\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $>39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 者分别占66.67%和33.33%。各组

患者在盗汗、体重下降方面差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表1 108例渗出性胸腔积液患者胸膜活检病理结果

病理结果	n	占比(%)
恶性病变		
肺腺癌胸膜转移	22	20.37
肺鳞癌胸膜转移	2	1.85
胸膜间皮瘤	2	1.85
肝癌胸膜转移	1	0.93
淋巴瘤	1	0.93
良性病变		
结核性胸膜炎	72	66.67
急慢性非特异性炎症	5	4.63
化脓性胸膜炎	3	2.78

2.3 108例渗出性胸腔积液患者ESR、胸腔积液常规、生化及胸腔镜下特征

4组胸腔积液颜色及浑浊度不同($P<0.05$),结核性胸膜炎及化脓性胸膜炎多呈浅、深黄色(分别为63.89%和66.67%),恶性肿瘤多为血性(46.43%);20.00%的急慢性非特异性炎症患者的胸腔积液是透明的,62.5%的TPE为轻度浑浊,67.86%的MPE为中度浑浊,66.67%的化脓性胸膜炎患者的胸腔积液为重度浑浊。见表3。

表2 108例渗出性胸腔积液患者的临床特征[n(%)]

项目	恶性肿瘤(n=28)	结核性胸膜炎(n=72)	急慢性非特异性炎症(n=5)	化脓性胸膜炎(n=3)	χ^2	P
性别					2.722	0.436
男	21(75.00)	46(63.89)	3(60.00)	3(100)		
女	7(25.00)	26(36.11)	2(40.00)	0		
吸烟史	15(53.57)	32(44.44)	2(40.00)	3(100)	4.089	0.252
年龄					47.702	0.000
<18岁	0	2(2.78)	0	0		
18~34岁	0	38(52.78)	2(40.00)	0		
35~59岁	6(21.43)	23(31.94)	1(20.00)	2(66.67)		
>59岁	22(78.57)	9(12.50)	2(40.00)	1(33.33)		
体温					20.675	0.014
<37 $^{\circ}\text{C}$	23(82.14)	38(52.78)	4(80.00)	0		
37~38 $^{\circ}\text{C}$	4(14.29)	8(11.11)	1(20.00)	0		
>38~39 $^{\circ}\text{C}$	1(3.57)	18(25.00)	0	2(66.67)		
>39 $^{\circ}\text{C}$	0	8(11.11)	0	1(33.33)		
体征						
咳嗽	26(92.86)	62(86.11)	4(80.00)	2(66.67)	2.218	0.528
咳痰	20(71.43)	39(54.17)	4(80.00)	2(66.67)	3.437	0.329
胸闷	13(46.43)	23(31.94)	1(20.00)	0	4.027	0.259
胸痛	10(35.71)	37(51.39)	1(20.00)	2(66.67)	3.903	0.272
盗汗	1(3.57)	20(27.78)	0	0	9.627	0.022
咯血	3(10.71)	2(2.78)	1(20.00)	0	4.644	0.200
气促	25(89.29)	58(80.56)	2(40.00)	2(66.67)	6.982	0.072
体重下降	9(32.14)	47(65.27)	1(20.00)	1(33.33)	48.382	0.008

表 3 108 例渗出性胸腔积液患者胸腔积液特征及镜下胸膜特征[n(%)]

项目	恶性肿瘤(n=28)	结核性胸膜炎(n=72)	急慢性非特异性炎症(n=5)	化脓性胸膜炎(n=3)	χ^2	P
胸腔积液颜色					39.001	0.000
浅黄色	6(21.43)	25(34.72)	3(60.00)	1(33.33)		
深黄色	9(32.14)	46(63.89)	2(40.00)	2(66.67)		
血性	13(46.43)	1(1.39)	0	0		
胸腔积液透明度					63.304	0.000
透明	0	2(2.78)	1(20.00)	0		
轻度浑浊	9(32.14)	45(62.50)	3(60.00)	0		
中度浑浊	19(67.86)	24(33.33)	1(20.00)	1(33.33)		
重度浑浊	0	1(1.39)	0	2(66.67)		
胸腔镜下胸膜特征						
充血水肿	9(32.14)	63(87.50)	5(100)	3(100)	35.193	0.000
增生增厚	14(50.00)	8(11.11)	0	1(33.33)	19.736	0.000
广泛粘连	4(14.29)	37(51.39)	1(20.00)	2(66.67)	12.562	0.004
均匀一致结节	0	34(47.22)	0	0	24.811	0.000
大小不等结节	21(75.00)	31(43.06)	4(80.00)	0	13.059	0.005
肿块	6(21.43)	0	0	0	18.151	0.000

^a: P<0.05。

根据赵凡杰等^[1]和陈永倬等^[6]的研究,将胸腔镜下胸膜表现分为以下 6 类:(1)充血水肿;(2)增生增厚;(3)广泛粘连;(4)均匀一致结节;(5)大小不等结节;(6)肿块。如表 3 所示,各类渗出性胸腔积液患者的镜下表现不尽相同,结核性胸膜炎患者镜下以胸膜充血水肿、广泛粘连、均匀一致结节为主(分别为 87.50%,51.39%,47.22%);恶性肿瘤患者镜下以胸膜增生增厚、大小不等结节、肿块为主要表现(分别为 50.00%,75.00%,21.43%);急慢性非特异性炎症患者镜下以充血水肿、大小不等结节为主要表现(分别为 100%,80.00%),20%的急慢性非特异性炎症患者存在广泛粘连;化脓性胸膜炎镜下以充血水肿及广泛粘连为主要表现(分别为 100%,66.67%),且未见明显胸膜结节及增生增厚。

化脓性胸膜炎患者胸腔积液白细胞(WBC)水平明显高于 MPE、TPE 和急慢性非特异性炎症患者炎性胸腔积液,差异均有统计学意义(P<0.05),见图 1。不同患者胸腔积液中的腺苷酸脱氢酶(ADA)、乳酸脱氢酶(LDH)、C 反应蛋白(CRP)、淀粉酶(AMY)、葡萄糖(Glu)水平的比较差异有统计学意义(P<0.05),见图 2~6。各组患者 ESR 水平比较差异均无统计学意义(P>0.05),见图 7。

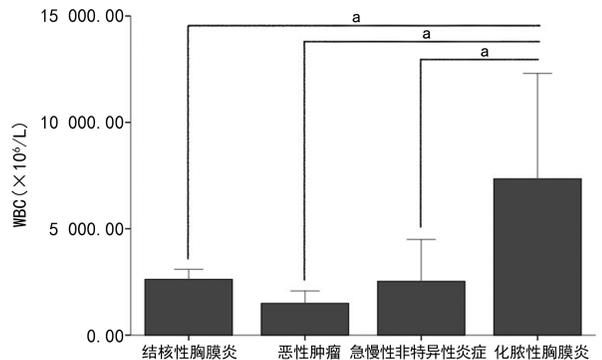
2.4 108 例渗出性胸腔积液患者的胸腔彩超检查

B 超显示各组患者中,胸腔积液的位置和深度差异均无统计学意义(P>0.05),见表 4。

2.5 28 例恶性肿瘤患者肿瘤生物标志物分析

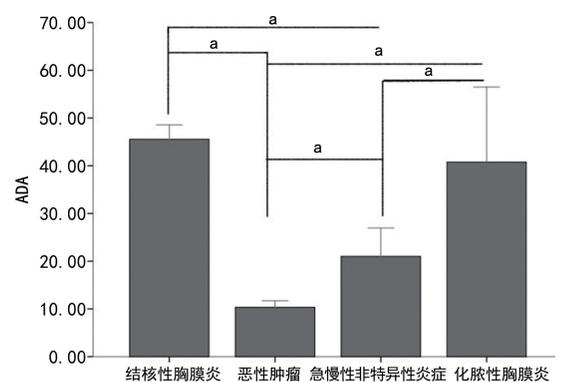
在纳入的 28 例恶性肿瘤患者中,胸腔积液中脱落细胞的阳性率为 53.57%(15/28),19 例患者行痰液脱落细胞检查,均未查见肿瘤细胞,超过 70%的患者

MPE CYFRA21-1(16/19,84.21%)及 CEA(19/26,73.80%)水平升高,超过 40.00%的患者 MPE CA199(9/20,45.00%)及 SCCA(7/15,46.67%)水平增高,AFP(16/18,88.89%)和 NSE 在 80%以上的患者 MPE 中未见显示明显变化。在纳入患者中,所有患者 MPE FER 水平均升高。



^a: P<0.05。

图 1 各类型胸腔积液中 WBC 水平的比较

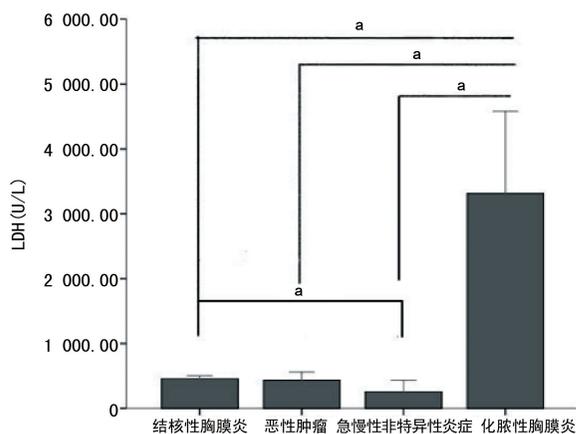


^a: P<0.05。

图 2 各类型胸腔积液中 ADA 水平的比较

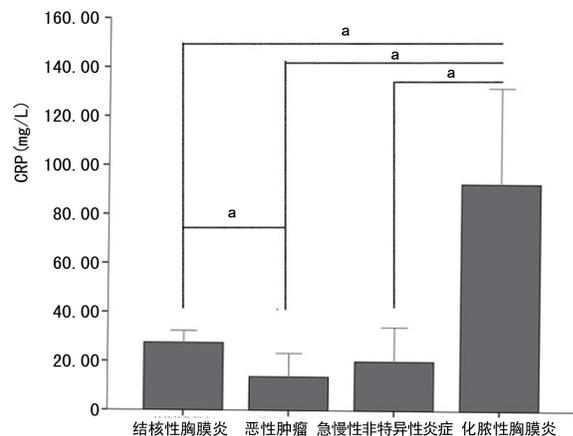
表4 108例渗出性胸腔积液患者的胸腔彩超检查[n(%)]

项目	恶性肿瘤 (n=28)	结核性胸膜炎 (n=72)	急性非特异性炎症 (n=5)	化脓性胸膜炎 (n=3)	χ^2	P
胸腔积液位置					1.075	0.983
左侧	10(35.72)	26(36.11)	2(40.00)	1(33.33)		
右侧	18(64.28)	44(61.11)	3(60.00)	2(66.67)		
双侧	0	2(2.78)	0	0		
胸腔积液深度					8.569	0.199
3.0~<6.0 cm	2(7.14)	11(15.28)	2(40.00)	1(33.33)		
6.0~<9.0 cm	8(28.57)	23(31.94)	2(40.00)	2(66.67)		
≥9.0 cm	18(64.29)	38(52.78)	1(20.00)	0		



