

肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血患者外周血单个核细胞中 TMEM16A 的表达水平及意义

李龙辉 王 宇 高文广 赵艳红 高 明

【摘要】 目的 探究肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血(EGVB)患者外周血单个核细胞中跨膜蛋白 16A(TMEM16A)的表达水平及意义。方法 选择 2016 年 2 月至 2019 年 12 月在廊坊市第四人民医院就诊的 206 例 EGVB 患者作为研究对象。采用密度梯度离心法获取外周血中单个核细胞。采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 TMEM16A 的表达水平,并分析其与 EGVB 患者预后的关系。结果 206 例 EGVB 患者中 97 例(47.09%)预后不良。预后良好组 TMEM16A 的表达水平高于预后不良组,差异有统计学意义($P<0.05$)。多因素 logistic 回归分析结果显示,Child-Pugh 分级、MELD 评分和白细胞计数是 EGVB 患者预后的独立危险因素($P<0.05$),而白蛋白、血钠和 TMEM16A 是独立保护因素($P<0.05$)。限制性立方样条分析结果表明 TMEM16A 与 EGVB 患者预后有关($P<0.05$),且呈非线性关系(非线性检验 $P<0.05$)。与 TMEM16A=0.57 比较, TMEM16A<0.57 时预后不良风险较高, TMEM16A>0.57 时预后不良风险较低。结论 EGVB 患者外周血单个核细胞中 TMEM16A 表达水平低提示其预后不良风险较高,检测其表达水平有助于评估患者预后情况。

【关键词】 食管胃底静脉曲张;单个核细胞;跨膜蛋白 16A;预后

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2021.03.008

Expression and significance of TMEM16A in peripheral blood mononuclear cells in patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding LI Longhui, WANG Yu, GAO Wenguang, ZHAO Yanhong, GAO Ming. Department of Gastroenterology, the Fourth People's Hospital of Langfang, Langfang 065000, China

【Abstract】 Objective This paper attempts to investigate the level and significance of transmembrane protein 16A (TMEM16A) in peripheral blood mononuclear cells in patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding. **Methods** From February 2016 to December 2019, two hundred and six patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding who were treated in the Fourth People's Hospital of Langfang were selected as the research subjects. Mononuclear cells in peripheral blood were obtained by density gradient centrifugation. TMEM16A levels in mononuclear cells were detected by Western blotting to analyze its relationship with the prognosis of patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding. **Results** Out of 206 patients with cirrhosis and esophagogastric varices bleeding, 97 patients (47.09%) had a poor prognosis. The TMEM16A level in the favorable prognosis group was higher than that in the poor prognosis group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of logistic regression analysis showed that the Child-

Pugh grade, the MELD score, and the white blood cell count were independent risk factors for the prognosis of patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding ($P < 0.05$) while albumin, serum sodium and TMEM16A were independent protective factors ($P < 0.05$). The results of restrictive cubic spline analysis showed that TMEM16A was related to the prognosis of patients with hepatic cirrhosis and esophagogastric varices bleeding ($P < 0.05$), with a nonlinear relationship (non-linear test $P < 0.05$). When $\text{TMEM16A} < 0.57$, compared with $\text{TMEM16A} = 0.57$, the risk of poor prognosis was high. However, when $\text{TMEM16A} > 0.57$, compared with $\text{TMEM16A} = 0.57$, the risk of poor prognosis was low. **Conclusion** The low level of TMEM16A in peripheral blood mononuclear cells of patients with liver cirrhosis and esophagogastric varices bleeding indicates a high risk of poor prognosis, and the detection of this level is conducive to evaluating the prognosis of patients.

【Key words】 Esophagogastric varices; Mononuclear cells; Transmembrane protein 16A; Prognosis

肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血(EGVB)的病情凶险,常危及患者生命^[1]。研究表明,首次出血的患者在 6 周内的死亡率为 15%~20%,经治疗 6 周后仍有约 20% 患者再出血,严重影响患者预后^[2]。若能预判 EGVB 或再出血情况,可有效改善患者预后。然而,目前尚缺乏有效预判 EGVB 患者再出血的指标。

