

# NRG4 在克罗恩病组织中的表达及意义

朱良润 宋丽亚 张楠

**【摘要】** 目的 探究神经调节蛋白 4(NRG4)在克罗恩病(CD)组织中的表达及临床意义。方法 选择 2018 年 4 月至 2019 年 10 月在青岛市第三人民医院就诊的 97 例 CD 患者作为研究对象,另选择同期行结直肠镜检查并切除息肉的 63 例患者作为对照组。采用蛋白质印迹法检测 CD 组织中 NRG4 的表达水平;采用 CD 简化内镜评分(SES-CD)评价 CD 活动度。根据 CD 患者的预后情况将其分为早期复发组( $n=28$ )和未复发组( $n=69$ )。结果 CD 组 NRG4 的表达水平低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。轻度组、中度组和重度组 CD 患者的 NRG4 表达水平分别为  $0.90\pm0.12$ 、 $0.76\pm0.13$  和  $0.56\pm0.15$ ,3 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CD 患者的 NRG4 表达水平与 SES-CD 评分呈负相关关系( $P<0.05$ )。NRG4 诊断中、重度 CD 的 ROC 曲线下面积(AUC)、敏感度和特异度分别为 0.844、68.06%和 88.00%。NRG4 诊断 CD 早期复发的 ROC AUC、敏感度和特异度分别为 0.952、85.71%和 92.75%。多因素 logistic 回归分析结果显示,穿透型、肛周病变是 CD 早期复发的独立危险因素( $P<0.05$ )。NRG4 是 CD 早期复发的独立保护因素( $P<0.05$ )。结论 NRG4 在 CD 组织中低表达。CD 组织中 NRG4 的表达水平越低,提示患者病情越严重,CD 早期复发的风险也越高。

**【关键词】** 克罗恩病;神经调节蛋白 4;病情;早期复发

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2021.04.015

克罗恩病(CD)在欧美国家中发病率较高,近年来在中国 CD 的发病率呈升高趋势<sup>[1]</sup>。CD 是一种病因尚未完全阐明的慢性消化道炎症性疾病,主要的临床表现包括发热、腹痛、腹部包块及肛周病变等<sup>[2-3]</sup>。CD 患者的临床表现差异较大,常见表现为缓解和复发交替,部分患者可发生消化道大出血、肠梗阻、肠瘘或肠穿孔等并发症,甚至需接受肠切除手术治疗<sup>[4]</sup>。因此,尽早了解 CD 活动度及患者预后情况,密切观察并积极治疗,对于改善患者的预后具有重要意义。

神经调节蛋白 4(NRG4)是一种含有表皮生长因子类似区域的蛋白,可与表皮生长因子受体 ErbB4 特异性结合,具有刺激细胞增殖、抑制细胞凋亡等生理学功能<sup>[5-6]</sup>。研究显示,NRG4 可通过调控 Src 通路抑制坏死性小肠结肠炎肠上皮细胞凋亡,并促进肠道功能恢复<sup>[7]</sup>。此外,NRG4 与 ErbB4 特异性结合后可通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)

信号转导通路,拮抗由 TNF- $\alpha$  和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )诱导的结肠上皮细胞凋亡<sup>[8]</sup>。基于上述研究,推测 NRG4 参与了 CD 的发病及进展过程,检测其水平有助于了解 CD 活动度及患者预后情况。本文探究了 NRG4 在 CD 组织中的表达水平及临床意义,以期评估 CD 的病情及预后提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2018 年 4 月至 2019 年 10 月在青岛市第三人民医院就诊的 97 例 CD 患者作为研究对象,设为 CD 组;另选择同期行结直肠镜检查并切除息肉的 63 例患者作为对照组。根据《中国炎症性肠病组织病理诊断共识意见》<sup>[9]</sup>诊断 CD 并进行治疗。纳入标准:(1)确诊为 CD;(2)接受结直肠镜检查;(3)年龄 18~70 岁;(4)能配合完成相关检查;(5)签署了知情同意书。排除标准:(1)合并除 CD 外其他自身免疫性疾病;(2)就诊前接受过抗炎药物治疗;(3)肝、肾功能不全;(4)合并恶性肿瘤;(5)未定期复诊。CD 组中男性 53 例,女性 44 例,年龄 27~62 岁,平均年龄为  $(44.02\pm7.26)$  岁;对照组中男性