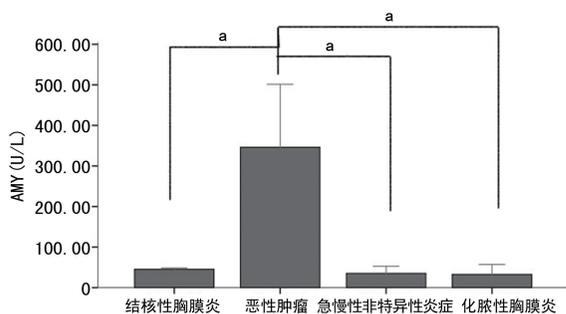
^a: $P < 0.05$ 。

图3 各类型胸腔积液中 LDH 水平的比较



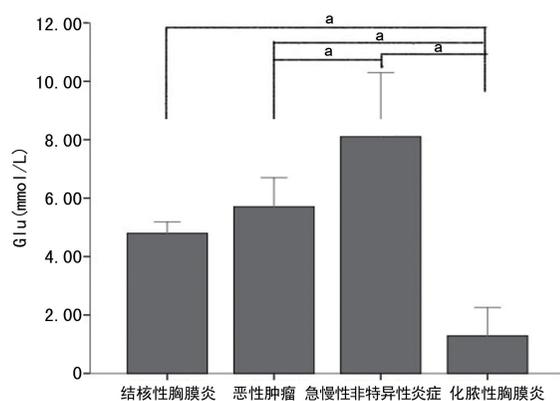
^a: $P < 0.05$ 。

图4 各类型胸腔积液中 CRP 水平的比较



^a: $P < 0.05$ 。

图5 各类型胸腔积液中 AMY 水平的比较



^a: $P < 0.05$ 。

图6 各类型胸腔积液中 Glu 水平的比较

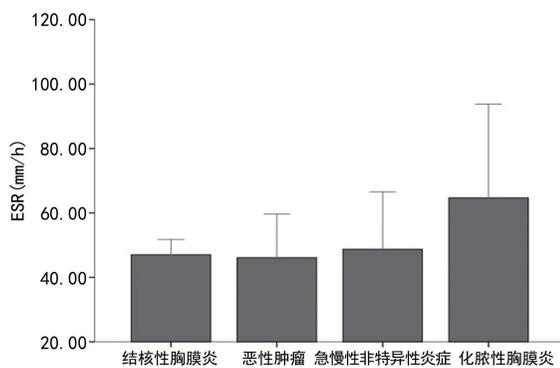


图7 各类型胸腔积液患者 ESR 水平的比较

2.6 LDH/ADA 及 ADA 对结核性胸膜炎的诊断价值

根据纳入的 108 例渗出性胸腔积液患者是否确诊为结核性胸膜炎绘制 ROC 曲线,分析胸腔积液 LDH/ADA 比值及 ADA 对协助疾病区分结核性胸膜炎与其他原因的渗出性胸腔积液的临床价值。使用 ROC 曲线计算 LDH/ADA 诊断结核性胸膜炎的 AUC 为 0.917(95%CI:0.847~0.962, $P < 0.001$),计算出 LDH/ADA 比值为 16.7 时 Youden 指数最大,其敏感度为 94.3%,特异度为 85.7%,为最佳临界值;LDH/ADA 为 11.8 时具有更高的特异度(91.4%),此时敏感度为 71.4%;LDH/ADA 为 25.2 时具有更高的敏感度(98.5%),但特异度下降至

65.7%，并根据曲线计算出 BLAKISTON 等^[7]、WANG 等^[8]、BEUKES 等^[9]研究中所建议的 LDH/ADA 比值在本研究中的诊断效能，见表 5。大部分研究以 ADA>40 U/L 作为诊断结核的临界值，在本研究中计算出 ADA>40 U/L 时敏感度为 64.8%，特异度为 94.3%。此外，将是否以淋巴细胞为主的胸腔积液(lymphocyte predominant effusion, LPE)纳入诊断条件，分别计算 LDH/ADA 或 ADA>40 U/L 联合 LPE 诊断结核性胸膜炎的敏感度和特异度，见表 5。

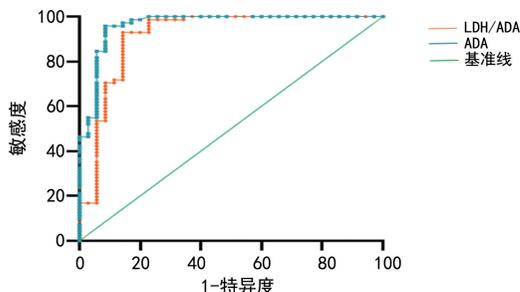


图 8 胸腔积液 LDH/ADA 鉴别结核性胸膜炎与其他渗出性胸腔积液的 ROC 曲线

表 5 LDH/ADA 及 ADA 对结核性胸膜炎的诊断性能评价(%)

项目	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
LDH/ADA 比值				
11.8	71.4	91.4	94.3	50.4
15.0 ^[9]	84.5	85.7	92.3	73.5
12.5 ^[8]	72.9	85.7	91.11	60.0
16.2 ^[7]	91.5	85.7	92.3	83.7
16.7	94.3	85.7	93.0	85.7
25.2	98.5	65.7	85.4	95.8
LDH/ADA+LPE	98.6	80.0	90.9	96.6
ADA>40 U/L	64.8	94.3	97.3	48.1
ADA>40 U/L+LPE	94.4	97.1	98.5	89.5

3 讨 论

胸腔积液病因复杂，早期诊断和治疗对患者的预后至关重要。本研究分析了 108 例渗出性胸腔积液患者的临床特征，在恶性肿瘤、结核性胸膜炎、急慢性非特异性炎症、化脓性胸膜炎各组病例中，性别、吸烟史、咳嗽、咳痰、胸闷、胸痛、咯血、气促患者的比例差异均无统计学意义($P>0.05$)，结核性胸膜炎患者年龄在 18~34 岁最为多见(52.87%)，而恶性肿瘤患者中大于 59 岁患者所占比例最高(78.57%)，结核性胸膜炎患者多为中度发热(25.00%)，化脓性胸膜炎患者表现为中度发热及高热(分别为 66.67% 和 33.33%)。盗汗和体重减轻是结核性胸膜炎最常见的症状(分别为 27.78%，65.27%)，但急慢性非特异性炎症患者胸腔积液的临床特征无明显特异性，仅根

据胸腔积液的临床特征很难确定病因。此外，本研究中各类型渗出性胸腔积液患者的胸腔积液位置、深度及 ESR 差异无统计学意义($P>0.05$)，表明 ESR 和 B 超检查对确定胸腔积液原因的诊断意义不大。

本研究对 4 类渗出性胸腔积液患者的胸腔积液常规和生化进行了分析，在各组患者中胸腔积液颜色及浑浊度不尽相同，且不同组胸腔积液 ADA、LDH、CRP、AMY、Glu 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。临床工作中，以淋巴细胞为主和高 ADA 水平的渗出性胸腔积液常有助于结核性胸膜炎的诊断。ADA 是 1 种由单核细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞和红细胞分泌的酶，分为 ADA-1 和 ADA-2。但是，在临床仅常规测量总 ADA。ADA-2 主要在单核细胞和巨噬细胞中表达并从中释放，与细胞内感染(如 TPE)相关；脓胸中始终存在高水平的 ADA-1；而 LDH 作为几乎所有主要器官系统中普遍存在的细胞质酶，通常会以非特异性方式响应细胞损伤或细胞死亡而增加数量^[7]。最近研究表明，TPE 中 LDH/ADA 明显低于非 TPE^[7-9]，LDH/ADA 可助于区分结核性胸膜炎与其他胸膜渗出液疾病。来自南非的 1 项前瞻性研究指出，LDH/ADA= ≤ 12.5 是最佳临界值，敏感度为 86%，特异度为 88%^[8]；在新西兰的 1 份回顾性报告中，包括 57 例确诊为结核性胸膜炎的患者，LDH/ADA=15.0 的敏感度为 89%，特异度为 85%^[7]。在我国的 1 项纳入 72 例结核性胸膜炎患者的研究中，LDH/ADA=16.2 是最佳阈值，敏感度为 93%，特异度为 62%^[8]。本研究也证明 LDH/ADA 对诊断结核性胸膜炎有较高价值的辅助手段，LDH/ADA=16.7 具有最佳的总体诊断效率，敏感度为 94.3%，特异度为 85.7%，联合 LPE 这一因素后，敏感度明显提高至 98.6%，特异度为 80.0%。与其他研究一致，ADA ≥ 40 U/L 与 LPE 的联合诊断对 TPE 具有最高的特异度和阳性预测值^[9-10]。以上胸腔积液常规及生化指标对渗出性胸腔积液的诊断有一定的提示价值，但与胸腔镜下胸膜活检比较，上述指标仍缺乏足够的敏感度和特异度。

为了提高 MPE 的诊断，已有大量研究对肿瘤标志物进行了深入的检查，ZHANG 等^[11]对 271 例胸腔积液患者的胸腔积液肿瘤标志物进行分析，结果显示，与其他肿瘤生物标记物比较，胸腔积液 CEA 以 5.23 ng/mL 为临界值(敏感度为 89.8%，特异度为 98.6%)时是鉴别肺癌相关 MPE 的最有效的生物标志物。联合检测血清 CYFRA21-1、NSE 水平和胸腔积液 NSE 值在区分 MPE 和非 MPE 方面有较高的临床价值^[12]。胸腔积液的细胞学分析在恶性肿瘤的诊断中起着重要作用，该方法具 100%的特异度，但敏感度通常只有 50%~70%，本研究中，胸腔积液脱落细胞阳性率为 53.57%，与上述报道基本相符。

在本研究纳入的 113 例患者中，依据术后病理结

果,108 例患者明确诊断,胸腔镜对渗出性胸腔积液诊断率约为 95.58%,与文献报道相符^[13]。其并发症较少,报道的发生率在 2.0%~44.1%,其中包括伤口疼痛(24.9%~44.1%)、皮下气肿(8.0%)、术后发热(5.3%)、轻微出血(4.6%)、低血压(0.5%)、复张性肺水肿(0.5%)和脓胸(0.4%)^[5,13-14],本研究中胸腔镜并发症发生率为 35.19%,19.44%的患者出现伤口疼痛,10.19%的患者出现并发症,5.56%的患者出现轻度皮下气肿,与文献报道基本相符。根据本文胸膜活检结果,渗出性胸腔积液的最常见原因是 TPE,其次是 MPE。WANG 等^[15]分析了 833 例行胸腔镜的患者,41.1%的患者被诊断为 MPE,40.0%的患者诊断为 TPE,炎性胸腔积液占 8.4%。THOMAS 等^[16]的研究中,84.5%的渗出性胸腔积液为 TPE,只有 5.2%的为 MPE。在 WU 等^[17]的研究中,最常见的恶性肿瘤是肺癌,占胸膜转移患者的 85.3%,其次是胸膜恶性间皮瘤、淋巴瘤。本研究对 4 组患者镜下特征性表现进行归纳分析,结核性胸膜炎患者镜下以胸膜充血水肿、广泛粘连、均匀一致结节为主,恶性肿瘤患者中,胸膜增生增厚、大小不等结节、肿块更具代表性,化脓性胸膜炎镜下以充血水肿及广泛粘连为主要表现,而未见明显结节与增生,炎性胸腔积液患者镜下以充血水肿、大小不等结节为主要表现,与 WANG 等^[15]、WU 等^[17]的研究相符合。内科胸腔镜 MPE 和 TPE 是最常见的病因。

