

通过 ROC 曲线和曲线下面积 AUC 分析 HE4 和 CA153 水平变化对早期乳腺癌诊断价值结果显示,当 HE4 和 CA153 的截断值分别为 99.35pg/L、28.35U/L 时,HE4 和 CA153 的曲线下面积 AUC 分别为 0.897、0.859 时,有较高的敏感度和特异性,提示 HE4 和 CA153 越高诊断为有病的可能性越大。本组资料同时显示,HE4 和 CA153 联合检测对乳腺癌诊断的敏感度、准确性和阴性预测值均比单项检测有明显提高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),HE4 和 CA153 联合检测的特异性和阳性预测值低于单项检测,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

综上所述,HE4 和 CA153 联合表达对早期乳腺癌的诊断有重要参考价值,HE4 和 CA153 的联合检测可为广西早期乳腺癌患者的早期诊断提供新的参考依据,对降低乳腺癌患者的病死率、提高生存率、改善生活质量具有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Song Q, Huang R, Li J, *et al.* The diverse distribution of risk factors between breast cancer subtypes of ER, PR and HER2: A 10-year retrospective multi-center study in China [J]. PLoS One, 2013, 8 (8): e72175
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- 3 党小军, 张华, 王欣. 人附睾蛋白 4 (HE4) 在乳腺癌诊断中的价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(6): 84-85
- 4 刘彩霞, 白俊文. 血清肿瘤标志物检测对乳腺癌诊断的意义 [J]. 中国医学前沿杂志, 2015, 7(12): 44-46
- 5 杨泽安. CEA、CA125 及 CA153 在乳腺癌中的检测价值 [J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2016, 13(3): 83-85
- 6 Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, *et al.* Human epididymis protein (HE4) in benign and malignant diseases [J]. Clin Chemlab Med, 2012, 50(12): 2181-2188
- 7 Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, *et al.* A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors [J]. Biol Reprod, 1991, 45(2): 350-357
- 8 郭变琴, 吴立翔. 血清人附睾蛋白 4、糖类抗原 153 在监测术后乳腺癌复发转移的探讨 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(12): 1676-1680
- 9 Kamei M, Yamashita S, Tokuishi K, *et al.* HE4 expression can be associated with lymph node metastases and disease-free survival in breast cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(11): 4779-4783
- 10 刘崇, 陈波, 姜佳怡, 等. 血清 CA153 和 HE4 检测在乳腺癌的临床意义价值 [J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(5): 565-567
- 11 Ghadge MS, Naik PP, Tiwari BP, *et al.* A comparative study of bone scan findings and serum levels of tumor marker CA15-3 in patients with breast carcinoma [J]. Indian J Clin Biochem, 2012, 27(1): 97-99
- 12 Chen Y, Zheng YH, Lin YY, *et al.* Clinical and prognostic significance of preoperative serum CA15-3, CEA and TPS levels in patients with primary breast cancer [J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33(11): 842-846
- 13 南永刚, 许建林, 李楠, 等. CA153、CA125 联合 HER-2 检测在乳腺癌各临床分期诊断中的应用 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(19): 3070-3073
- 14 徐龙, 张冠中, 郑振东, 等. 血清 CEA 及 CA153 连续且显著降低对晚期乳腺癌无影像学进展的判定价值 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(19): 865-868 (收稿日期: 2017-12-21)
(修回日期: 2017-12-24)

高同型半胱氨酸血症兔致动脉粥样硬化的实验研究

王晓萍 周明旺 颜春鲁 东红 杜改焕

摘要 **目的** 复制可靠的兔高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 致动脉粥样硬化 (AS) 模型。**方法** 采用 L-蛋氨酸皮下注射法建立 HHcy 家兔模型, 并设生理盐水组为对照, 比较两组注射前、注射后 4、8、12 周血清中 Hcy、TC、TG、HDL-C、LDL-C 值, 实验结束后超声观察腹主动脉狭窄程度及病理切片观察 AS 形成的情况。**结果** 皮下注射 L-蛋氨酸 4 周后血中 Hcy 明显高于正常组 ($P < 0.05$), HHcy 模型形成; 造模 8、12 周 TC、TG 水平显著升高 ($P < 0.05$); 造模 12 周模型组 LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$); 造模 12 周后腹主动脉超声与病理均提示有明显的 AS 征象。**结论** L-蛋氨酸皮下注射 80mg/(kg·d) 4 周可建立 HHcy 模型, 12 周时动脉粥样硬化表现明显。