37 例, 女性 26 例, 年龄 30~55 岁, 平均年龄为  $(42.67 \pm 5.45)$  岁。两组患者在年龄 ( $t = 1.266$ ,  $P = 0.207$ )、性别 ( $\chi^2 = 0.260$ ,  $P = 0.610$ ) 方面比较, 差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准。

## 1.2 镜下活动度

采用 CD 简化内镜评分 (SES-CD) 评价 CD 活动度<sup>[10]</sup>。将肠道分为末端回肠、右半结肠、横结肠、左半结肠和直肠, 分别从溃疡大小、溃疡面积、累及肠段的面积和肠腔狭窄这 4 个方面进行评价, 单项评分为 0~3 分, 评分越高表示病情越严重。SES-CD 评分  $\leq 3$  分为 CD 缓解期, SES-CD 评分  $\geq 4$  分为 CD 活动期。CD 活动期细分为轻度、中度、重度, 其中轻度 CD 指 4 分  $\leq$  SES-CD 评分  $\leq 10$  分, 中度 CD 指 11 分  $\leq$  SES-CD 评分  $\leq 19$  分, 重度 CD 指 SES-CD 评分  $\geq 20$  分。

## 1.3 治疗方案及近期预后评估

参照《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年, 北京)》<sup>[11]</sup> 对 CD 患者进行治疗。所有患者给予常规治疗, 包括营养支持, 纠正水、电解质平衡紊乱, 保护肠道黏膜及调节肠道菌群等。此外, 根据患者病情给予糖皮质激素、免疫抑制剂或生物制剂等。

参照《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2018 年, 北京)》<sup>[11]</sup> 评估患者预后情况。临床缓解指 CD 患者临床症状消失, 经结肠镜检查显示溃疡、炎性反应均有好转或克罗恩病活动指数 (CAI) 评分  $< 150$  分; 早期复发指治疗 3 个月内, 经药物治疗进入缓解期后, CD 相关症状再次出现, 且相关炎症指标及结肠镜检查结果显示有疾病活动的证据, 或 CAI 评分升高幅度  $> 70$  分。

## 1.4 CD 组织中 NRG4 的表达水平检测

采用蛋白质印迹法检测 CD 组织中 NRG4 的表达水平<sup>[12]</sup>。将 RIPA 裂解液滴至装有 CD 组织的试管中裂解组织细胞,  $4^\circ\text{C}$  4 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 10 min, 提取上清液, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。凝胶电泳 80 V 15 min, 然后加压至 120 V, 直至溴酚蓝跑出胶面, 之后转膜、PBS 洗膜。滴加兔抗人 NRG4 单克隆抗体,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 次日滴加二抗, 室温孵育 1 h。使用 ELC 发光液显影, 应用 ImageJ 软件分析实验结果。本实验所用抗体均购自上海沪震实业有限公司。

## 1.5 统计学分析

应用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。正态

分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验; 3 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 S-N-K 检验。计数资料以例 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用 ROC 曲线评价 NRG4 诊断 CD 活动度及早期复发的效能。采用多因素 logistic 回归模型分析影响 CD 早期复发的相关因素。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NRG4 在 CD 组织中的表达

CD 组中 NRG4 的相对表达量为  $0.74 \pm 0.18$ , 低于对照组 ( $1.51 \pm 0.25$ ), 两组的差异有统计学意义 ( $t = 22.632$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2.2 NRG4 与 CD 活动度的关系

在 97 例患者中, 轻度 CD 患者 25 例 (25.77%), 中度 CD 患者 43 例 (44.33%), 重度 CD 患者 29 例 (29.90%), 分别设为轻度组、中度组和重度组。轻度组、中度组和重度组 NRG4 的相对表达量分别为  $0.90 \pm 0.12$ 、 $0.76 \pm 0.13$  和  $0.56 \pm 0.15$ , 3 组间差异有统计学意义 ( $F = 44.120$ ,  $P < 0.001$ )。其中, 轻度组 NRG4 的表达水平高于中度组和重度组, 差异有统计学意义 ( $q = 5.710$ 、 $13.075$ ,  $P < 0.05$ ); 中度组 NRG4 的表达水平高于重度组, 差异有统计学意义 ( $q = 8.874$ ,  $P < 0.05$ )。CD 患者 NRG4 的表达水平与 SES-CD 评分呈负相关关系 ( $r = -0.598$ ,  $P < 0.001$ )。NRG4 诊断中、重度 CD 患者的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为  $0.844$  (95% CI:  $0.756 \sim 0.909$ ), 最大约登指数为 0.561, 其所对应的最佳截断值、敏感度和特异度分别为 0.76、68.06% 和 88.00%, 见图 1。