综上,内科胸腔镜是 1 种微创手术,创伤小、准确性高、并发症少,通过直视下精确定位,获得高质量组织标本,对胸腔积液的定性诊断具有重要的应用价值。患者的临床表现、胸腔积液常规和生化等指标及内镜下特征性表现对各类型渗出性胸腔积液鉴别有较大提示意义。此外,镜下对胸膜粘连带进行分离可促进胸膜表面毛细血管和淋巴管的畅通,增加胸膜液的重吸收能力,延缓胸腔积液的进展,减少胸膜的粘连,并改善临床症状^[18]。但本研究为单中心回顾性研究,病例数偏少,存在一定的局限性,尚待大样本多中心的研究进行进一步验证。

参考文献

- [1] 赵凡杰,候飞飞,樊芳芳,等.结核性与 MPE 内科胸腔镜下特征比较及诊断相关因素分析[J].国际呼吸杂志,2020,40(9):651-655.
- [2] HOOPER C,LEE Y C,MASKELL N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010[J]. Thorax,2010,65:4-17.
- [3] DEFRANCIS N. Needle biopsy of the parietal pleura, a preliminary report [J]. New Engl J Med,1955,252(22):948-951.
- [4] ZUBERI F F,ZUBERI B F,ALI S K, et al. Yield of closed pleural biopsy and cytology in exudative pleural effusion[J]. Pak J Med Sci, 2016,32:356-360.
- [5] WEI Y,SHEN K,LVT, et al. Comparison between closed pleural biopsy and medical thoracoscopy for the diagnosis of undiagnosed exudative pleural effusions: a systematic review and meta-analysis [J]. Transl Lung Cancer Res, 2020,9(3):446-458.
- [6] 陈永倬,程宏宁,占洁坚,等.内科胸腔镜对胸腔积液的诊断价值[J].南方医科大学学报,2010,30(9):2202-2204.
- [7] BLAKISTON M,CHIU W,WONG C, et al. Diagnostic performance of pleural fluid adenosine deaminase for tuberculous pleural effusion in a low-incidence setting [J]. J Clin Microbiol, 2018,56(8):1-8.
- [8] WANG J,LIU J,XIE X, et al. The pleural fluid lactate dehydrogenase/adenosine deaminase ratio differentiates between tuberculous and parapneumonic pleural effusions [J]. BMC Pulm Med,2017,17(1):168.
- [9] BEUKES A,SHAW J A,DIACON A H, et al. The utility of pleural fluid lactate dehydrogenase to adenosine deaminase ratio in pleural tuberculosis[J]. Respiration,2020,12(17):1-5.
- [10] KOEGELENBERG C F,BOLLIGER C T,THE- RON J, et al. Direct comparison of the diagnostic yield of ultrasoundassisted abrams and tru-cut needle biopsies for pleural tuberculosis[J]. Thorax, 2010;65(10):857-862.
- [11] ZHANG H,LI C,HU F, et al. Auxiliary diagnostic value of tumor biomarkers in pleural fluid for lung cancer-associated malignant pleural effusion[J]. Respir Res,2020,21(1):284.
- [12] VOLARIC D,FLEGO V,ŽAUHAR G, et al. Diagnostic value of tumour markers in pleural effusions[J]. Biochem Med,2018,28(1):010706.
- [13] LIU J Y,XIONG L,ZHANG M, et al. Medical thoracoscopy in China—the present status and the future[J]. J Thorac Dis,2017,9(2): 406-413.
- [14] WANG X J,YANG Y,WANG Z, et al. Efficacy and safety of diagnostic thoracoscopy in undiagnosed pleural effusions [J]. Respiration, 2015,90:251-255. (下转第 1151 页)

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.013

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1823.008.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1823.008.html(2021-12-15))

胎膜早破与正常胎膜破裂患者羊水病原菌分布及药敏分析*

刘敏雪,黄丽英,王双杰,梁嘉慧,曾尚娟,岑贞娇,黄战,张欢

(广西壮族自治区妇幼保健院检验科,南宁 530000)

[摘要] **目的** 对比分析胎膜早破与产程开始后胎膜破裂患者羊水细菌与真菌分布及耐药特征,为临床提供病原学依据。**方法** 回顾性分析该院 2018—2019 年羊水培养情况,将羊水培养阳性患者分为胎膜早破组与产程开始后胎膜破裂组(正常胎膜破裂组),比较 2 组患者的基本情况、羊水检出病原菌的构成及主要致病菌的药敏特征。**结果** 胎膜早破组共纳入 98 例,正常胎膜破裂组共纳入 197 例。2 组羊水检出最多的致病菌均为革兰阴性杆菌(55.45% vs. 49.56%, $P>0.05$),排名前 3 位的革兰阴性杆菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴道加德纳菌。革兰阳性球菌是羊水第二大类病原菌(32.73% vs. 30.97%, $P>0.05$),以无乳链球菌为主。另外,2 组羊水检出的真菌比例差异有统计学意义(2.73% vs. 14.60%, $P<0.001$),胎膜早破组检出白念珠菌比例较正常胎膜破裂组低(2.73% vs. 13.27%, $P=0.002$)。2 组检出的无乳链球菌对青霉素类、头孢类、糖肽类及碳青霉烯类抗生素均敏感,而对红霉素、克林霉素及四环素耐药率较高,且胎膜早破组无乳链球菌对四环素的耐药率远低于正常胎膜破裂组(40.00% vs. 82.61%, $P=0.014$)。另外,胎膜早破组检出大肠埃希菌对氨苄西林、复方新诺明、环丙沙星及头孢类抗生素耐药率均比正常胎膜破裂组高($P<0.05$),且胎膜早破组检出产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的比例远高于正常胎膜破裂组(56.10% vs. 18.07%, $P<0.001$)。**结论** 产程开始后胎膜破裂患者羊水检出念珠菌较胎膜早破患者高;胎膜早破患者羊水检出的大肠埃希菌对抗生素耐药率更高。

[关键词] 胎膜早破;产程开始后胎膜破裂;羊水;病原菌;药敏试验**[中图分类号]** R115 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1147-05

Distribution of pathogens and drug susceptibility of pathogenic bacteria in amniotic fluid in patients with premature rupture of membranes and normal mature rupture of membranes*

LIU Minxue, HUANG Liying, WANG Shuangjie, LIANG Jiahui, ZENG Shangjuan, CEN Zhenjiao, HUANG Zhan, ZHANG Huan

(Department of Laboratory Medicine, the Maternal & Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China)

[Abstract] **Objective** To compare and analyze the pathogenic organism and its antibiotics sensitivity cultured from amniotic fluid between premature rupture of membranes (PROM) maternal patients and normal mature rupture of membranes (NROM) maternal patients and to provide microbiology references for clinical empirical medication. **Methods** The amniotic fluid materials of this Hospital of Guangxi from 2018 to 2019 were retrospective analyzed. The amniotic fluid positive culture patients were divided into the PROM group and the NROM group. The basic information, composition rates of pathogenic organism and antibiotics sensitivity of the major pathogenic bacteria were compared between the two groups. **Results** A total of 98 cases were included in the PROM group and 197 cases in the NROM group. Gram-negative (G^-) bacillus were the most in both groups (55.45% vs. 49.56%, $P>0.05$) and the top three were Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Gardnerella vaginalis. The second most bacteria cultured from amniotic fluid were Gram-positive (G^+) coccus (32.73% vs. 30.97%, $P>0.05$), among which Streptococcus agalactiae was the main. In addition, there was a significant difference in the percentage of fungi detected in amniotic fluid between the two

* 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(Z20190836);广西壮族自治区妇幼保健院 2018 年“育苗计划”青年项目(GXWCH-YMJH-2018008);广西临床重点专科(医学检验科)建设项目。 作者简介:刘敏雪(1991—),检验技师,硕士,主要从事临床微生物学研究。

groups (2.73% vs. 14.60%, $P < 0.001$). The rate of candida albicans in the PROM group were less than that in the NROM group (2.73% vs. 13.27%, $P = 0.002$). Streptococcus agalactiae of the both groups were sensitive to penicillins, cephalosporins, glycopeptides and carbapenems. But Streptococcus agalactiae from the PROM group were less resistant to tetracycline than that in the NROM group (40.00% vs. 82.61%, $P = 0.014$). Otherwise, Escherichia coli in the PROM group were more resistant to ampicillin, sulfamethoxazole, ciprofloxacin and cephalosporins than that in the NROM group ($P < 0.05$). Also, the positive rate of ESBLs-produced Escherichia coli in the PROM group were higher than that in the NROM group (56.10% vs. 18.07%, $P < 0.001$). **Conclusion** Candida albicans in amniotic fluid of the NROM maternal patients were more than the PROM maternal patients. The antibiotics resistance of Escherichia coli from the PROM maternal patients amniotic fluid were higher.

[Key words] premature rupture of membranes; normal mature rupture of membranes; amniotic fluid; pathogens; drug susceptibility

胎膜早破是指在临产出现规律宫缩前胎膜已经破裂^[1-2]。羊水培养常作为宫内细菌或真菌感染的诊断依据之一。研究报道显示,胎膜早破更容易引起孕产妇及新生儿感染等不良妊娠结局^[3-5]。目前国内外大多数研究仅分析了胎膜早破患者羊水病原菌培养及药敏结果,尚无胎膜早破与产程开始后胎膜破裂孕产妇羊水检出病原菌及耐药特征比较的报道。本文旨在比较胎膜早破与产程开始后胎膜破裂孕产妇羊水检出病原菌及其耐药情况,为临床医生诊治胎膜早破与产程开始后胎膜破裂宫内感染患者提供病原学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本文为回顾性研究,纳入 2018 年 1 月至 2019 年 12 月本院羊水培养阳性患者。根据患者临床诊断将其分为胎膜早破组及产程开始后胎膜破裂组(正常胎膜破裂组)。收集 2 组患者临床资料,对羊水培养出的病原菌及其药敏情况进行比较分析。

1.2 标本采集、菌株培养、鉴定与药敏实验

临床医生在进行剖宫产手术或检查时发现羊水浑浊,即用无菌方法采集羊水标本送检。手术患者在手术时若羊水浑浊,羊水标本采集选择在切开羊膜囊后、胎儿娩出前,用无菌注射器采集 2~5 mL 羊水标本送检。非手术患者,临床医师在消毒阴道后戴无菌手套至宫口取羊水,然后用无菌注射器取 2~5 mL 送检。羊水标本在常温下 1 h 内运送至实验室,实验室人员根据医嘱情况将羊水标本接种血平板和巧克力平板和/或淋球菌平板培养基(安图,郑州),然后进行有氧或厌氧培养 48 h 以上。培养出的菌株分纯后用 DL-96 微生物全自动鉴定及药敏分析仪(迪尔,珠海)或 Vitek 2 compact 自动分析仪(梅里埃,法国)进行培养和鉴定。药敏折点参考临床实验室标准协会 M100-S28 标准^[6]。

1.3 检测指标

(1)分析比较 2 组患者年龄、基础疾病(包括妊娠期糖尿病、妊娠期高血压、贫血、乙型病毒性肝炎或梅

毒传染病、羊水过多或过少)、入住产科重症监护病房(ICU)情况及胎膜破裂时孕周大小。(2)比较 2 组患者羊水病原菌检出构成比,需氧菌或兼性厌氧菌按革兰阳性菌、革兰阴性菌及真菌分类统计,并统计厌氧菌检出情况。(3)比较分析 2 组患者羊水培养出主要病原菌的耐药性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布且方差齐的计量资料采用两样本 t 检验进行比较分析,非正态分布或方差不齐的计量资料采用秩和检验进行比较分析;计数资料使用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组孕产妇一般情况比较

2018—2019 年共 1 840 例孕产妇送检羊水培养,胎膜早破组 659 例(35.82%),正常胎膜破裂组 1 181 例(64.18%)。羊水培养阳性共 295 例(16.03%),其中胎膜早破组 98 例,正常胎膜破裂组 197 例。胎膜早破组孕周小于正常胎膜破裂组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。胎膜早破组患者年龄大于正常胎膜破裂组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。而 2 组患者入住产科 ICU 比例及患基础疾病情况差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 2 组患者羊水培养情况

胎膜早破组中有 6 例(6.12%)患者羊水培养出 2 种菌,3 例(3.06%)患者羊水培养出 3 种菌,其余都是检出 1 种病原菌,最后共培养出 110 株菌。正常胎膜破裂组有 25 例(12.69%)患者羊水培养出 2 种菌,2 例(1.02%)患者羊水培养出 3 种菌,最后共培养出 226 株菌。2 组羊水培养出的病原菌均以革兰阴性杆菌为主(55.45% vs. 49.56%, $P = 0.310$),检出率排名前 3 位的革兰阴性杆菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴道加德纳菌。2 组羊水检出的第二大病原菌为革兰阳性球菌(32.73% vs. 30.97%, $P = 0.745$),其中占比最多的均为无乳链球菌(9.09% vs.

