



(OSID码)

· 论著 ·

# 膈肌呼出气一氧化氮浓度、一氧化氮合酶表达水平及炎症因子水平与食管病变并慢性阻塞性肺疾病患者膈肌活动度的相关性研究

王慧, 张鑫, 薛乾隆, 杨淼

**【摘要】** 背景 目前导致慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者膈肌活动度改变的分子机制尚不完全明确。目的 探讨膈肌呼出气一氧化氮(FeNO)浓度、一氧化氮合酶(NOS)表达水平及炎症因子水平与食管病变并COPD患者膈肌活动度的相关性。方法 选取2015年6月—2018年12月河北北方学院附属第一医院收治的食管病变并行开胸手术患者48例,根据术前是否合并COPD分为对照组(未合并COPD,  $n=26$ )和COPD组(合并COPD,  $n=22$ )。比较两组患者膈肌活动度、FeNO浓度、NOS〔包括诱导型NOS(iNOS)、内皮型NOS(eNOS)、神经型NOS(nNOS)〕mRNA及蛋白相对表达量、炎症因子〔包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素6(IL-6)、白介素8(IL-8)〕水平,膈肌FeNO浓度、NOS表达水平及炎症因子水平与食管病变并COPD患者膈肌活动度的相关性分析采用Pearson相关分析。结果 (1)COPD组患者膈肌活动度小于对照组,膈肌FeNO浓度高于对照组( $P<0.05$ )。(2)COPD组患者膈肌iNOS、eNOS mRNA及蛋白相对表达量高于对照组( $P<0.05$ );两组患者膈肌nNOS mRNA及蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(3)COPD组患者膈肌TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8水平高于对照组( $P<0.05$ )。(4)Pearson相关分析结果显示,膈肌FeNO浓度、iNOS mRNA相对表达量、eNOS mRNA相对表达量、iNOS蛋白相对表达量、eNOS蛋白相对表达量及膈肌TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8水平均与食管病变并COPD患者膈肌活动度呈负相关( $P<0.05$ )。结论 膈肌FeNO浓度、iNOS及eNOS表达水平、炎症因子水平升高与食管病变并COPD患者膈肌活动度下降有关。

**【关键词】** 慢性阻塞性肺疾病;食管病变;膈肌活动度;呼出气一氧化氮;一氧化氮合酶;炎症因子

**【中图分类号】** R 563.9 R 571 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.11.011

王慧, 张鑫, 薛乾隆, 等. 膈肌呼出气一氧化氮浓度、一氧化氮合酶表达水平及炎症因子水平与食管病变并慢性阻塞性肺疾病患者膈肌活动度的相关性研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(11): 49-54. [www.syxnf.net]

WANG H, ZHANG X, XUE Q L, et al. Correlations of FeNO concentration, expression of NOS and levels of inflammatory cytokines in diaphragm with diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27(11): 49-54.

**Correlations of FeNO Concentration, Expression of NOS and Levels of Inflammatory Cytokines in Diaphragm with Diaphragm Mobility in Esophageal Lesion Patients Complicated with COPD** WANG Hui, ZHANG Xin, XUE Qianlong, YANG Miao

Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Hebei North College, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: WANG Hui, E-mail: wangh011@163.com

**【Abstract】** **Background** The molecular mechanism of change of diaphragm mobility in patients with COPD is not yet clear. **Objective** To investigate the correlations of FeNO concentration, expression of NOS and levels of inflammatory cytokines in diaphragm with diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD. **Methods** A total of 48 esophageal lesion patients undergoing thoracotomy were selected in the First Affiliated Hospital of Hebei North College from June 2015 to December 2018, and they were divided into control group (did not merge with COPD,  $n=26$ ) and COPD group (merged with COPD,  $n=22$ ) according to the incidence of COPD before surgery. Diaphragm mobility, FeNO concentration, mRNA and protein relative expression quantity of NOS (including iNOS, eNOS, nNOS), as well as levels of inflammatory cytokines (including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8) in diaphragm were compared between the two groups; correlations