跨膜蛋白 16A(TMEM16A)是一种钙激活氯通道蛋白,可参与机体的多种病理生理活动,如恶性肿瘤、腺体分泌及高血压等^[3]。研究显示, TMEM16A 可诱导高血压大鼠模型血管内皮功能障碍,从而升高血压^[4]。另有研究显示, TMEM16A 可调节门静脉高压大鼠模型门静脉平滑肌细胞增殖^[5]。基于此,推测 TMEM16A 可能通过调节门静脉平滑肌细胞,参与了 EGVB 及再出血过程。目前关于 TMEM16A 与 EGVB 患者再出血的报道较少,本文对此展开研究,以期为 EGVB 的预防及治疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 2 月至 2019 年 12 月在廊坊市第四人民医院就诊的 206 例 EGVB 患者作为研究对象。纳入标准:(1)经 B 超或 CT 等影像学检查确诊为肝硬化;(2)经胃镜检查确诊为食管胃底静脉曲张;(3)出现黑便或呕血等症状;(4)签署了知情同意书。排除标准:(1)非肝硬化导致的消化道出血;(2)合并尿毒症及血液系统疾病等;(3)合并恶性肿瘤;(4)门脉高压性胃肠病;(5)先天胆道阻塞性扩张;(6)不能配合完成研究所需检查或随访失联。206 例 EGVB 患者中男性 109 例,女性 97 例,年龄 24~76 岁,平均年龄为 (56.82 ± 9.78) 岁。本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 基本信息收集

收集患者的年龄、性别、肝硬化类型、Child-Pugh 分级、白蛋白、凝血酶原时间、国际标准化比值、MELD 评分、白细胞计数、血红蛋白、血钠及治疗方式等信息。采用电话随访及复诊等方式了解入选患者 24 个月内有无再出血发生及预后生存状况,每 3 个月随访 1 次,以 2020 年 4 月 3 日或该时间点前患者死亡作为随访终点。本研究将发生再出血及死亡定义为预后不良^[1]。

1.3 单个核细胞中 TMEM16A 表达水平检测

采用密度梯度离心法获取外周血中单个核细胞^[6]。抽取 EGVB 患者入院 24 h 内空腹外周静脉血 10 mL,置于 Ficoll 分离液中,提取单个核细胞。采用蛋白质印迹法检测单个核细胞中 TMEM16A 的表达水平^[7]。将 RIPA 裂解液滴至盛有单个核细胞的试管中提取总蛋白,然后滴加匀浆缓冲液,4 ℃ 环境下以 3 500 r/min 离心 15 min,取离心后上清液。10% SDS-PAGE 分离胶电泳(120 V, 100 min),转膜缓冲液平衡,转膜(300 mA, 60 min),然后使用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h。滴加一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜;滴加二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,曝光显影。应用 ImageJ 软件进行光密度分析。

1.4 统计学分析

应用 R 3.6.3 软件进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 logistic 回归模型分析影响 EGVB 患者预后的因素。采用限制性立方样条拟合 logistic 回归模型分析 TMEM16A 与 EGVB 患者预后的关系。

2 结果

2.1 预后良好组与预后不良组的基本资料比较

206 例 EGVB 患者中 97 例(47. 09%)预后不良,其中 72 例(34. 95%)再出血,25 例(12. 14%)死亡。根据患者的预后情况将其分为预后良好组($n=109$)和预后不良组($n=97$)。两组在年龄、性

别、肝硬化类型、凝血酶原时间、国际标准化比值和治疗方式方面比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。预后良好组 Child-Pugh 分级 B 级占比,以及白蛋白、血红蛋白和血钠水平高于预后不良组,MELD 评分和白细胞计数低于预后不良组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见表 1。