10.18%)。统计学显示,2 组患者羊水检出细菌的比例差异均无统计学意义($P>0.05$)。而 2 组羊水检出的真菌比例差异有统计学意义(2.73% vs. 14.60%, $P<0.001$),检出真菌均以白念珠菌为主(2.73% vs. 13.27%, $P=0.002$)。2 组检出厌氧菌比例差异无统计学意义(3.64% vs. 1.33%, $P=0.164$)。见表 2。

表 1 胎膜早破组和正常胎膜破裂组患者临床特征比较

项目	胎膜早破组 (n=98)	正常胎膜破裂组 (n=197)	t/ χ^2	P
孕周($\bar{x}\pm s$,周) ^a	36.86±3.07	39.00±1.73	-6.415	<0.001
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	32.15±4.47	30.01±3.97	4.200	<0.001
入住产科 ICU[n(%)]	16(16.33)	25(12.69)	0.723	0.395
基础疾病[n(%)]				
妊娠期糖尿病	19(19.39)	43(21.83)	0.235	0.628
妊娠期高血压	9(9.18)	20(10.15)	0.069	0.792
贫血	7(7.14)	19(9.64)	0.510	0.475
乙型病毒性肝炎、梅毒传染病	14(14.29)	17(8.63)	2.226	0.136
羊水过多或过少	3(3.06)	18(9.14)	3.654	0.056

^a:有缺失值。

表 2 胎膜早破组和正常胎膜破裂组患者羊水培养阳性菌比较[n(%)]

菌株	胎膜早破组 (n=110)	正常胎膜破裂组 (n=226)	χ^2	P
需氧菌或兼性厌氧菌	103(93.64)	190(84.07)	6.066	0.014
革兰阳性球菌	36(32.73)	70(30.97)	0.105	0.745
无乳链球菌	10(9.09)	23(10.18)	0.099	0.754
化脓链球菌	0	1(0.44)	0.488	0.485
其他链球菌	14(12.73)	20(8.85)	1.135	0.287
金黄色葡萄球菌	1(0.91)	7(3.10)	1.524	0.217
CNS	2(1.82)	6(2.65)	0.223	0.637
肠球菌	9(8.18)	13(5.75)	0.714	0.398
革兰阳性杆菌	6(5.45)	8(3.54)	0.679	0.410
革兰阴性杆菌	61(55.45)	112(49.56)	1.030	0.310
大肠埃希菌	41(37.27)	83(36.73)	0.010	0.922
肺炎克雷伯菌	4(3.64)	9(3.98)	0.024	0.877
阴道加德纳菌	6(5.45)	8(3.54)	0.679	0.410
铜绿假单胞菌	2(1.82)	1(0.44)	1.582	0.208
流感嗜血杆菌	1(0.91)	0	2.061	0.151
奇异变形杆菌	1(0.91)	1(0.44)	0.272	0.602
摩氏摩根菌	0	1(0.44)	0.488	0.485
粘质沙雷菌	1(0.91)	0	2.061	0.151
克氏柠檬酸杆菌	1(0.91)	0	2.061	0.151
无丙二酸柠檬酸杆菌	1(0.91)	0	2.061	0.151
弗劳地柠檬酸杆菌	1(0.91)	1(0.44)	0.272	0.602

续表 2 胎膜早破组和正常胎膜破裂组患者羊水培养阳性菌比较[n(%)]

菌株	胎膜早破组 (n=110)	正常胎膜破裂组 (n=226)	χ^2	P
产气肠杆菌	0	1(0.44)	0.488	0.485
鲍曼不动杆菌	0	1(0.44)	0.488	0.485
其他阴性杆菌	2(1.82)	6(2.65)	0.223	0.637
真菌	3(2.73)	33(14.60)	10.906	<0.001
白念珠菌	3(2.73)	30(13.27)	9.293	0.002
光滑念珠菌	0	2(0.88)	0.979	0.322
克柔念珠菌	0	1(0.44)	0.488	0.485
厌氧菌	4(3.64)	3(1.33)	1.934	0.164

CNS:凝固酶阴性葡萄球菌。

2.3 无乳链球菌药敏情况

2 组患者羊水检出革兰阳性球菌中排第 1 位的无乳链球菌药敏情况如表 3 所示,2 组检出无乳链球菌对青霉素、氨苄西林、头孢曲松、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺及美罗培南均敏感,而对红霉素、克林霉素及四环素耐药率较高,并且胎膜早破组检出的无乳链球菌对四环素的耐药率远低于正常胎膜破裂组,且差异有统计学意义(40.00% vs. 82.61%, $P=0.014$)。

表 3 胎膜早破组和正常胎膜破裂组患者羊水检出无乳链球菌耐药率比较[n(%)]

抗生素	胎膜早破组 (n=10)	正常胎膜破裂组 (n=23)	χ^2	P
青霉素	0	0		
氨苄西林	0	0		
红霉素	5(50.00)	18(78.26)	2.636	0.104
克林霉素	4(40.00)	16(69.57)	2.552	0.110
四环素	4(40.00)	19(82.61)	5.991	0.014
左氧氟沙星	3(30.00)	4(17.39)	0.663	0.416
头孢曲松	0	0		
万古霉素	0	0		
替考拉宁	0	0		
利奈唑胺	0	0		
美罗培南	0	0		

2.4 大肠埃希菌药敏情况

2 组患者羊水检出革兰阴性杆菌中排第 1 位的大肠埃希菌药敏情况如表 4 所示,胎膜早破组检出大肠埃希菌对氨苄西林、复方新诺明、环丙沙星、头孢唑林、头孢呋辛、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟耐药率均比正常胎膜破裂组高($P<0.05$)。且胎膜早破组检出产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的比例高于正常胎膜破裂组(56.10% vs. 18.07%, $P<0.001$)。而 2 组对阿米卡星、碳青霉烯类抗生素、头

孢哌酮/舒巴坦及米诺环素均敏感。

表4 胎膜早破组和正常胎膜破裂组患者羊水检出大肠埃希菌耐药比较[n(%)]

抗生素	胎膜早破组 (n=41)	正常胎膜破裂组 (n=83)	χ^2	P
氨苄西林	36(87.80)	59(71.08)	4.282	0.039
氨苄西林/舒巴坦	9(21.95)	10(12.05)	2.074	0.150
复方新诺明	26(63.41)	35(42.17)	4.956	0.026
氯霉素	14(34.15)	17(20.48)	2.733	0.098
替卡西林/棒酸	3(7.32)	3(3.61)	0.817	0.366
庆大霉素	8(19.51)	19(22.89)	0.184	0.668
阿米卡星	0	0		
左氧氟沙星	7(17.07)	6(7.23)	2.834	0.092
环丙沙星	11(26.83)	9(10.84)	5.184	0.023
美洛培南	0	0		
亚胺培南	0	0		
头孢唑林	29(70.73)	19(22.89)	26.474	<0.001
头孢呋辛	24(58.54)	15(18.07)	20.842	<0.001
头孢西丁	0	1(1.20)	0.498	0.480
头孢曲松	24(58.54)	15(18.07)	20.842	<0.001
头孢他啶	7(17.07)	3(3.61)	6.705	0.010
头孢吡肟	10(24.39)	9(10.84)	3.882	0.049
头孢哌酮/舒巴坦	0	0		
哌拉西林/他唑巴坦	0	1(1.20)	0.498	0.480
米诺环素	0	0		
产ESBLs	23(56.10)	15(18.07)	18.670	<0.001

3 讨论

本研究结果显示,胎膜早破组患者平均年龄大于正常胎膜破裂组($P<0.001$),这一结论与张文静^[7]研究得出年龄是胎膜早破的危险因素之一结果相符,所以高龄产妇更应加强孕期保健,避免不良妊娠结局。另外,本研究中胎膜早破组患者孕周小于正常胎膜破裂组($P<0.001$),略小于重庆地区报道的胎膜早破患者孕周(37.85周)^[8]。

本院羊水检出无乳链球菌在革兰阳性球菌中占比最高,2组无乳链球菌检出率分别为9.09%、10.18%,远远高于桂平市孕产妇羊水无乳链球菌检出率($<0.9\%$)^[9],可能跟不同地区病原菌分布不同有关,或者是由于本院为妇女儿童专科医院,孕产妇病情较其他综合医院重。无乳链球菌是引起孕产妇及新生儿感染的重要病原菌^[10-11],目前美国《围产期GBS预防指南》推荐常规对27~35周孕产妇进行无乳链球菌筛查^[12],但对于胎膜早破患者应提前进行筛查,以便胎膜破裂时预防性使用抗生素防止感染发生。经验性使用抗生素预防或治疗无乳链球菌感染

时,应选择胎膜早破组及正常胎膜破裂组均敏感的青霉素类、头孢类等抗生素。由于正常胎膜破裂组羊水检出的无乳链球菌较胎膜早破组对四环素更耐药($P=0.014$),故未做药敏实验时不推荐使用四环素治疗无乳链球菌感染,特别是针对产程开始后胎膜破裂患者。

2组羊水病原菌培养以大肠埃希菌为主(37%左右),检出率与本省桂平市研究报道相似(38.5%)^[9],但小于重庆地区(59.7%)及国外以色列地区检出率(52%)^[8-13],原因可能是不同地区宫腔感染病原菌分布存在差异。虽然胎膜早破组检出大肠埃希菌的阳性率与正常胎膜破裂组差异无统计学意义($P<0.05$)。但2组大肠埃希菌耐药特性不同,本研究结果显示胎膜早破组检出的大肠埃希菌对氨苄西林、复方新诺明、环丙沙星及头孢类抗生素耐药率均比正常胎膜破裂组高($P<0.05$)。所以在经验性治疗胎膜早破患者大肠埃希菌感染时,应避免使用上述抗生素,可选择 β -内酰胺类抗生素联合舒巴坦或他唑巴坦等酶抑制剂或使用碳青霉烯类抗生素进行治疗。针对产程开始后胎膜破裂宫内感染患者,由于喹诺酮类药物可影响软骨发育,所以孕妇应慎用;另外,氨基糖苷类能透过胎盘,进入胎儿体内,可能引起新生儿的听觉受损或产生肾毒性,所以临床医生应综合药敏结果和药物毒副作用合理用药。此外,胎膜早破组羊水多重耐药产ESBLs大肠埃希菌的检出率远远高于正常胎膜破裂组(56.10% vs. 18.07%, $P<0.001$),可能与胎膜早破患者在胎膜破裂时长时间使用抗生素预防感染有关,BLAZQUEZ等^[14]研究也得出抗生素使用会增加耐药菌株突变率的结论。