基金项目: 张家口市 2016 年度市级科技计划自筹经费项目 (1621120H)

075000 河北省张家口市, 河北北方学院附属第一医院急诊科

通信作者: 王慧, E-mail: wangh011@163.com

of FeNO concentration, expression of NOS and levels of inflammatory cytokines in diaphragm with diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD were analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** (1) Diaphragm mobility in COPD group was statistically significantly smaller than that in control group, while FeNO concentration in diaphragm in COPD group was statistically significantly higher than that in control group ( $P<0.05$ ). (2) mRNA and protein relative expression quantity of iNOS and eNOS in diaphragm in COPD group was statistically significantly higher than that in control group, respectively ( $P<0.05$ ), while no statistically significant difference of mRNA or protein relative expression quantity of nNOS was found between the two groups ( $P>0.05$ ). (3) Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in diaphragm in COPD group were statistically significantly higher than those in control group ( $P<0.05$ ). (4) Pearson correlation analysis results showed that, FeNO concentration, mRNA and protein relative expression quantity of iNOS, mRNA and protein relative expression quantity of eNOS as well as levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in diaphragm were negatively correlated with the diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Elevation of FeNO concentration, expressions of iNOS and eNOS, as well as levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in diaphragm is significantly correlated with the decrease of diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD, respectively.

**【Key words】** Chronic obstructive pulmonary disease; Esophageal lesion; Diaphragm activity; FeNO; Nitric oxide synthase; Inflammatory cytokines

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是因长期慢性气道炎症引起的气道重塑、气流受限性疾病, 严重影响患者的肺功能及生活质量。膈肌是人体重要的呼吸肌, 由膈肌介导的呼吸功能占有所有呼吸肌的 60%~70%<sup>[1-2]</sup>。COPD 患者需用力呼吸才能保证肺泡通气量, 但长期用力呼吸可增加膈肌负担, 导致膈肌疲劳, 且膈肌机械位移范围可随肺过度充气、肺容量增加而缩小<sup>[3-4]</sup>, 进而导致膈肌活动度下降<sup>[5-6]</sup>。目前 COPD 患者膈肌活动度改变的潜在分子机制尚不完全明确。一氧化氮 (NO) 是由一氧化氮合酶 (NOS) 催化精氨酸生成的重要气体信号分子。COPD 患者气道慢性炎症可使 NOS 表达上调<sup>[7]</sup>、NO 生成增多, 而气道 NO 既可刺激炎性细胞活化和浸润、放大炎性反应, 又可启动肌肉的兴奋收缩耦联、引起气道平滑肌及膈肌过度收缩<sup>[8-9]</sup>。本研究旨在探讨膈肌呼出气一氧化氮 (FeNO) 浓度、NOS 表达水平及炎性因子水平与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度的相关性, 现报道如下。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 6 月—2018 年 12 月河北北方学院附属第一医院收治的食管病变行开胸手术患者 48 例。纳入标准: (1) 术前完善肺功能及 FeNO 浓度检查; (2) 术中留取膈肌标本; (3) 近期末接受糖皮质激素及  $\beta_2$ -受体激动剂治疗。排除标准: (1) 胸廓畸形、脊柱畸形者; (2) 合并肺间质疾病、支气管哮喘者; (3) 合并自身免疫性疾病及肝肾功能异常者。根据术前是否合并 COPD 将所有患者分为对照组 (未合并 COPD,  $n=26$ ) 和 COPD 组 (合并 COPD,  $n=22$ )。对照组患者中男 16 例, 女 10 例; 年龄 51~69 岁, 平均年龄 ( $59.9 \pm 8.6$ ) 岁; 体质指数 ( $22.08 \pm 3.77$ )  $\text{kg}/\text{m}^2$ ; 吸烟史 10 例; 合并症: 高血压 13 例, 糖尿病 9 例; 实验室检查指标:

血肌酐 ( $70.14 \pm 10.77$ )  $\text{mmol}/\text{L}$ , 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) ( $22.93 \pm 5.95$ )  $\text{U}/\text{L}$ , 天冬氨酸氨基转移酶 (AST) ( $21.25 \pm 7.14$ )  $\text{U}/\text{L}$ , pH 值 ( $7.41 \pm 0.89$ ); 左心室射血分数 (LVEF) ( $64.58 \pm 9.34$ )%。COPD 组患者中男 14 例, 女 8 例; 年龄 52~71 岁, 平均年龄 ( $60.3 \pm 8.2$ ) 岁; 体质指数 ( $21.61 \pm 3.42$ )  $\text{kg}/\text{m}^2$ ; 吸烟史 11 例; 合并症: 高血压 12 例, 糖尿病 8 例; 实验室检查指标: 血肌酐 ( $72.38 \pm 9.93$ )  $\text{mmol}/\text{L}$ , ALT ( $24.12 \pm 5.23$ )  $\text{U}/\text{L}$ , AST ( $21.93 \pm 4.58$ )  $\text{U}/\text{L}$ , pH 值 ( $7.37 \pm 0.95$ ); LVEF ( $65.24 \pm 9.97$ )%。两组患者性别 ( $\chi^2=0.022$ )、年龄 ( $t=0.164$ )、体质指数 ( $t=0.449$ )、吸烟率 ( $\chi^2=0.645$ )、高血压发生率 ( $\chi^2=0.099$ )、糖尿病发生率 ( $\chi^2=0.016$ )、血肌酐 ( $t=0.744$ )、ALT ( $t=0.729$ )、AST ( $t=0.384$ )、pH 值 ( $t=0.150$ )、LVEF ( $t=0.237$ ) 比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。本研究经河北北方学院附属第一医院医学伦理委员会审核批准 (批准号: 20150012), 患者及家属对本研究知情。

1.2 主要仪器及试剂 主要仪器: 肺功能仪购自德国耶格公司, FeNO 测定系统购自瑞典尼尔斯公司; 主要试剂: 超纯 RNA 提取试剂盒、SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture 试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司, 蛋白裂解液购自 Invitrogen 公司, 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 的第一抗体均购自 Abcam 公司, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。

### 1.3 观察指标

1.3.1 膈肌活动度 比较两组患者膈肌活动度。检查膈肌时, 患者取仰卧位, 将探头置于患者右肋下缘、腋前线与锁骨中线中点处, 方向指向右肩部, 获取清晰的膈

肌图像后记录患者在呼吸运动过程中膈肌超声信号的波峰与波谷,根据波峰与波谷计算膈肌活动度。

**1.3.2 FeNO 浓度** 术前采用 FeNO 测定系统检测两组患者膈肌 FeNO 浓度,采用过滤器吸入外源性 NO 至最大肺活量后指导患者以 50 ml/s 的气流速度呼气,呼气压力为 10~20 cm H<sub>2</sub>O (1 cm H<sub>2</sub>O=0.098 kPa), FeNO 测定系统可自动计算结果。本研究所使用的 FeNO 测定系统具备全面质量控制功能:当患者在测定过程中出现呼吸过弱或过强、漏气、咳嗽和逆向呼吸等情况时,系统主机可自动强行终止测定。

**1.3.3 膈肌 NOS mRNA 相对表达量** 比较两组患者膈肌 NOS (包括 iNOS、eNOS、nNOS) mRNA 相对表达量。术中,取患者膈肌组织适量,采用超纯 RNA 提取试剂盒分离、提取组织总 RNA,以 RNA 为模板,采用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 合成 cDNA,取 cDNA;按照 UltraSYBR Mixture 试剂盒配置聚合酶链式反应 (PCR) 反应体系,按照 95 °C 10 s、特异性退火温度 15 s、72 °C 25 s 的程序反应进行 40 个循环,仪器上可显示 PCR 循环曲线及循环阈值,根据循环阈值计算 iNOS、eNOS、nNOS 的 mRNA 相对表达量。基因引物序列及特异性退火温度见表 1。

表 1 iNOS、eNOS、nNOS 引物序列及特异性退火温度

Table 1 Primer sequence and specific annealing temperature of iNOS, eNOS and nNOS