关键词 同型半胱氨酸 动脉粥样硬化 实验研究 动物模型

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.016

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (1208RJZA187); 甘肃省高等学校科研项目 (2013A-086)

作者单位: 730050 兰州, 甘肃省中医院 (甘肃中医药大学第一附属医院) (王晓萍、周明旺、东红、杜改焕); 730000 兰州, 甘肃中医药大学 (颜春鲁)

通讯作者: 王晓萍, 电子信箱: 695469449@qq.com

Experimental Study on High Homocysteine Induced Rabbit Atherosclerotic Lesions Wang Xiaoping, Zhou Mingwang, Yan Chunlu, et al. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (The First Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine), Gansu 730050, China

Abstract Objective To replicate animal model of high homocysteine induced rabbit atherosclerotic lesions. **Methods** Rabbits were randomly divided into 2 groups: the model group and the control group. The model groups were injected L-methionine respectively, while the control group was given normal saline. The levels of Hcy in serum were analyzed before injection, 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after injection in each group. The formation of atherosclerosis was observed through type-B ultrasonic and pathological section. Moreover, the levels of Hcy, TC, TG, HDL-C and LDL-C in serum of each group were determined. **Results** After 4 weeks of injection, the levels of Hcy in serum in model groups were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). After 8 weeks and 12 weeks, the levels of TC and TG were significantly increased ($P < 0.05$). After 12 weeks, the levels of LDL-C were significantly increased ($P < 0.05$). After 12 weeks, the abdominal aorta has obvious signs of atherosclerosis with type-B ultrasonic and pathological section. **Conclusion** When administrated with L-methionine injection [$80\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], rabbit can be made into the homocystinemia model in the 4th weeks and atherosclerosis can be developed on the 12th week

Key words Homocysteine; Atherosclerosis; Experimental research; Animal models

心脑血管疾病严重危害人类健康,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是首要的病因与病理基础,血浆中升高的同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平与心脑血管疾病有着非常密切的联系,因此高同型半胱氨酸(hypohomocysteinemia, HHcy)所致的 AS 越来越受到医学研究者的重视。研究表明,HHcy 参与心脑血管疾病、糖尿病肾病、阿尔茨海默病等的形成与发展^[1-3]。HHcy 可激活的血管壁炎症发生导致 AS 发生,HHcy 血症为 AS 和血栓形成等心脑血管疾病发病的独立危险因素,作用于 AS 发生、发展的各个环节^[4,5]。临床试验及流行病学调查表明血浆 Hcy 升高与心脑血管病变存在剂量依赖关系,为动静脉血栓形成及 AS 的独立危险因素,血浆 Hcy 每升高 $3\mu\text{mol}/\text{L}$,脑卒中发生率增加 19%,缺血性心脏病发生率增加 1%^[6]。本研究旨在复制可靠的兔 HHcy 及 AS 模型,用于防治 HHcy 血症与 AS 的研究。

对象与方法

1. 对象:成年健康普通级日本大耳白兔 16 只,雄性 4 月龄,体质量 $2.0 \sim 2.5\text{kg}$,由中国农业科学院兰州兽医研究所提供,实验动物合格证号:SCXK(甘)2010-0001。动物饲养于甘肃中医药大学普通级动物实验室,实验室温度 $18 \sim 24^\circ\text{C}$ 、光照明暗各 12h 清洁的饲养室内,分笼喂养。

2. 方法:(1)动物分组与模型制备:实验动物适应性喂养 1 周,随机分为模型组与对照组 2 组。动物模型参照孟磊等^[7]的方法制作。模型组(8 只)背部皮下注射 L-蛋氨酸 $80\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,2 毫升/只,连续 12 周,标准兔饲料喂养。对照组(8 只)在背部皮下注射与模型组等容量的生理盐水,标准兔饲料喂养。12 周末终止实验。(2)观察指标与检测方法:①血浆