表 1 两组基本资料比较

项目	预后良好组($n=109$)	预后不良组($n=97$)	统计值	P 值
年龄/岁	56. 48 \pm 10. 25	57. 21 \pm 9. 46	$t=0. 529$	0. 597
性别/例(%)			$\chi^2=0. 199$	0. 655
男	74(67. 89)	63(64. 95)		
女	35(32. 11)	34(35. 05)		
肝硬化类型/例(%)			$\chi^2=1. 574$	0. 455
乙型肝炎	72(66. 06)	65(67. 01)		
丙型肝炎	13(11. 93)	16(16. 49)		
酒精性肝硬化	24(22. 02)	16(16. 49)		
Child-Pugh 分级/例(%)			$\chi^2=9. 126$	0. 003
B 级	69(63. 30)	41(42. 27)		
C 级	40(36. 70)	56(57. 73)		
白蛋白/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	32. 53 \pm 5. 27	29. 41 \pm 5. 32	$t=4. 223$	$<0. 001$
凝血酶原时间/s	15. 85 \pm 3. 21	15. 26 \pm 3. 15	$t=1. 328$	0. 186
国际标准化比值	1. 36 \pm 0. 29	1. 38 \pm 0. 30	$t=0. 486$	0. 627
MELD 评分/分	39. 15 \pm 12. 34	48. 33 \pm 10. 25	$t=5. 767$	$<0. 001$
白细胞计数/ $1\times10^9\cdot\text{L}^{-1}$	5. 96 \pm 3. 14	8. 85 \pm 3. 67	$t=6. 090$	$<0. 001$
血红蛋白/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	80. 06 \pm 22. 38	69. 34 \pm 21. 09	$t=3. 526$	0. 001
血钠/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	138. 50 \pm 6. 08	131. 78 \pm 5. 24	$t=8. 446$	$<0. 001$
治疗方式/例(%)			$\chi^2=1. 217$	0. 749
药物治疗	58(53. 21)	49(50. 52)		
手术治疗	41(37. 61)	42(43. 30)		
TIPSS 治疗	4(3. 67)	3(3. 09)		
硬化治疗	6(5. 50)	3(3. 09)		

注:TIPSS 为经颈静脉肝内门体支架分流术

2.2 两组 TMEM16A 表达水平比较

预后良好组 TMEM16A 表达水平为 0.62 ± 0.06 ,高于预后不良组(0.54 ± 0.04),差异有统计学意义($t=11.518,P<0.001$),见图 1。

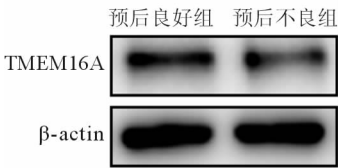


图 1 预后良好组和预后不良组的 TMEM16A 表达

2.3 影响 EGVB 患者预后的因素

将 EGVB 患者预后作为因变量,将 Child-Pugh

分级、白蛋白、MELD 评分、白细胞计数、血红蛋白、血钠和 TMEM16A 作为自变量纳入 logistic 回归模型,结果显示 Child-Pugh 分级、MELD 评分和白细胞计数是 EGVB 患者预后的独立危险因素($P<0.05$),白蛋白、血钠和 TMEM16A 是独立保护因素($P<0.05$),见表 2。

2.4 TMEM16A 与 EGVB 患者预后的关系

采用限制性立方样条拟合 logistic 回归分析 TMEM16A 与 EGVB 患者预后的关系。通过比较不同节点个数所对应的 AIC 值,最终确定节点个数为 5 时 AIC 值最小($AIC=176.356$)。分析结果表明 TMEM16A 与 EGVB 患者预后有关($\chi^2=$

46.50, $P < 0.001$), 且呈非线性关系(非线性检验 $\chi^2 = 12.67, P = 0.005$)。TMEM16A 诊断 EGVB 患者预后的最佳截断值为 0.57, 与 TMEM16A =

0.57 比较, 当 TMEM16A < 0.57 时, 预后不良风险较高; 当 TMEM16A > 0.57 时, 预后不良风险较低, 见图 2。

表 2 影响 EGVB 患者预后的 logistic 回归分析

因素	β 值	标准误	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
Child-Pugh 分级	1.025	0.489	4.531	0.031	2.728	1.093~4.975
白蛋白	-0.201	0.078	7.152	0.004	0.812	0.749~0.933
MELD 评分	2.725	0.926	7.440	0.001	6.222	2.149~12.167
白细胞计数	0.141	0.058	5.221	0.028	1.124	1.025~3.976
血红蛋白	-0.056	0.029	1.245	0.251	0.911	0.876~1.413
血钠	-0.197	0.078	6.380	0.012	0.783	0.425~0.931
TMEM16A	-0.211	0.108	7.849	< 0.001	0.426	0.287~0.882