基因	上游引物 (5' → 3')	下游引物 (5' → 3')	退火温度 (°C)
iNOS	CACTATAGCTAGCTAGCTA	CTAGCGTATAGCTAGCATA	58
eNOS	TATAGCTATAGCGCTACGCC	TATATCGATCGTACGATCGT	60
nNOS	TATCGATCGTAGCTAGCATG	GCTAGCTTATCGATGCTAGC	60

注:iNOS=诱导型一氧化氮合酶,eNOS=内皮型一氧化氮合酶,nNOS=神经型一氧化氮合酶

**1.3.4 膈肌 NOS 蛋白相对表达量** 比较两组患者膈肌 NOS 蛋白相对表达量。取膈肌组织适量,采用蛋白裂解液提取组织总蛋白,蛋白样本经加热、变性后加入聚丙烯酰胺分离凝胶,采用电泳技术将蛋白样本分离、电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜,将 NC 膜放入 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,洗膜后在 4 °C 环境中孵育 iNOS、eNOS、nNOS 的第一抗体过夜;第 2 天,洗膜后室温孵育第二抗体 2 h,再次洗膜并采用 ECL 显影系统显示蛋白条带,以目的基因 (iNOS、eNOS、nNOS) 蛋白条带的灰度值与内参基因  $\beta$ -actin 蛋白的灰度值比值为目的蛋白相对表达量。

**1.3.5 膈肌炎性因子** 比较两组患者膈肌炎性因子〔包括肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素 6 (IL-6)、白介素 8 (IL-8)〕水平。取膈肌组织适量,加入磷酸盐缓冲液后进行超声匀浆,将匀浆

液在 4 °C 离心机中以 12 000 r/min 离心 20 min (离心半径 5.5 cm),取上清液,采用 ELISA 检测患者上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验;计数资料分析采用  $\chi^2$  检验;膈肌 FeNO 浓度、NOS 表达水平及炎性因子水平与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度的相关性采用 Pearson 相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

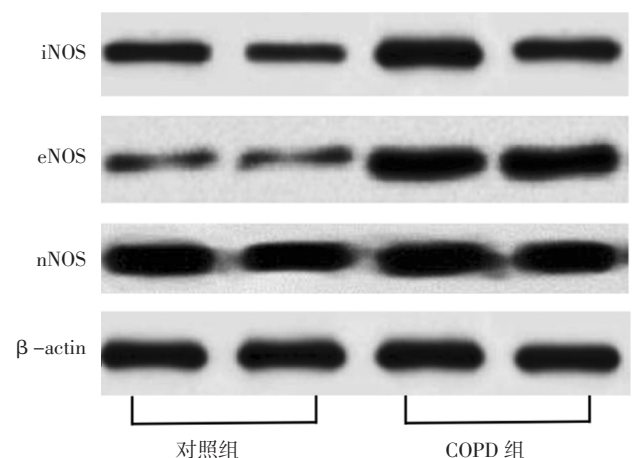
**2.1 膈肌活动度** COPD 组患者膈肌活动度为 ( $2.74 \pm 0.52$ ) cm,小于对照组的 ( $3.89 \pm 0.67$ ) cm,差异有统计学意义 ( $t=6.549, P < 0.05$ )。

**2.2 膈肌 FeNO 浓度** COPD 组患者膈肌 FeNO 浓度为 ( $37.42 \pm 6.23$ ) ppb,高于对照组的 ( $14.52 \pm 2.77$ ) ppb,差异有统计学意义 ( $t=16.896, P < 0.05$ )。

**2.3 膈肌 NOS mRNA 及蛋白相对表达量** COPD 组患者膈肌 iNOS、eNOS mRNA 及蛋白相对表达量高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );两组患者膈肌 nNOS mRNA 及蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,见表 2~3、图 1)。