正常胎膜破裂组患者羊水念珠菌(主要是白念珠菌)检出率高于胎膜早破组(14.60% vs. 2.73%, $P<0.001$)。所以临床医生在防止胎膜早破患者感染而预防性用药时可避免选择抗真菌药物,应在羊水培养确诊念珠菌感染时靶向用药。由于本实验室未对羊水标本常规进行厌氧培养,所以本研究中羊水培养厌氧菌检出率(2.08%)较低,远低于早期研究得出的羊水致病菌中厌氧菌占半数以上的结论^[15]。对于羊水需氧菌培养阴性,但孕产妇或新生儿有临床症状并且羊水标本涂片革兰染色镜检发现菌体时,应加做羊水厌氧培养找出致病菌,以免漏诊。

综上所述,正常胎膜破裂组患者羊水培养出的念珠菌较胎膜早破组多,且正常胎膜破裂组无乳链球菌对四环素耐药率较胎膜早破组高。但胎膜早破组检出耐药(特别是产ESBLs)大肠埃希菌较正常胎膜破裂组多。本地区临床医生可参考本实验研究结果对胎膜早破和产程开始后胎膜破裂宫腔感染患者进行诊治。

参考文献

- [1] 乐杰,谢幸,林仲秋,等. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] ASSEFA N E, BERHE H, GIRMA F, et al. Risk factors of premature rupture of membranes in public hospitals at Mekele city, Tigray, a case control study[J]. BMC Pregnancy Childb, 2018, 18(1):386.
- [3] PERGIALIOTIS V, BELLOS I, FANAKI M, et al. The impact of residual oligohydramnios following preterm premature rupture of membranes on adverse pregnancy outcomes: a meta-analysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 222(6):628-630.
- [4] 王海霞. 胎膜早破的临床特点与母婴结局及影响因素分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(92):195-196.
- [5] 朱小红. 胎膜早破的临床特点与母婴结局及影响因素分析[J/CD]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2019, 6(28):1-2.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S28 Performance standards for antimicrobial susceptibility test[EB/OL]. [2021-06-23]. www. clsi. org.
- [7] 张文静. 高龄经产妇产年龄分层后的妊娠特点及结局分析[D]. 天津:天津医科大学, 2019.
- [8] 杨晓燕,周玮. 胎膜早破产妇胎膜细菌培养及药敏结果分析[J]. 实用妇产科杂志, 2018, 34(3):223-227.
- [9] 黎日海,刘建瑜,吴甲文. 羊水细菌培养结果及药敏试验结果分析[J]. 医药前沿, 2016, 6(8):62-64.
- [10] SEALE A C, BIANCHI-JASSIR F, RUSSELL N J, et al. Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(suppl 2):S200-S219.
- [11] BURCHAM L R, SPENCER B L, KEELER L R, et al. Determinants of Group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women[J]. PLoS ONE, 2019, 14(12):e0226699
- [12] VERANI J R, MCGEE L, SCHRAG S J, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010 [J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10):1-36.
- [13] WOLF M F, MIRON D, PELEG D, et al. Reconsidering the current preterm premature rupture of membranes antibiotic prophylactic protocol[J]. Am J Perinatol, 2015, 32(13):1247-1250.
- [14] BLÁZQUEZ J, COUCE A, RODRÍGUEZ-BELTRÁN J, et al. Antimicrobials as promoters of genetic variation [J]. Curr Opin Microbiol, 2012, 15(5):561-569.
- [15] 孙祥熙,陶蕴芬,王瑞. 胎膜破裂前后羊水及脐血厌氧菌培养 68 例分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1996, 12(5):27-28.
- (收稿日期:2021-11-10 修回日期:2021-12-22)
- (上接第 1146 页)
- [15] WANG Z, XU L L, WU Y B, et al. Diagnostic value and safety of medical thoracoscopy in tuberculous pleural effusion [J]. Respir Med, 2015, 109:1188-1192.
- [16] THOMAS M, IBRAHIM W H, RAZA T, et al. Medical thoracoscopy for exudative pleural effusion: an eighty year experience from a country with a young population [J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1):151.
- [17] WU Y B, XU L L, WANG X J, et al. Diagnostic value of medical thoracoscopy in malignant pleural effusion [J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1):109.
- [18] RAHMAN N M, ALI N J, BROWN G, et al. British thoracic society pleural disease guideline group. local anaesthetic thoracoscopy: british thoracic society pleural disease guideline 2010 [J]. Thorax, 2010, 65:54-60.
- (收稿日期:2021-11-11 修回日期:2021-12-19)

父母陪伴麻醉诱导对患儿围术期躁动发生率的影响*

侯东尧,魏会霞[△]

(湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院麻醉科 442000)

[摘要] **目的** 观察父母陪伴麻醉诱导(PPIA)在降低患儿围术期躁动的有效性及安全性。**方法** 选择于2020年5月1日至9月1日在该院中心手术室全身麻醉下择期行扁桃腺体切除术患儿60例,美国麻醉医师协会(ASA)分级Ⅰ~Ⅱ级,随机分为父母陪伴组和非父母陪伴组,每组30例。父母陪伴组由父母陪伴患儿进入麻醉诱导间,在患儿静脉滴注得普利麻麻醉入睡后离开。非父母陪伴组由父母陪伴患儿在手术室等候区,患儿由巡回护士带领进入麻醉诱导间。观察并记录患儿麻醉前及拔管后躁动发生率、手术时间、拔管时间、家长满意率及拔管后不良事件的发生率(呼吸道梗阻、呼吸抑制、喉痉挛)。**结果** 2组患儿均顺利完成手术,2组患儿年龄、体重、手术时间及拔管时间差异均无统计学意义($P>0.05$);父母陪伴组患儿手术前、后躁动发生率均低于非父母陪伴组,差异有统计学意义($P<0.05$);父母陪伴组患儿家长满意率高于非父母陪伴组,差异有统计学意义($P<0.05$);2组患儿不良事件发生率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PPIA可降低患儿围术期躁动发生率,提高父母满意率,未见明显不良反应,临床值得推广。

[关键词] 麻醉;儿童;父母陪伴;诱导;躁动**[中图分类号]** R473.72**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1152-04

Effect of parental companionship at the induction of anesthesia on the incidence of perioperative agitation in children*

HOU Dongyao, WEI Huixia[△]

(Department of Anesthesiology, Shiyan Taihe Hospital/Affiliate Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the efficacy and safety of parental presence at the induction of anesthesia (PPIA) in reducing the incidence of perioperative agitation in children. **Methods** A total of 60 children with tonsillectomy and adenoidectomy were selected from May 1 to September 1, 2020 under general anesthesia in the central operating room of this hospital, with the American Society of Anesthesiologists (ASA) classification, was grade I to II. They were randomly divided into the parental accompaniment group and the non-parental accompaniment group, with 30 cases in each group. In the parent-chaperoned group, the parents accompanied the child to the induction room and left after the child was put to sleep with diprivan anesthesia. In the non-parental group, the parents accompanied the child in the waiting area of the operating room and the children were led into the induction room by the visiting nurse. The incidence of agitation before anesthesia and after extubation, the operation time, the time of extubation, parental satisfaction and the incidence of adverse events (airway obstruction, respiratory depression, laryngospasm) after extubation were observed and recorded. **Results** Surgery was successfully completed in both groups, and there was no statistically significant difference in age, weight, operation time and extubation time between the two groups ($P>0.05$). The incidence of agitation before and after surgery was lower in the parental accompaniment group than that in the non-parental accompaniment group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The parental satisfaction rate of children in the parental accompaniment group was higher than that in the non-parental accompaniment group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the incidence of adverse events between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** PPIA

* 基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划指导性项目(B2020109)。 作者简介:侯东尧(1991-),主治医师,在读硕士研究生,主要从事小儿临床麻醉研究。[△] 通信作者, E-mail: weihuixia00@163.com。

can reduce the incidence of perioperative agitation in children, improve the rate of parental satisfaction, no significant adverse effects were observed, and can be safely used in clinical practice.

[Key words] anesthesia; child; parental accompaniment; induction; restlessness

扁桃体及腺样体切除术是小儿常见手术,由于患儿认知功能及心智发育尚未成熟,较易对陌生事物及环境产生排斥心理,与父母分离独自到手术室会增加患儿的焦虑情绪,患儿常常哭闹,甚至出现攻击、逃跑行为,尤其在麻醉诱导期及苏醒期较为突出,不仅影响患儿家长满意度而且增加围术期风险。有研究认为,患儿焦虑的情绪还会延长苏醒期时间,增加苏醒期躁动发生率^[1-2]。如何改善全身麻醉手术患儿麻醉诱导前心理状态,提高麻醉诱导配合度,降低围术期苏醒期躁动发生率,改善患儿麻醉苏醒精神状态,是当前临床急需解决的问题。本研究通过观察父母陪伴麻醉诱导(parental presence at the induction of anesthesia, PPIA)在降低患儿围术期躁动的有效性及安全性,为临床应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择于 2020 年 5 月 1 日至 9 月 1 日在本院中心手术室择期行全身麻醉下扁桃体及腺样体切除术患儿 60 例,年龄 3~6 岁,性别不限,美国麻醉医师协会(ASA)分级 I~II 级。排除体重超出标准体重±20%、困难气道、近 2 周出现扁桃体及咽喉部发炎、合并严重心肺等重要器官疾病患儿。使用电脑产生随机数字,按照随机数字表法将患儿分为父母陪伴组和非父母陪伴组,每组 30 例。本研究获得本院伦理委员会批准,并取得患儿家属同意,签署知情同意书。

1.2 方法

所有患儿术前,按照本科室小儿禁食水要求,禁食 6 h、禁饮 2 h,术前均不使用术前药物,在病房建立静脉通道。父母陪伴组由父母陪伴患儿进入麻醉诱导间,静脉给予 2%得普利麻(含 0.2%利多卡因)2.5 mg/kg。患儿入睡后,放到转运床上,父母离开麻醉诱导间。非父母陪伴组由父母陪伴患儿在手术室等候区,由巡回护士带领进入麻醉诱导间,静脉给予 2%得普利麻(含 0.2%利多卡因)2.5 mg/kg。患儿入睡后,放到转运床上。之后 2 组患儿建立监护,转运至手术室,给予地塞米松 0.2 mg/kg,阿托品 0.01 mg/kg,芬太尼 5 μg/kg,顺式阿曲库铵 0.15 mg/kg。给予吸入 6 L/min 50%氧气人工辅助呼吸,3 min 后行气管内插管。监测血压(BP)、心率(HR)、心电图(ECG)、血氧饱和度(SpO₂)、呼吸末二氧化碳分压(ETCO₂)、呼吸末七氟醚浓度(ETSev),保持手术室温度 24~26 ℃。并以 6 mL·kg⁻¹·h⁻¹ 滴注乳酸林

格氏液。麻醉维持采取七氟醚 2.5%~3.5%吸入,静脉持续泵入得普利麻 6 mg·kg⁻¹·h⁻¹,根据血流动力学变化调整七氟醚的吸入浓度(术中每隔 10 min 记录七氟醚呼气末浓度,取均数作为术中维持浓度)。手术结束前 10 min 停止泵入得普利麻,手术结束后停止吸入七氟醚,符合拔管条件后拔出气管导管送复苏室观察 30 min,无不良反应送回病房。