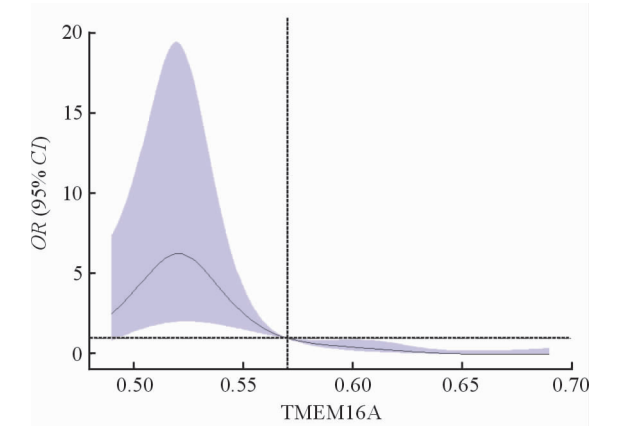


图 2 TMEM16A 与 EGVB 患者预后的限制性立方样条图

3 讨论

EGVB 是肝硬化失代偿期的严重并发症之一, 发病率和病死率均较高, 预后不良风险较高^[8-10]。EGVB 主要病因是肝硬化诱发的门静脉压升高^[11]。既往研究表明, 血管内皮功能紊乱和平滑肌细胞异常增殖与高血压关系密切^[12-13]。Ma 等^[4]研究表明 TMEM16A 可通过调节血管内皮功能降低大鼠血压。Zeng 等^[5]研究指出, TMEM16A 在胆管结扎诱导的门静脉高压大鼠模型中表达下调, 且其表达下调会促进血管平滑肌细胞增殖。由此推测, TMEM16A 可通过调节血管内皮功能及血管平滑肌细胞增殖参与 EGVB 的发生过程, 检测其水平或可评估患者预后。本研究通过比较两组外周血单个核细胞中 TMEM16A 的表达水平, 结果发现预后良好组 TMEM16A 的表达水平高于预后不良组。

既往研究表明, EGVB 患者的预后不良发生率约为 40%^[14-15], 本研究中 EGVB 患者的预后不良发生率(47.09%)与既往研究结果相近。张莉等^[2]研

究表明, Child-Pugh 分级、MELD 评分和白细胞计数是 EGVB 短期预后的危险因素, 而白蛋白、血钠是 EGVB 短期预后的保护因素。本研究通过多因素 logistic 回归分析影响 EGVB 患者预后的因素, 结果显示 Child-Pugh 分级、MELD 评分和白细胞计数是 EGVB 患者预后的独立危险因素, 而白蛋白、血钠是 EGVB 患者预后的独立保护因素, 与上述研究结果一致。此外, 本研究结果还显示, TMEM16A 是 EGVB 患者预后的独立保护因素。本研究采用限制性立方样条分析 TMEM16A 与 EGVB 患者预后的关系, 结果发现与 TMEM16A = 0.57 比较, 当 TMEM16A < 0.57 时, 预后不良风险较高; 当 TMEM16A > 0.57 时, 预后不良风险较低。提示低 TMEM16A 水平可反映血管平滑肌细胞异常增殖及血管内皮功能紊乱, 致使门静脉压升高, 最终导致食管胃底静脉曲张破裂出血。

本研究存在一些不足之处, 如单中心研究、样本例数偏少、随访时间较短等, 且仅分析了 TMEM16A 与 EGVB 短期内再出血的关系, 下一步将针对以上不足开展多中心、大样本研究, 并延长随访时间, 以验证本研究的结论。综上所述, EGVB 患者外周血单个核细胞中 TMEM16A 的表达水平低提示其预后不良风险较高, 检测其水平有助于评估患者预后。

参 考 文 献

1 陈彩霞, 胡藻. 内镜下硬化剂联合组织胶治疗食管胃底静脉曲张破裂出血后早期再出血的危险因素研究[J]. 国际消化病杂志, 2018, 38(6): 397-401.