Hcy 含量与血脂 TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 测定:分别于开始注射 L-蛋氨酸前(0 周)、4、8、12 周,耳背静脉取血 2ml,EDTA 抗凝,及时分离血清, -80°C 保存,待测。Hcy 采用酶标仪 ELISA 法测定,按试剂盒说明书操作。TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 采用全自动生物化学分析仪测定;②兔腹主动脉超声检查:造模 12 周行血管超声检查,实验兔腹部备皮后,仰卧位固定于检查床,沿腹正中线处,自上而下地检测腹主动脉长轴及短轴切面,不断调整探头的角度以获得清晰的图像和斑块形态结构,观察血管内膜光滑程度、有无粥样斑块形成;③兔腹主动脉血管病理变化:第 12 周末,空气栓塞的方法将兔处死。取髂外动脉约 1cm,纵行抛开,取降主动脉至腹主动脉分叉处血管,放置在含有 10% 多聚甲醛、标记的小广口瓶内固定。取材,脱水,血管横断包埋,石蜡切片,光镜观察。

3. 统计学方法:所有数据应用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间对比采用独立样本 t 检验,组间两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组不同造模时间血清同型半胱氨酸水平比较:实验前(0 周),两组血清 Hcy 水平相近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。注射 L-蛋氨酸 4 周后,模型组 Hcy 水平显著增高,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),HHcy 模型形成。造模后 8 周、12 周,模型组 Hcy 水平与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。造模时间越长,Hcy 水平越高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

表 1 两组不同造模时间血清 Hcy 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	<i>n</i>	0 周	4 周	8 周	12 周
正常组	8	11.34 ± 2.39	12.60 ± 2.04	13.07 ± 3.09	12.72 ± 2.43
模型组	8	12.07 ± 2.61	16.18 ± 3.02 *	18.08 ± 2.82 *	18.55 ± 2.66 *

与正常组比较, * $P < 0.05$

2. 两组不同造模时间血清脂代谢水平比较:实验前(0 周)两组血清 TC、TG、HDL - C、LDL - C 水平相近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组造模后 8、12 周 TC、TG 测定水平升高,与正常组比较,差异有统

计学意义($P < 0.05$)。造模 4、8、12 周后,模型组 HDL - C 水平与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模 12 周模型组 LDL - C 与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 两组不同造模时间血清脂代谢水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	<i>n</i>	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL - C (mmol/L)	LDL - C ($\mu\text{g/ml}$)
0 周	正常组	8	2.87 ± 0.33	2.01 ± 0.25	199.55 ± 13.56	59.14 ± 4.86
	模型组	8	2.65 ± 0.29	2.48 ± 0.33	186.40 ± 17.39	58.81 ± 3.61
4 周	正常组	8	2.61 ± 0.45	2.23 ± 0.30	212.93 ± 19.09	53.28 ± 2.52
	模型组	8	3.04 ± 0.60	3.71 ± 0.39	184.41 ± 21.41	57.33 ± 4.83
8 周	正常组	8	2.77 ± 0.52	2.18 ± 0.46	179.08 ± 15.25	55.97 ± 3.39
	模型组	8	5.87 ± 0.36 *	4.07 ± 0.27 *	198.63 ± 19.80	62.71 ± 5.67
12 周	正常组	8	3.07 ± 0.64	2.42 ± 0.19	201.04 ± 15.08	55.62 ± 3.65
	模型组	8	6.02 ± 0.58 *	4.82 ± 0.35 *	190.57 ± 23.27	77.28 ± 5.14 *

与正常组比较, * $P < 0.05$

3. 超声检查结果:正常组腹主动脉管腔显示清楚,内膜回声规整,管腔内径均匀,血流通畅,血流方向正常。模型组 12 周时超声提示腹主动脉管壁呈不规则增厚,可见高回声斑块,管腔均有不同程度狭窄。

4. 病理观察结果:正常对照组血管壁薄且结构清晰,动脉血管内膜光滑,平滑肌细胞排列整齐,内皮细胞结构连续完整,单侧紧贴内弹力板,内皮下未见脂质及炎性细胞浸润,中层平滑肌细胞排列整齐,呈长椭圆形,外膜结构清楚,未见明显病理改变(图 1)。模型组动脉血管壁增厚、变硬,似有增生,内中膜增厚,内膜下可见泡沫细胞,平滑肌细胞增生,内有脂质沉积,胶原纤维和弹性纤维增多,内膜中有大量巨噬细胞浸润,中层结构紊乱(图 2)。