1.3 异常情况处理

手术期间各组患儿若出现体动,则暂停手术增加吸入七氟醚的浓度。若心率低于相应年龄的最低值,则给予阿托品 0.01 mg/kg 静脉注射。若出现呼吸道梗阻,托起患儿下颌,若不缓解放置口咽通气道。若出现呼吸抑制,则予球囊辅助呼吸(处理标准:呼吸频率小于 12 次/分钟、SpO₂<95%)。若出现喉痉挛,按喉痉挛的标准常规处理。

1.4 观察指标

观察并记录患儿麻醉前及气管拔管后躁动发生率、手术时间、拔管时间、家长满意率及不良事件发生率(呼吸道梗阻、呼吸抑制、喉痉挛)。躁动按照患儿配合程度分级。0 级:与医护人员配合良好,无任何异常反应;I 级:在有刺激时身体有异动;II 级:无刺激时也有异动,但异动比较轻微;III 级:身体动作幅度较大,需要医护人员的干扰才能保持镇静。当出现 II 级和 III 级的情况时,就可以被认为发生躁动。

1.5 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以百分率(%)表示。计量资料比较采用两独立样本 *t* 检验,皮尔森卡方检验及连续性校正卡方检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患儿一般临床资料比较

2 组患儿年龄、体重、手术时间及拔管时间差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 2 组患儿一般临床资料比较($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	体重 (kg)	手术时间 (min)	拔管时间 (min)
陪伴组	30	4.57±1.71	19.07±2.15	48.65±2.02	13.06±2.21
非陪伴组	30	4.12±2.80	18.37±1.32	49.12±1.21	12.67±2.13
<i>t</i>		1.24	1.65	1.31	1.54
<i>P</i>		0.28	0.17	0.20	0.19

2.2 手术前、后躁动发生率、家长满意率及不良事件发生率比较

父母陪伴组患儿手术前、后躁动发生率均低于非父母陪伴组患儿,差异有统计学意义($P < 0.05$);父母陪伴组患儿家长满意率高于非父母陪伴组,差异有统计学意义($P < 0.05$);2 组患儿不良事件发生率(呼吸道梗阻、呼吸抑制、喉痉挛)差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组患儿手术前后躁动发生率、家长满意率及不良事件的发生率比较[n(%)]

组别	n	术前躁动	术后躁动	家长满意	不良事件
陪伴组	30	3(10.0) ^a	4(13.3) ^a	28(93.3) ^a	2(6.7)
非陪伴组	30	19(63.3)	12(25.0)	6(20.0)	1(3.3)
χ^2 /Fisher		17.37	5.46	32.85	0.00
P		<0.01	0.02	<0.01	1.00

3 讨 论

由于年幼,手术本身并不能引起患儿心理焦虑。患儿围术期的焦虑大部分来自于与父母的分离。有报道称术前焦虑与围术期躁动呈正相关^[1-2]。围术期躁动主要表现为患儿不配合医务人员,具体表现为:固执、情绪波动大(哭闹)、拔掉插在身上的管子(如输液管等)、逃跑甚至攻击行为。患儿在哭闹挣扎过程中可能造成意外坠床、手术切口出血等意外伤害情况,会降低患儿家长满意率,影响整个手术的效果,也会给患儿留下心理阴影。对于如何减低患儿术前焦虑,减少围术期躁动,目前在我国主要是通过术前口服咪达唑仑干预,但咪达唑仑往往带来很多不良反应,如呼吸抑制、嗜睡、兴奋、躁动不安、恶心呕吐^[3-4]。在欧美国家,由父母陪伴进入手术室已成为减少患儿术前焦虑的常规方法^[5-7]。PPIA 是指在诱导期由父母陪伴,从而缓解患儿麻醉诱导期焦虑及不安的情绪,提高患儿麻醉诱导期的依从性和安全性而采取的医疗干预措施^[8-10]。在我国由于医疗环境及场地的限制,目前并未开展 PPIA,本研究观察 PPIA 在降低患儿围术期躁动发生率的有效性及其安全性。结果 2 组患儿均顺利完成手术,2 组患儿年龄、体重、手术时间及拔管时间差异无统计学意义($P > 0.05$)。2 组患儿麻醉过程标准一致,考虑到得普利麻的注射痛给患儿留下不良刺激,所以本院给患儿的得普利麻均加入利多卡因,使得诱导更加平稳安全^[11-13]。吸入麻醉药七氟醚不但具备较好的肌肉松弛与镇痛功能,且麻醉诱导与苏醒速度快,呼吸道刺激性小,能在短时间内达到预期的麻醉效果,是小儿麻醉经济实惠的选择^[14-16]。父母陪伴组患儿手术前、后躁动发生率均低于非父母陪伴组,差异有统计学意义($P < 0.05$),这与

KRUGER 等^[17]、HUSSAIN 等^[18]、MOSELEY 等^[19]研究一致。SADEGHI 等^[20]研究认为焦虑的父母陪伴患儿,并不能降低患儿的焦虑程度,本研究并未分析患儿父母的焦虑程度。父母陪伴组患儿家长满意率高于非父母陪伴组,差异有统计学意义($P < 0.05$),在父母陪伴过程中父母对麻醉诱导流程满意,并未出现挑剔不合作等事件。2 组患儿不良事件的发生率(呼吸道梗阻、呼吸抑制、喉痉挛)较低,这可能与本试验患儿均由高年资医生完成麻醉有关;也有可能与本研究纳入的样本量有关。

综上所述,PPIA 可降低患儿围术期躁动发生率,可提高家长满意率,未见明显不良事件,临床可安全使用。

参考文献

- [1] 聂冰清,许强,武庆平. 小儿术前焦虑水平与七氟烷麻醉苏醒期躁动的相关性研究[J]. 华中科技大学学报(医学版),2017,46(2):201-204.
- [2] 蒋丽蓉. 苏醒期父母语音播放结合陪伴模式对全麻手术患儿苏醒质量的影响[J]. 当代护士(中旬刊),2021,28(2):74-76.
- [3] DU Z,ZHANG X Y,QU S Q,et al. The comparison of dexmedetomidine and midazolam premedication on postoperative anxiety in children for hernia repair surgery: a randomized controlled trial[J]. Paediatr Anaesth,2019,29(8):843-849.
- [4] GHAI B,JAIN K,SAXENA A K,et al. Comparison of oral midazolam with intranasal dexmedetomidine premedication for children undergoing CT imaging: a randomized, double-blind, and controlled study[J]. Paediatr Anaesth,2017,27(1):37-44.
- [5] YOUSEF Y,DRUDI S,SANT'ANNA A M,et al. Parental presence at induction of anesthesia: perceptions of a pediatric surgical department before and after program implementation[J]. J Pediatr Surg,2018,53(8):1606-1610.
- [6] KIM H,JUNG S M,YU H,et al. Video Distraction and parental presence for the management of preoperative anxiety and postoperative behavioral disturbance in children: a randomized controlled trial[J]. Anesth Analg,2015,121(3):778-784.
- [7] SHAFER J S,JENKINS B N,FORTIER M A,

- et al. Parental satisfaction of child's perioperative care[J]. *Paediatr Anaesth*, 2018, 28(11): 955-962.
- [8] OZDOGAN H K, CETINALP S, KURAN G, et al. The effects of maternal presence during anesthesia induction on salivary cortisol levels in children undergoing tonsillectomy and/or adenoidectomy[J]. *J Clin Anesth*, 2017, 39(1): 64-66.
- [9] SMITH J. Parental presence during induction of anaesthesia: an evidence based practice review [J]. *Aust Nurs Midwifery J*, 2017, 24(10): 40.
- [10] WASEEM H, MAZZAMURRO R S, FISHER A H, et al. Parental satisfaction with being present in the operating room during the induction of anesthesia prior to pediatric neurosurgical intervention: a qualitative analysis [J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2018, 21(5): 528-534.
- [11] EUASOBHON P, DEJ-ARKOM S, SIRIUS-SAWAKUL A, et al. Lidocaine for reducing propofol-induced pain on induction of anaesthesia in adults [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 2(2): CD007874.
- [12] TASARGOL O. A prospective study on the predictability of propofol injection pain [J]. *Cureus*, 2020, 12(2): e6945.
- [13] WANG J, DUAN J, XIE C, et al. Comparison between intravenous nalbuphine and lidocaine in reducing propofol-induced injection pain during gastroscopy: a randomized controlled trial [J]. *Pain Ther*, 2020, 9(2): 563-571.
- [14] 康定鑫, 饶裕泉, 姬斌, 等. 七氟烷和地氟烷对患儿术中罗库溴铵药效动力学的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(6): 429-433.
- [15] COSTI D, CYNA A M, AHMED S, et al. Effects of sevoflurane versus other general anaesthesia on emergence agitation in children [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014 12(9): CD007084.
- [16] SHI M, MIAO S, GU T, et al. Dexmedetomidine for the prevention of emergence delirium and postoperative behavioral changes in pediatric patients with sevoflurane anesthesia: a double-blind, randomized trial [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 15(13): 897-905.
- [17] KRUGER P, ROSEN D. Parental presence at induction of anesthesia is feasible with minimal preparation and resources [J]. *Can J Anaesth*, 2016, 63(10): 1207-1208.
- [18] HUSSAIN A, KHAN F A. Effect of two techniques of parental interaction on children's anxiety at induction of general anaesthesia—a randomized trial [J]. *Turk J Anaesthesiol Reanim*, 2018, 46(4): 305-310.
- [19] MOSELEY S L, HEINE C, VALENTE T, et al. Effects of parental presence during induction of anesthesia on operative and perioperative times in pediatric patients undergoing adenotonsillectomy [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2021, 140(1): 110515.
- [20] SADEGHI A, KHALEGHNEJAD TABARI A, MAHDAVI A, et al. Impact of parental presence during induction of anesthesia on anxiety level among pediatric patients and their parents: a randomized clinical trial [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 12(2): 3237-3241.