- jejunum and ileum; imaging features and pitfalls[J]. *Abdom Radiol* (NY), 2019, 44(5): 1734-1743.
- 5 Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. Case of a successful extirpation of a fibrous tumor of the peritoneal surface of the uterus by the large peritoneal section. Washington Lemuel Atlee[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1976, 126(5): 597.
 - 6 Yen HH, Chen YY, Yang CW, et al. Diagnosis and management of jejunoileal diverticular hemorrhage; a decade of experience[J]. *J Dig Dis*, 2012, 13(6): 316-320.
 - 7 Lacz NL, Zurlo JV. Small bowel diverticulitis; an often overlooked cause of acute abdomen[J]. *Emerg Radiol*, 2010, 17(6): 497-501.
 - 8 Kouraklis G, Glinavou A, Mantas D, et al. Clinical implications of small bowel diverticula[J]. *Isr Med Assoc J*, 2002, 4(6): 431-433.
 - 9 Rondonotti E, Villa F, Mulder CJ, et al. Small bowel capsule endoscopy in 2007: indications, risks and limitations[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(46): 6140-6149.
 - 10 Marmo R, Rotondano G, Casetti T, et al. Degree of concordance between double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding: a multicenter study[J]. *Endoscopy*, 2009, 41(7): 587-592.
 - 11 Pasha SF, Leighton JA, Das A, et al. Double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy have comparable diagnostic yield in small-bowel disease: a meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008, 6(6): 671-676.
 - 12 Wu LM, Xu JR, Yin Y, et al. Usefulness of CT angiography in diagnosing acute gastrointestinal bleeding: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(31): 3957-3963.
 - 13 Yoon HM, Suh CH, Kim JR, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance enterography for detection of active inflammation in children and adolescents with inflammatory bowel disease: a systematic review and diagnostic meta-analysis [J]. *JAMA Pediatr*, 2017, 171(12): 1208-1216.
 - 14 Möschler O, May A, Müller MK, et al. Complications in and performance of double-balloon enteroscopy (DBE): results from a large prospective DBE database in Germany[J]. *Endoscopy*, 2011, 43(6): 484-489.

(收稿日期:2021-03-19)

(本文编辑:周骏)

(上接第 186 页)

- 2 张莉, 朱宏. 食管胃底静脉曲张破裂出血患者短期预后的危险与保护因素分析[J]. *西部医学*, 2015, 27(7): 996-998.
- 3 陆嘉骏, 马可, 肖庆桓. 跨膜蛋白 16A 分子结构及调控机制研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(5): 478-481.
- 4 Ma MM, Gao M, Guo KM, et al. TMEM16A contributes to endothelial dysfunction by facilitating Nox2 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species generation in hypertension[J]. *Hypertension*, 2017, 69(5): 892-901.
- 5 Zeng X, Huang P, Chen M, et al. TMEM16A regulates portal vein smooth muscle cell proliferation in portal hypertension[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 1062-1068.
- 6 赵俊伟, 时光, 平杰丹, 等. 支气管哮喘患者外周血单个核细胞 TIPE2 表达对组织因子的负调控作用[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(36): 2889-2893.
- 7 Ye G, Qin Y, Wang S, et al. Lamc1 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma cells by regulating PKM2 expression through AKT pathway[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(5): 711-719.
- 8 Pimenta JR, Ferreira AR, Fagundes ED, et al. Factors associated with bleeding secondary to rupture of esophageal varices in children and adolescents with cirrhosis[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 64(2): e44-e48.
- 9 Cárdenas A, Baiges A, Hernandez-Gea V, et al. Endoscopic hemostasis in acute esophageal variceal bleeding [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2014, 43(4): 795-806.
- 10 Qin JP, Jiang MD, Tang W, et al. Clinical effects and complications of TIPS for portal hypertension due to cirrhosis: a single center [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(44): 8085-8092.
- 11 张斌, 吴志勇. 门体分流术在治疗肝硬化食管胃底静脉曲张出血中的地位[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2019, 31(8): 456-458.
- 12 Kalacheva TP, Chernyavskaya GM, Beloborodova EI, et al. Disorders of vasoregulative endothelial function, echocardiographic assessment of myocardial dysfunction and hemodynamics of pulmonary circulation in cirrhosis of the liver [J]. *Kardiologiia*, 2016, 56(1): 41-47.
- 13 孔繁慧, 宋好, 卢畅, 等. ANO1 抑制剂对自发性高血压大鼠食管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2018, 54(3): 317-320.
- 14 谭俊, 周密, 邓勤智, 等. 经颈静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门静脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血 2 年生存分析[J]. *浙江医学*, 2019, 41(11): 1138-1142.
- 15 米日古丽·吾甫尔, 张志强, 姚萍, 等. 肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血患者预后因素分析[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(1): 73-77.

(收稿日期:2020-05-11)

(本文编辑:周骏)