**2.4 膈肌炎性因子水平** COPD 组患者膈肌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,见表 4)。

**2.5 相关性分析** Pearson 相关分析结果显示,膈肌 FeNO 浓度、iNOS mRNA 相对表达量、eNOS mRNA 相对表达量、iNOS 蛋白相对表达量、eNOS 蛋白相对表达量及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平均与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度呈负相关 ( $P < 0.05$ ,见表 5)。



注:iNOS=诱导型一氧化氮合酶,eNOS=内皮型一氧化氮合酶,nNOS=神经型一氧化氮合酶,COPD=慢性阻塞性肺疾病

图 1 两组患者膈肌 NOS 蛋白电泳结果

Figure 1 Electrophoretic results of NOS protein in diaphragm in the two groups

表2 两组患者膈肌 NOS mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of relative expression quantity of NOS mRNA in diaphragm between the two groups

组别	例数	iNOS	eNOS	nNOS
对照组	26	1.03 ± 0.17	1.01 ± 0.15	0.98 ± 0.19
COPD 组	22	1.77 ± 0.32	1.89 ± 0.41	1.04 ± 0.22
<i>t</i> 值		5.066	10.184	1.014
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	0.316

注: COPD= 慢性阻塞性肺疾病

表3 两组患者膈肌 NOS 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of relative expression quantity of NOS protein in diaphragm between the two groups

组别	例数	iNOS	eNOS	nNOS
对照组	26	1.04 ± 0.18	1.01 ± 0.19	0.97 ± 0.20
COPD 组	22	3.04 ± 0.72	2.39 ± 0.50	1.06 ± 0.25
<i>t</i> 值		13.692	13.026	1.386
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	0.173

表4 两组患者膈肌炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of levels of inflammatory cytokines in diaphragm in between the two groups

组别	例数	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	IL-1 $\beta$ ( $\mu$ g/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)
对照组	26	3.24 ± 0.56	4.55 ± 0.79	91.26 ± 13.57	131.29 ± 21.38
COPD 组	22	5.15 ± 0.84	7.59 ± 1.03	146.34 ± 21.25	203.54 ± 37.69
<i>t</i> 值		9.395	11.564	10.965	9.328
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: TNF- $\alpha$  = 肿瘤坏死因子  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  = 白介素 1 $\beta$ , IL-6 = 白介素 6, IL-8 = 白介素 8

表5 膈肌 FeNO 浓度、NOS 表达水平及炎症因子水平与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度的 Pearson 相关分析结果

Table 5 Pearson correlation analysis of FeNO concentration, expression of NOS and levels of inflammatory cytokines in diaphragm with diaphragm mobility in esophageal lesion patients complicated with COPD

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
FeNO 浓度	-0.285	0.017
iNOS mRNA 相对表达量	-0.512	<0.05
eNOS mRNA 相对表达量	-0.341	0.010
iNOS 蛋白相对表达量	-0.245	0.020
eNOS 蛋白相对表达量	-0.258	0.019
TNF- $\alpha$	-0.194	0.024
IL-1 $\beta$	-0.389	0.008
IL-6	-0.416	0.004
IL-8	-0.278	0.015

### 3 讨论

COPD 是以不可逆气流受限为主要特征的肺部疾病, 气流受限导致呼吸肌做功增加, 患者需通过用力呼吸而保证肺泡足够的通气量, 但长期用力呼吸会引起呼

吸肌疲劳甚至损伤<sup>[10]</sup>。膈肌是人体重要的呼吸肌, 也是 COPD 较易累及的呼吸肌, 有研究报道, COPD 患者膈肌肌纤维缩短约 40%, 而肋间肌肌纤维缩短约 7%<sup>[11]</sup>, 膈肌疲劳或受损可使肌动蛋白肌丝、肌球蛋白肌丝过度重叠, 进而导致患者膈肌活动度下降; 此外, COPD 患者肺过度充气、残气过多均会直接造成膈肌机械位移, 进而加剧膈肌活动度下降<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示, COPD 组患者膈肌活动度小于对照组, 提示 COPD 患者膈肌活动度下降, 与刘岷等<sup>[6]</sup> 研究结果一致。