(收稿日期: 2021-11-22 修回日期: 2022-01-28)

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.015

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1839.022.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1839.022.html(2021-12-15))

基于“自立支援”理念的养老机构认知功能障碍老年人 经口饮食照护方案构建及应用*

陈秋¹, 沈军², 喻秀丽³, 童立纺³, 王欣霞¹, 刘玥¹, 张虹¹(1. 重庆医科大学护理学院 400016; 2. 重庆护理职业学院院办 402763; 3. 重庆医科大学
附属第一医院青杠老年护养中心 402761)

[摘要] **目的** 基于“自立支援”理念构建养老机构认知功能障碍老年人经口饮食照护方案并评价其效果。**方法** 选取 2020 年 3—9 月入住某养老机构的 100 例轻中度认知功能障碍老年人为研究对象并随机分为观察组 49 例, 对照组 51 例。对照组实施常规饮食照护措施, 观察组实施基于“自立支援”理念的养老机构认知功能障碍老年人经口饮食照护方案。比较 2 组干预前、干预后 6 个月各简易营养评估(MNA-SF)量表得分、营养指标及进食行为量表(EBS)得分差异。**结果** 干预过程中观察组脱落 3 例, 对照组脱落 1 例, 最终观察组纳入 46 例, 对照组纳入 50 例。干预前 2 组患者一般资料、营养状况指标、EBS 得分比较差异均无统计学意义($P > 0.05$); 干预 6 个月后, 观察组 MNA-SF 量表得分(10.88 ± 1.67)分, 对照组(10.06 ± 2.09)分, 观察组 EBS 得分(8.50 ± 3.54)分, 对照组(10.94 ± 3.70)分, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 2 组血红蛋白、清蛋白指标比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 实施基于“自立支援”理念的经口饮食照护方案对改善养老机构认知功能障碍老年人的营养状况及自主进食能力具有一定积极意义。

[关键词] 自立支援; 老年人; 认知障碍; 养老机构; 饮食照护**[中图分类号]** R473.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1156-05

Construction and application of oral diet care program for the elderly with cognitive impairment in elderly care institutions based on the concept of “self-supporting”*

CHEN Qiu¹, SHEN Jun², YU Xiuli³, TONG Lifang³, WANG Xinxia¹, LIU Yue¹, ZHANG Hong¹

(1. College of Nursing, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Dean's Office Chongqing Vocational College of Nursing, Chongqing 402763, China; 3. Qinggang Senior Care Center, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402761, China)

[Abstract] **Objective** To construct an oral diet care program based on the concept of “self-supporting” for the elderly with cognitive impairment in nursing homes and evaluate its effects. **Methods** A total of 100 elderly with mild to moderate cognitive impairment who were admitted to the nursing home from March to September 2020 were selected as the research objects, and were randomly divided into the observation group (49 cases) and the control group with 51 cases. The control group implemented routine dietary care measures, and the observation group implemented an oral diet care program for cognitively impaired elderly people in nursing homes based on the concept of “self-supporting”. The differences of the Simplified Nutrition Assessment (MNA-SF) scale scores, nutritional indicators and eating behavior scale (EBS) scores before and six months after the intervention were compared between the two groups. **Results** During the intervention, three cases in the observation group and one case in the control group withdrew, 46 cases in the observation group and 50 cases in the control group were finally included. Before the intervention there were no significant difference in the general information, nutritional status indicators, and EBS scores between the two groups of patients ($P > 0.05$); after the intervention for six months, the score of MNA-SF scale in the observation group was (10.88 ± 1.67) points, and (10.06 ± 2.09) points in the control group, EBS scores in the observation group was (8.50 ± 3.54) points, and (10.94 ± 3.70) points in the control group, the differences were statistically

* 基金项目: 2019 年重庆市科委面上项目(cstc2019jcsx-msxmX0259); 2019 年护理学重点学科建设项目(2019hlxk08)。 作者简介:

陈秋(1997—), 初级, 硕士在读, 主要从事老年护理研究。 △ 通信作者, E-mail: 793096729@qq.com。

significant ($P < 0.05$); Comparison of hemoglobin and albumin indexes between the two groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The implementation of an oral diet care program based on the concept of “self-supporting” has a certain positive significance for improving the nutritional status and autonomous eating ability of cognitively impaired elderly in nursing homes.

[Key words] self-supporting; elderly; cognitive impairment; elderly nursing homes; diet care

老年人认知功能障碍指由正常认知老化等各种因素导致的认知功能损伤性下降^[1],在不同认知损害阶段可出现食欲减退、吞咽功能损伤、拒食等进食相关问题,导致长期的进食依赖^[2]。我国养老机构中老年人认知功能障碍患病率较高^[3],且许多养老机构存在饮食照护单一、不合理,膳食不均衡及营养不良现象,严重影响老年人的健康及生活质量^[4]。研究显示^[5],管饲虽可作为预防体重减轻和营养不良的选择之一,但经口进食可提高安全性和有效性,有利于维持并促进自理能力,改善生活质量。“自立支援”理念则提出将饮食作为基础护理之一,鼓励老年人自主自立,避免过度照护,提升自理能力的同时减轻照护负担^[6]。因此,本研究基于“自立支援”照护理念,构建养老机构认知障碍老年人经口饮食照护方案,以期改善其营养不良状况,提升进食能力,维持并促进日常生活功能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用便利抽样法于2020年3—9月选取重庆市某养老机构认知功能障碍老年人作为研究对象。纳入标准:(1)年龄大于或等于60岁;(2)入住时间大于或等于6个月;(3)简易精神状态评价量表(mini-mental state examination, MMSE)评定为轻中度认知功能受损;(4)意识清楚,老年人或家属知情同意。排除标准:(1)正接受肠管喂养或肠外营养不能经口进食者;(2)需强化和/或补充治疗性饮食者;(3)合并重大疾病,处于临终期者;(4)不能配合干预试验者。为避免同楼层沾染,以楼层为单位抽签,每2层楼作为1组样本池,按纳入排除标准选择研究对象。

1.2 方法

1.2.1 饮食照护方案的构建

首先,检索国内外数据库 Web of Science、PubMed、Medline、中国知网、中国生物医学文献服务系统、万方数据库、维普,对相关的实践指南、系统评价与随机对照试验进行文献回顾、整理与分析,为方案构建提供依据。其次,由2名老年临床护理专家、1名营养师、1名康复师及2名研究生组成研究讨论小组,构建基于“自立支援”理念^[6]的养老机构认知功能障碍老年人经口饮食照护方案,详见图1。最后,根据形成的饮食照护方案拟定专家函询条目池,编制函询表,遴选专家函询组成员并进行2轮函询对方案进行细化和填补,最终纳入一级指标(照护时段)3个,二级指标(照护方面)10个,三级指标(照护要点)27个。

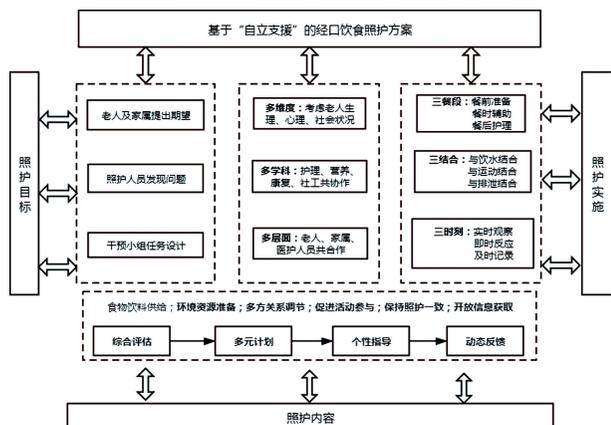


图1 养老机构认知功能障碍老年人经口饮食照护方案图解

1.2.2 饮食照护措施的实施

1.2.2.1 对照组饮食照护

对照组采取原饮食照护措施,餐前护理员准备餐具及食物并集中老年人在餐厅就餐,用餐时为进食困难老年人改变食物性状或(和)手动喂养,餐后收拾餐盘并协助老年人返回房间。

1.2.2.2 观察组饮食照护

(1)综合评估,注重营养管理。成立干预小组,在干预前、后及身心状况变化时对老年人认知功能、营养、日常生活能力、心理状况等方面进行综合评估,为存在或面临营养不良风险老年人建立个人营养管理档案。(2)多元结合,细化餐前准备。首先,护理员对餐厅环境进行清洁消毒,整理餐桌用品,营造愉快、家庭般的用餐氛围。其次,集中并带领老年人在大厅进行餐前活动,持续时间保持在30 min左右;坚持“排泄优先”原则,协助老年人餐前排空胃肠道及膀胱;建立良好饮食卫生习惯,发放餐前洗手巾,监督老年人做好餐前手卫生;集中进行餐前护理操作,避免与进食活动重叠。此外,查看老年人饮食营养管理记录,悉知老年人咀嚼、吞咽等进食状况,为餐时辅助做预备计划。(3)个性化指导,支持自立支援。固定就餐时间及地点,协助并鼓励老年人就桌、就椅共同用餐,根据桌椅高度、老年人舒适感调整进食姿势;秉持“生活即康复”理念,根据吞咽、咀嚼功能,对食物性状进行调整,尊重老年人饮食习惯,协助其自立完成进食,尽量减少手动喂养。(4)动态反馈,完善餐后护理。评估并记录饮食摄入量,指导老年人进行口腔清洁及护理;注重心理护理,采用开放式提问获悉进食感受,获得反馈的同时刺激老年人认知功能及语言表达能力。(5)增添乐趣,促进经口进食。取消特殊饮食限制,根据老年人个人喜好及《老年人膳食指导》2017年

版推荐的能量及营养素摄入,丰富饮食种类,将进食日常生活化,通过督促老年人餐后自主饮水,参与食物有关的活动(烘焙、逛超市等)来激发食欲。此外,创造更多的进食机会,例如开展“品尝日”主题活动,庆祝传统节日及其他娱乐事件(配有茶点的电影观看、作品赏析等)。(6)多方配合,实施整合性照护。从照护目标出发,鼓励机构团队、家属与老年人相互合作,共同拟定照护计划,以求家属支持该饮食照护模式的开展。与此同时,联合康复师、社工及照护人员鼓励老年人进行手部作业治疗康复活动,以期维持并促进其进食能力。(7)强化理念,翻转固有模式。每周为老年人安排照护理念和饮食营养知识、技能培训,培训方式包括知识讲座、情景模拟、小组讨论等。为保证培训的有效性和参训积极性,每周在不同时段开展 2 次同样的培训课程,每次持续时间控制在 1 h 内,被照护老年人可自由选择培训时间。

1.3 评价工具

1.3.1 一般资料调查表

该调查表由课题组自行设计,主要包括年龄、性别、婚姻状况、文化程度、入住时间、认知功能、患病及用药种数等内容。

1.3.2 简易营养评估(short-form mini-nutritional assessment, MNA-SF)量表

MNA-SF 量表具有良好的灵敏度、特异度^[7-8],包括 6 个条目: BMI 或小腿围、是否存在急性的疾病或处于应激状态、活动能力、近期体重变化情况、近期进食情况及精神情况。评分标准^[9]: 总分 14 分, 12~14 分为营养状况正常, 8~11 分为有营养不良风险, 0~7 分为营养不良。

1.3.3 营养状况指标

早晨空腹状态下采用机械身高秤测量 BMI; 根据文献^[10-11], 将血红蛋白(Hb)、清蛋白(ALB) 2 项作为生化指标纳入统计分析。

1.3.4 进食行为量表(eating behaviours scale, EBS)

该量表由 TULLY 等^[12]于 1997 年研制,可用于测量经口进食老年人认知功能相关的进食能力。EBS 涵盖了进食行为的 6 个方面: 开始进食(条目 1), 定位食物(条目 2), 维持进食时的注意力(条目 3), 正确地使用餐具(条目 4), 可以咀嚼吞咽食物而不发生呛咳(条目 5), 结束进食(条目 6)^[13]。该量表的 Cronbach/ α 系数为 0.842, 内容效度为 1.0, 具有良好的信效度^[14], 各条目回复等级“独立”“口头提示”“身体接触性的帮助”“依赖”, 依次计 1、2、3、4 分, 总分 24 分, 分数越高表示独自进食的能力越低。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件处理和分析数据, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 比较采用 t 检验; 计数资料以频数和百分率表示, 比较采用 χ^2 检验; 等级资料采用秩和检验; 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共纳入研究对象 100 例, 观察组 49 例, 对照组 51 例, 由于突发不良事件、探亲等原因, 分别脱落 3 例和 1 例, 最终有效资料为 96 例, 观察组 46 例, 对照组 50 例。研究结果显示, 2 组干预前性别比例、年龄、入住时间、MMSE 评分、文化程度、婚姻状况和患病及用药种数比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 2 组一般资料比较