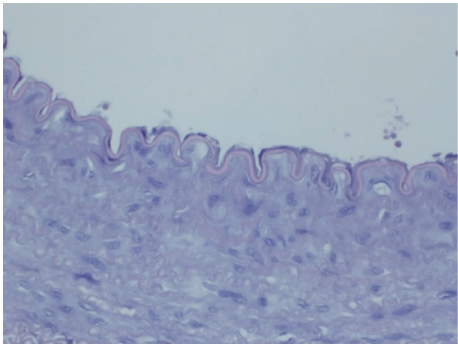


图 1 对照组病理图像(HE, ×400)

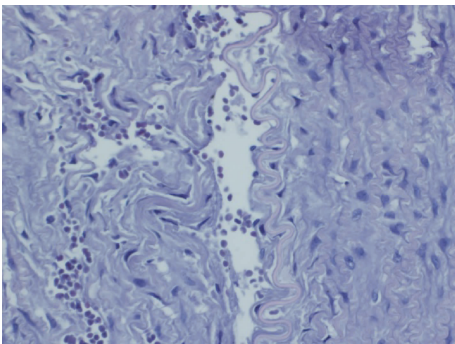


图 2 模型组病理图像(HE, ×400)

讨 论

Hcy 是一种存在于血浆中的氨基酸,也是半胱氨酸与蛋氨酸代谢中的中间产物之一。因环境因素或遗传因素而导致 Hcy 持续性超高称之为 HHcy。HHcy 可导致早期血管硬化,使动脉粥样硬化相关基因异常甲基化、细胞周期失控,从而促进动脉粥样硬化的发生及发展^[8,9]。高 Hcy 水平可导致血管内皮损伤、血管平滑肌细胞增殖、血小板活化、脂类代谢紊乱、诱导炎症反应发生等作用^[10]。Hcy 浓度增加,产生的过氧化物超过细胞自身清除能力,损伤细胞防御系统,使细胞内蛋白、酶等外漏,内皮细胞继而坏死凋亡、通透性增加,引发脂质代谢紊乱,脂质沉积于血管

内膜而形成动脉粥样硬化斑块。另外 HHcy 水平改变血脂的代谢过程,参与炎症反应,这些均是 AS 形成的重要因素^[11]。Hcy 具有明显的超氧化作用,通过脂质过氧化引起内皮细胞损害,Hcy 的浓度与其诱发低密度脂蛋白体外氧化修饰的程度相关,Hcy 与 LDL-C 共同参与 AS 的形成^[12]。

目前 HHcy 的动物模型国外多选用小型猪、狒狒和猴等大型哺乳动物,国内多选用以兔及大鼠居多,兔是目前公认制作 AS 模型的动物,方法有灌胃、含甲硫氨酸饲料饲喂、皮下注射蛋氨酸等^[13,14]。马雪兴等^[15]报道,过量蛋氨酸摄入 6 个月,可引发高 Hcy 血症,并造成典型的主动脉粥样硬化损伤,血浆 TXB₂ 水平显著升高。高奋等^[16]报道,新西兰大白兔喂食 1% 蛋氨酸饲料是一种较为可靠的制造 HHcy 模型的方法。也有报道,采用球囊拉伤腹主动脉后,给予高脂、蛋氨酸饮食诱导的方法制作 HHcy 致 AS 兔模型^[17]。综合文献分析认为,高脂、蛋氨酸饮食诱导加动脉球囊拉伤动脉内膜复制 HHcy 兔导致的 AS,虽能快速诱导 AS 模型形成,但动脉内膜球囊损伤要对兔行手术操作,需要行血管切开,损伤较大,死亡率高;喂食蛋氨酸饲料复制 HHcy 兔导致的 AS,实验周期太长;采用皮下注射 L-蛋氨酸复制 HHcy 兔导致的 AS,方法简单易操作,实验周期相对较短,动物死亡率低。