相关研究表明, 膈肌收缩功能损伤除与钙离子释放介导的兴奋收缩耦联异常有关外, 还与肌细胞损伤有关<sup>[14]</sup>。气道慢性炎症是 COPD 患者的基本病理特征, 而 FeNO 是临床评价气道炎症的常用无创指标<sup>[15]</sup>。NO 是人体重要的气体信号分子, 可招募炎性因子、放大炎症反应, 造成气道平滑肌、膈肌损伤; 另外, NO 还可通过影响自由基生成、电子链传递等过程而破坏兴奋收缩<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示, COPD 组患者膈肌 FeNO 浓度高于对照组, 且膈肌 FeNO 浓度与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度与呈负相关, 与既往研究结果一致<sup>[18-19]</sup>, 提示 COPD 患者气道内大量生成的 FeNO 可通过直接损伤膈肌及兴奋-收缩耦联等使食管病变并 COPD 患者膈肌活动度下降。

NOS 包括 iNOS、eNOS、nNOS, 可通过催化精氨酸代谢生成 NO。张运涛等<sup>[7]</sup> 研究表明, COPD 患者膈肌 NOS mRNA 表达水平升高, 但并分析不同类型 NOS 表达水平。本研究结果显示, COPD 组患者膈肌 iNOS、eNOS mRNA 及蛋白相对表达量高于对照组, 但两组患者 nNOS mRNA 及蛋白相对表达量间无统计学差异, 提示 iNOS、eNOS 可能参与了食管病变并 COPD 患者膈肌损伤过程。呼吸肌长期过度做功、慢性炎症均可诱导 iNOS 表达; eNOS 与膈肌中内皮细胞功能障碍、毛细血管重构关系密切。本研究结果还显示, 膈肌 iNOS mRNA 相对表达量、eNOS mRNA 相对表达量、iNOS 蛋白相对表达量、eNOS 蛋白相对表达量与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度均呈负相关, 提示膈肌 iNOS、eNOS 表达水平升高可能是导致食管病变并 COPD 患者膈肌活动度下降的机制之一。

气体信号分子 NO 具有促炎活性, 可通过激活炎症反应而加重膈肌损伤、导致膈肌活动度下降<sup>[16-17]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 是由 NO 调控的常见促炎因子<sup>[20-22]</sup>。本研究结果显示, COPD 组患者膈肌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平高于对照组, 提示 COPD 患者膈肌存在炎症反应; 进一步行 Pearson 相关分析显示, 膈肌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平均与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度呈负相关, 提示膈肌炎症因子水平升高与食管病变并 COPD 患者膈肌活动

度下降有关。

综上所述,膈肌 FeNO 浓度、iNOS 及 eNOS 表达水平、炎性因子水平升高与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度下降有关;但本研究仅进行了相关性分析,并不能证实膈肌 FeNO 浓度、iNOS 及 eNOS 表达水平、炎性因子水平升高与食管病变并 COPD 患者膈肌活动度下降之间的因果关系,今后可结合动物实验进一步验证。