组别	n	性别[n(%)]				年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	入住时间 ($\bar{x} \pm s$, 年)	MMSE 评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)						
		男	女											
观察组	46	15(32.6)	31(67.4)			86.39 \pm 5.57	2.63 \pm 1.61	20.11 \pm 4.40						
对照组	50	24(48)	26(52)			85.90 \pm 4.90	2.91 \pm 1.62	19.42 \pm 5.53						
$\chi^2/t/Z$		2.353				0.460	-0.848	0.678						
P		0.125				0.647	0.399	0.500						
组别	n	文化程度(n)				婚姻状况(n)			患病种数(n)			用药种数(n)		
		小学及以下	初中	高中/中专	大专及以上	已婚	丧偶	离异	1~3种	4~7种	\geq 8种	1~3种	4~7种	\geq 8种
观察组	46	15	6	16	9	18	27	1	7	33	6	8	28	10
对照组	50	12	13	16	9	25	23	2	8	33	9	11	31	8
$\chi^2/t/Z$		-0.088				-0.916			-0.364			-0.811		
P		0.930				0.360			0.716			0.417		

2.2 两组干预前、后各营养指标结果比较

干预前 2 组 Hb、ALB、BMI 水平, MNA-SF 量表得分差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与干预前比较, 观察组干预后 Hb、ALB 水平及 MNA-SF 量表得

分均提高, 但对照组略有降低, 2 组干预后比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 两组干预前、后 EBS 得分比较

干预前 2 组 EBS 条目 1、3、4、5、6 得分及总分比

较差异无统计学意义($P>0.05$),干预后对照组 EBS 条目 1~5 得分及总分均升高,观察组 EBS 各条目及

总分得分均降低,2 组 EBS 条目 2、4 得分及总分差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 2 组干预前、后各营养指标及 MNA-SF 量表评分结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Hb(g/L)		ALB(g/L)		BMI(kg/m ²)		MNA-SF(分)	
		干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
对照组	50	125.62±14.91	124.98±14.11	41.31±3.13	39.92±3.53	22.97±3.80	22.45±3.81	10.40±1.96	10.06±2.09
观察组	46	130.67±17.41	132.92±16.14	41.62±3.08	43.04±3.47	23.81±3.46	23.37±3.54	10.37±1.81	10.88±1.67
t		-1.552	-2.607	-0.503	-4.438	-1.142	-1.250	0.086	-2.147
P		0.124	0.011	0.616	<0.001	0.256	0.214	0.932	0.034

表 3 2 组干预前、后 EBS 得分比较($\bar{x}\pm s$,分)

项目	干预前				干预后			
	对照组	观察组	t	P	对照组	观察组	t	P
条目 1	1.39±0.61	1.27±0.63	-0.589	0.559	1.50±0.71	1.23±0.61	-1.308	0.199
条目 2	1.44±0.51	1.82±0.59	2.118	0.041	2.11±0.47	1.60±0.80	-2.564	0.015
条目 3	1.50±0.86	1.73±0.98	0.769	0.447	1.78±0.94	1.59±0.91	-0.636	0.528
条目 4	1.67±0.97	1.95±0.90	0.973	0.337	2.28±0.96	1.36±0.79	-3.310	0.002
条目 5	1.83±0.51	1.73±0.77	-0.501	0.619	1.83±0.62	1.45±0.60	-1.967	0.057
条目 6	1.44±0.92	1.45±0.86	0.036	0.972	1.44±0.86	1.18±0.50	-1.151	0.260
总分	9.28±3.39	9.95±3.80	0.588	0.560	10.94±3.70	8.50±3.54	-2.128	0.040

3 讨 论

3.1 “自立支援”理念下经口饮食照护方案对改善轻度认知功能障碍老年人营养状况具有一定积极意义

营养不良是老年人群中的普遍问题^[15],关乎其身心健康和生活福祉,养老机构中老年人由于衰老及认知功能受损,营养不良情况更加严重^[16],而研究表明^[17],一定的饮食干预措施可有效改善认知障碍老年人的营养状况及生活质量。本研究基于“自立支援”理念,从现存饮食照护难点及需求出发,综合多方意见,基于原饮食照护措施进行细化和完善,对照护各层面、维度及学科进行整合,形成结构化饮食照护方案。该方案包含了综合评估、多元计划、个性指导、动态反馈 4 大模块,并为存在或面临营养不良老年人建立营养管理档案,可及时有效发现问题并作出科学干预。此外,老年人接受系统化知识技能培训,在提高饮食照护意识及技能的同时也提供更多的用餐机会,刺激老年人进食欲望,改善其营养状况。研究结果显示,2 组老年人干预后 Hb、ALB 及 MNA-SF 量表得分差异有统计学意义($P<0.05$),但 BMI 比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示该饮食照护模式对养老机构认知功能障碍老年人的营养状况上具有一定程度的积极意义,与之前类似研究结果一致^[18-19]。此外,BMI 比较无统计学差异,究其原因,可能在于该研究机构为医养结合型养老机构,照护质量较高,注重老年人饮食及营养护理,老年人 BMI 基线情况较好,其次由于老年人身体机能代谢下降,体重与身高在较

短时间内虽有变化但不够明显。

3.2 “自立支援”理念下经口饮食照护可提升轻度认知功能障碍老年人的自主进食能力

认知障碍会逐渐剥夺老年人完成日常生活能力,易产生进食依赖,而独立进食能力作为较迟受损的日常生活能力,科学及时地干预为其尽可能维持或优化提供了更大的可能性^[20]。研究表明,尊重老年人选择和偏好,支持其独立性,鼓励并促进社会互动,可有效提升其进食能力^[21]。本研究结果显示,2 组干预后 EBS 条目 2、4 得分及总评分差异有统计学意义($P<0.05$),表明该饮食照护方案可提升轻度认知功能障碍老年人的进食能力,对定位食物及正确地使用餐具效果改善显著。原因在于,(1)照护人员将“自立支援”理念贯穿饮食照护的始终,餐前护士集中进行护理操作,护理员评估餐前老年人状态并做好环境和餐具准备,避免了用餐时老年人被打扰的可能,努力确保他们在稳定、注意力集中的状态下进食;用餐时则鼓励共同就餐并自主进食,实时观察老年人进食依从性、吞咽及咀嚼状况,以防止发生呛噎或误吸等事故发生,并在必要时提供适当的协助,最大限度促使其发挥进食独立性;餐后则指导老年人进行口腔及心理护理,对老年人饮食行为进行评估和记录,给予建议并进行正确指导,提高舒适感的同时有利于老年人树立独立进食、重建生活能力的信心。(2)跨学科协作,康复师通过专业评估,判断老年人所需的协助程度和方面,制订并实施个体化、针对性训练,一定程度上增加了活动水平和能量消耗,促进了进食行为能力锻炼。

本研究基于“自立支援”理念,构建养老机构认知

功能障碍老年人经口饮食照护方案,探讨其应用效果。研究结果证实该经口饮食照护方案可改善轻度认知功能障碍老年人营养状况并提升其自主进食能力,具有科学性及可行性。但本研究存在一定的局限性:(1)本研究为单中心实验,干预时间较短,所纳入的病例数较少,代表性较弱;(2)本研究对象为轻度认知障碍老年人,对于重度认知障碍老年人是否有效,有待进一步研究验证。

参考文献

- [1] 胡健宗,廖健颖,王娟. 老年人认知功能障碍患病情况调查及影响因素分析[J]. 中国初级卫生保健,2020,34(6):44-46.
- [2] MANN K, LENGYEL C O, SLAUGHTER S E, et al. Resident and staff mealtime actions and energy intake of long-term care residents with cognitive impairment: analysis of the making the most of mealtimes study[J]. J Gerontol Nurs,2019,45(8):32-42.
- [3] 郑静,陈申,崔焱. 养老机构高龄老年人轻度认知障碍现状及其影响因素[J]. 护理研究,2019,33(13):2205-2208.
- [4] 张鑫,宋捷,于英慧,等. 养老院老年人膳食营养素摄入与营养不良[J]. 中国老年学杂志,2019,39(4):959-961.
- [5] PALECEK E J, TENO J M, CASARETT D J, et al. Comfort feeding only: a proposal to bring clarity to decision-making regarding difficulty with eating for persons with advanced dementia [J]. J Am Geriatr Soc,2010,58(3):580-584.
- [6] (日)竹内孝仁. 通过“喝水、排便、膳食、运动”改善认知症[M]. 高华彬,李建华,译. 北京:中国大百科全书出版社,2021.
- [7] 谈英,章萍,夏田,等. 简易营养评估精法在老年病人营养筛查中的应用及营养干预[J]. 护理研究,2019,33(6):1057-1059.
- [8] BASIBÜYÜK G Ö, AYREMLOU P, AEIDLOU S N S, et al. Evaluation of malnutrition among elderly people living in nursing homes by mini nutritional assessment short form (MNA-SF) in Turkey [J]. Maedica (Buchar),2019,14(1):38-44.
- [9] 吴晓娜,黄承钰,邓波. 应用微型营养评价精法评价老年住院病人的营养状况[J]. 肠外与肠内营养,2015,22(6):359-361.
- [10] CHEN L L, LI H, LIN R, et al. Effects of a feeding intervention in patients with Alzheimer's disease and dysphagia[J]. J Clin Nurs,2016,25(5/6):699-707.
- [11] ZANINI M, BAGNASCO A, CATANIA G, et al. A dedicated nutritional care program (NUTRICARE) to reduce malnutrition in institutionalised dysphagic older people: a quasi-experimental study[J]. J Clin Nurs,2017,26(23/24):4446-4455.
- [12] TULLY M W, MATRAKAS K L, MUIR J, et al. The Eating Behavior Scale. A simple method of assessing functional ability in patients with Alzheimer's disease[J]. J Gerontol Nurs,1997,23(7):9-15.
- [13] 龙露,严谨. 老年痴呆患者进食困难的评估及护理干预进展[J]. 护理学报,2017,24(17):25-29.
- [14] 马丽霞,陈颖,许梦雅,等. 简体中文版进食行为量表在老年痴呆患者中的信效度研究[J]. 实用医学杂志,2016,32(18):3099-3102.
- [15] BUNN D K, ABDELHAMID A, COPLEY M, et al. Effectiveness of interventions to indirectly support food and drink intake in people with dementia: eating and drinking well in dementia (EDWINA) systematic review [J]. BMC Geriatrics,2016,16:16-89.
- [16] HERKE M, FINK A, LANGER G, et al. Environmental and behavioural modifications for improving food and fluid intake in people with dementia [J]. Cochrane Database Syst Rev,2018,7(7):CD011542.
- [17] ABDELHAMID A, BUNN D, COPLEY M, et al. Effectiveness of interventions to directly support food and drink intake in people with dementia: systematic review and meta-analysis [J]. BMC Geriatr,2016,16:26.
- [18] CHEN L L, LI H, LIN R, et al. Effects of a feeding intervention in patients with Alzheimer's disease and dysphagia[J]. J Clin Nurs,2016,25(5/6):699-707.
- [19] 孔婵,孙丽凯,徐嘉琪,等. 老年肠内营养患者项目管理法的护理实践[J]. 护理学杂志,2019,34(5):86-89.
- [20] BATCHELOR-MURPHY M, KENNERLY S M, HORN S D, et al. Impact of cognition and handfeeding assistance on nutritional intake for nursing home residents [J]. J Nutr Gerontol Geriatr,2019,38(3):262-276.
- [21] REIMER H D, KELLER H H. Mealtimes in nursing homes: striving for person-centered care[J]. J Nutr Elder,2009,28(4):327-347.