本研究发现,皮下注射 L-蛋氨酸 4 周,即可形成 HHcy,建立起 HHcy 兔模型。超声提示腹主动脉管壁呈不规则增厚,可见高回声斑块,管腔均有不同程度狭窄,与文献报道基本一致^[18]。徐娟萍等^[19]报道,皮下注射 L-蛋氨酸形成 HHcy,继之血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)现状身高,血液与组织出现过氧化损伤形成 AS。持续 12 周动物处死后进行病理形态学观察,观察到了血管病变,包括管腔轻度狭窄、平滑肌细胞增生活跃、内膜增厚、弹力纤维排列紊乱等,均为动脉硬化的早期改变,已形成了兔 AS 样的病理改变,研究结果进一步证实了 HHcy 是 AS 的重要危险因素。HHcy 形成后,TC、TG、LDL-C 测定水平升高,出现血脂代谢紊乱。高 Hcy 水平导致脂质代谢紊乱,加速低密度脂蛋白氧化成氧化型 LDL-C,堆积在由单核细胞转化而来的泡沫细胞内,沉积于动脉血管壁上,加速斑块钙化和动脉粥样硬化进程。脂质沉积于血管壁是继 Hcy 对血管的初步损伤之后的继发改变,HHcy 是 AS 形成的一个独立危险因素。

参考文献

- 王巧刚,陈黎亚,张巧红.超敏 C 反应蛋白和同型半胱氨酸与 2 型糖尿病肾病相关性分析[J].医学理论与实践,2016,29(15):2090-2091
- 刘坤,刘维婕,刘丹,等.血浆同型半胱氨酸水平与老年痴呆病情程度的相关性研究[J].航空航天医学杂志,2016,27(12):1483-1485
- 纪昕,岳晓乐,赵丹丹,等.同型半胱氨酸与动脉粥样硬化患者血管内皮细胞损伤相关性[J].标记免疫分析与临床,2017,24(1):73-76
- 常娜,鲁广秀.高半胱氨酸与动脉粥样硬化性急性脑梗死患者血管病变的相关性研究[J].医药导报,2014,2:203-205
- 祖权,关立克.高同型半胱氨酸血症与动脉粥样硬化的关系及其临床意义[J].吉林医学,2015,36(1):110-112
- Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis[J]. JAMA,2012,228(16):2015
- 孟磊,高炜,赵春玉,等.高同型半胱氨酸血症引起家兔动脉硬化[J].北京大学学报:医学版,2001,33(6):536-539
- Turkcu FM, Koz OG, Yarangumeli A, et al. Plasma homocysteine, folic acid, and vitamin B12 levels in patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and normotensive glaucoma[J]. Medicina: Kaunas, 2013, 49(5):214
- Narayanan N, Pushpakumar SB, Givvimani S, et al. Epigenetic regulation of aortic remodeling in hyperhomocysteinemia[J]. FASEB J, 2014, 28(8):3411-3422
- Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(32):3662-3672
- Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage[J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(7):693-699
- 陈景开,周进军,赵秋良,等.高同型半胱氨酸血症与 LDL 氧化修饰及动脉粥样硬化的关系[J].解放军医学杂志,2001,26(5):327
- Lentz SR, Malinow MR, Piegors DJ, et al. Consequences of hyperhomocysteinemia in vascular function in atherosclerotic monkeys[J]. Arterioscler Thromb Vac Biol, 1997, 17(2):930-934
- 李丽帆,彭义,吴芳,等.兔高同型半胱氨酸血症模型建立及动脉粥样硬化形成的实验研究[J].广西中医学院学报,2006,9(4):1-3
- 马雪兴,刘王明,吾柏铭,等.蛋氨酸对兔同型半胱氨酸水平及动脉粥样硬化的影响[J].中国心血管杂志,2002,7(4):231-234.
- 高奋,李静梅,肖传实.高同型半胱氨酸血症兔模型动脉粥样硬化的形成[J].中国动脉硬化杂志,2002,10(4):348-349
- 袁吉祥,姚成立,马云海,等.牛磺酸抑制高脂合并高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(5):435-439
- 王兴华,高奋,李杰,等.高同型半胱氨酸兔模型腹主动脉超声表现的实验研究[J].中华超声影像学杂志,2003,12(7):435-437
- 徐娟萍,张晓峰,罗梅宏,等.高同型半胱氨酸过氧化损伤致兔动脉粥样硬化的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2012,7(9):751-755

(收稿日期:2017-03-22)

(修回日期:2017-04-11)