作者贡献:王慧进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析;张鑫、薛乾隆进行数据收集、整理、分析;杨森进行结果分析与解释,论文的修订;王慧负责撰写论文,负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] SOUZA R M P, CARDIM A B, MAIA T O, et al. Inspiratory muscle strength, diaphragmatic mobility, and body composition in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Physiother Res Int*, 2019, 24(2): e1766. DOI: 10.1002/pri.1766.
- [2] NAIR A, ALAPARTHI G K, KRISHNAN S, et al. Comparison of diaphragmatic stretch technique and manual diaphragm release technique on diaphragmatic excursion in chronic obstructive pulmonary disease: A randomized crossover trial [J]. *Pulm Med*, 2019, 2019: 6364376. DOI: 10.1155/2019/6364376.
- [3] WANG Y, LIU N, ZHANG Z C. Respiratory electrophysiologic studies in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(1): e13993. DOI: 10.1097/MD.00000000000013993.
- [4] RAFOLS-DE-URQUIA M, ESTEVEZ-PIORNO J, ESTRADA L, et al. Assessment of respiratory muscle activity with surface electromyographic signals acquired by concentric ring electrodes [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2018, 2018: 3350-3353. DOI: 10.1109/EMBC.2018.8512953.
- [5] CORBELLINI C, BOUSSUGES A, VILLAFANE J H, et al. Diaphragmatic mobility loss in subjects with moderate to very severe COPD may improve after in-patient pulmonary rehabilitation [J]. *Respir Care*, 2018, 63(10): 1271-1280. DOI: 10.4187/respcare.06101.
- [6] 刘岷, 骈林萍. 超声评价膈肌活动度与慢性阻塞性肺疾病患者生活质量及运动能力的相关性研究 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2018, 17(6): 548-551. DOI: 10.7507/1671-6205.201804041.
- [7] 张运涛, 程宏宁, 林亚发, 等. 慢阻肺患者内源性 NO 合酶表达、膈肌组织改变对膈肌功能变化的影响 [J]. *临床肺科杂志*, 2016, 21(10): 1833-1836. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2016.10.026.
- [8] CHEN R J, QIAO L P, LI H C, et al. Fine particulate matter constituents, nitric oxide synthase DNA methylation and exhaled nitric oxide [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(19): 11859-11865. DOI: 10.1021/acs.est.5b02527.
- [9] SHI F, QIU C, YU J, et al. Comparison of fractional exhaled nitric oxide in elderly patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap and other airway inflammatory diseases [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018, 17(3): 232-239.
- [10] ABBAS A, EMBARAK S, WALAA M, et al. Role of diaphragmatic rapid shallow breathing index in predicting weaning outcome in patients with acute exacerbation of COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 21(13): 1655-1661. DOI: 10.2147/COPD.S161691.
- [11] GREISING S M, OTTENHEIJM C A C, O'HALLORAN K D, et al. Diaphragm plasticity in aging and disease: therapies for muscle weakness go from strength to strength [J]. *J Appl Physiol*, 2018, 125(2): 243-253. DOI: 10.1152/jappphysiol.01059.2017.
- [12] GONÇALVES M A, LEAL B E, LISBOA L G, et al. Comparison of diaphragmatic mobility between COPD patients with and without thoracic hyperkyphosis: a cross-sectional study [J]. *J Bras Pneumol*, 2018, 44(1): 5-11. DOI: 10.1590/S1806-37562016000000248.
- [13] ZHOU X, YI D J, WU Y H, et al. Expression of diaphragmatic myostatin and correlation with apoptosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3): 2295-2300. DOI: 10.3892/etm.2018.5686.
- [14] O'DONNELL D E, NEDER J A, ELBEHAIRY A F. Physiological impairment in mild COPD [J]. *Respirology*, 2016, 21(2): 211-223. DOI: 10.1111/resp.12619.
- [15] 谢晓然, 鲍文华, 马雪梅, 等. 呼出气 NO 及 IL-32 在慢性阻塞性肺疾病中的改变及意义探讨 [J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(2): 253-256. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2018.02.016.
- [16] MOZOS I, LUCA C T. Crosstalk between oxidative and nitrosative stress and arterial stiffness [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(5): 446-456. DOI: 10.2174/1570161115666170201115428.
- [17] O'HALLORAN K D, LEWIS P. Respiratory muscle dysfunction in animal models of hypoxic disease: antioxidant therapy goes from strength to strength [J]. *Hypoxia (Auckl)*, 2017, 5: 75-84. DOI: 10.2147/HP.S141283.
- [18] 谢晓然, 鲍文华, 马雪梅, 等. 呼出气 NO 及 IL-32 在慢性阻塞性肺疾病中的改变及意义探讨 [J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(2): 253-256. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2018.02.016.
- [19] 李玉磊, 陈国忠, 刘莉敏, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者呼出气一氧化氮与外周血嗜酸性粒细胞相关性分析 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(21): 3521-3524. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2018.21.008.
- [20] KNUDSEN L, ATOCHINA-VASSERMAN E N, MASSA C B, et al. The role of inducible nitric oxide synthase for interstitial remodeling of alveolar septa in surfactant protein D-deficient mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(9): 959-969. DOI: 10.1152/ajplung.00017.2015.



· 论著 ·

# 非小细胞肺癌患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs 研究

张婷, 王凌伟

**【摘要】** 背景 目前,临床上尚缺乏早期、有效诊断非小细胞肺癌(NSCLC)的指标,来源于癌组织的外泌体及其内部物质因可反映亲本细胞性质而有望成为早期诊断肿瘤的生物标志物。目的 通过高通量测序技术筛选 NSCLC 患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs (miRNAs)。方法 收集 2018 年 1 月—2019 年 1 月于深圳市人民医院就诊的 4 例 NSCLC 患者的外周血样品,其中肺腺癌(LUAD)2 例、肺鳞状细胞癌(LUSC)2 例;另收集同期 4 例健康志愿者的外周血样品作为对照。采用 HiSeq 2500 高通量测序仪进行 miRNAs 测序,采用 DESeq2 软件筛选差异表达的 miRNAs;在癌症基因组图谱(TCGA)中选取并比较 39 对 LUAD 组织及其配对癌旁正常组织、45 对 LUSC 组织及其配对癌旁正常组织 miRNA-9-3p 测序结果。结果 (1)高通量测序结果显示,4 例 NSCLC 患者外周血外泌体中平均检测到 776 种 miRNAs,4 例健康志愿者外周血外泌体中平均检测到 238 种 miRNAs。(2)LUAD 与 LUSC 患者外周血外泌体中差异表达最显著的 10 种 miRNAs 中有 6 种是重合的,分别为 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p。(3)LUSC-1、LUSC-2、LUAD-1 及 LUAD-2 外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达量分别为 71.51、15.61、13.99、16.11 转录本数,4 例健康志愿者外周血外泌体中 miRNA-9-3p 表达量均为 0。TCGA 中 LUAD 组织和 LUSC 组织 miRNA-9-3p 表达量均高于其配对癌旁正常组织 ( $P<0.01$ )。结论 通过高通量测序技术发现 miRNA-1228-5p、miRNA-129-5p、miRNA-760、miRNA-885-3p、miRNA-9-3p、miRNA-95-3p 可能是 NSCLC 患者潜在的特异性 miRNAs,其中 miRNA-9-3p 主要来源于 NSCLC 患者癌组织,这为后续通过外周血外泌体 miRNAs 测序而实现 NSCLC 的早期、无创诊断奠定了研究基础。

**【关键词】** 非小细胞肺癌;外泌体;微小 RNAs;高通量测序;诊断

**【中图分类号】** R 730.26 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.11.012

张婷,王凌伟.非小细胞肺癌患者外周血外泌体中差异表达的微小 RNAs 研究[J].实用心脑血管病杂志,2019,27(11):54-58.[www.syxnf.net]

ZHANG T, WANG L W. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood exosomes in patients with non-small cell lung cancer [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (11) : 54-58.

## Differentially Expressed MicroRNAs in Peripheral Blood Exosomes in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Ting, WANG Lingwei

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shenzhen People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China

Corresponding author: WANG Lingwei, E-mail: limey@sina.com

基金项目: 深圳市科技研发资金基础研究项目 (JCYJ20170307095633450)

518020 广东省深圳市人民医院 (南方科技大学第一附属医院) 呼吸与危重症医学科

通信作者: 王凌伟, E-mail: limey@sina.com

[21] BAI Y, ZHOU Q, FANG Q, et al. Inflammatory cytokines and t-lymphocyte subsets in serum and sputum in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Med Sci Monit, 2019, 25 (25) : 2206-2210. DOI: 10.12659/MSM.913703.

type I collagen turnover indicators accompanied by IL-6 and IL-8 release in stable COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019, 3 (14) : 163-168. DOI: 10.2147/COPD.S188139.

(收稿日期: 2019-06-03; 修回日期: 2019-10-12)

(本文编辑: 李越娜)

[22] ZENG Y Y, HU W P, ZUO Y H, et al. Altered serum levels of