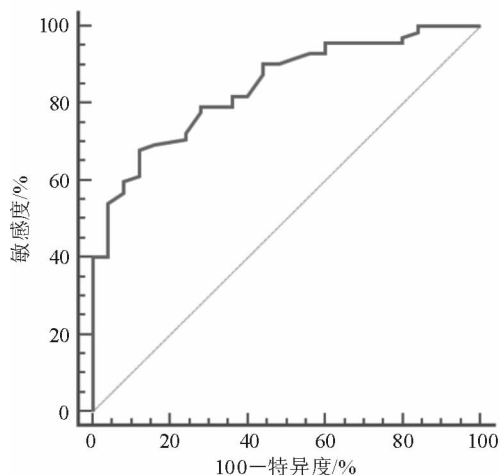


图 1 NRG4 诊断中、重度 CD 患者的 ROC 曲线

2.3 NRG4 与 CD 早期复发的关系

97 例 CD 患者经治疗后有 69 例(71. 13%)临床缓解(设为未复发组),其余 28 例(28. 87%)复发(设为早期复发组)。两组在年龄、性别、疾病类型、病变位置、C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)及首次治疗使用激素方面比较,差异均无统计学意义( $P$  均 $>0.05$ )。与未复发组比较,早期复发组合并肛周病变的比例较高,NRG4 的表达水平较低,差异均有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),见表 1。NRG4 诊断 CD 早期复发的 AUC 为 0. 952(95%CI:0. 889~0. 985),最大约登指数为 0. 785,其所对应的最佳截

断值、敏感度和特异度分别为 0. 61、85. 71% 和 92. 75%,见图 2。以  $P<0.10$  为入选标准,将疾病类型、肛周病变和 NRG4 作为自变量,将早期复发作为因变量纳入多因素 logistic 回归模型,结果显示疾病类型为穿透型[OR = 3. 702 (95%CI: 1. 845~5. 891), $P=0.010$ ]、合并肛周病变[OR = 1. 948 (95%CI: 1. 224~4. 007), $P=0.005$ ]是 CD 早期复发的独立危险因素( $P<0.05$ ),NRG4[OR = 0. 208 (95%CI: 0. 105~0. 591), $P<0.001$ ]是 CD 早期复发的独立保护因素( $P<0.05$ )。

表 1 两组的基本资料比较

项目	早期复发组( $n=28$ )	未复发组( $n=69$ )	统计值	$P$ 值
年龄/岁	43. 46 $\pm$ 7. 35	44. 25 $\pm$ 7. 26	$t=0.479$	0. 633
性别/例(%)			$\chi^2=0.100$	0. 752
男	16(57. 14)	37(53. 62)		
女	12(42. 86)	32(46. 38)		
疾病类型/例(%)			$\chi^2=5.080$	0. 079
非狭窄非穿透型	15(53. 57)	50(72. 46)		
狭窄型	7(25. 00)	6(8. 70)		
穿透型	6(21. 43)	13(18. 84)		
病变位置/例(%)			$\chi^2=0.445$	0. 801
回肠末段	5(17. 86)	9(13. 04)		
结肠	4(14. 29)	12(17. 39)		
回结肠	19(67. 86)	48(69. 57)		
肛周病变/例(%)			$\chi^2=3.860$	0. 050
有	8(28. 57)	7(10. 14)		
无	20(71. 43)	62(89. 86)		
CRP/例(%)			$\chi^2=0.001$	0. 973
$<8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6(21. 43)	15(21. 74)		
$\geq 8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	22(78. 57)	54(78. 26)		
ESR/例(%)			$\chi^2=0.022$	0. 883
$<15\text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$	11(39. 29)	26(37. 68)		
$\geq 15\text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$	17(60. 71)	43(62. 32)		
NRG4	0. 53 $\pm$ 0. 10	0. 82 $\pm$ 0. 14	$t=11.151$	$<0.001$
首次治疗使用激素/例(%)			$\chi^2=0.198$	0. 656
有	10(35. 71)	28(40. 58)		
无	18(64. 29)	41(59. 42)		

3 讨论

不同地区、人种的 CD 发病率和临床特征存在一定差异<sup>[13]</sup>。CD 的发病原因尚未完全明确,目前

多认为与遗传、环境等因素有关<sup>[14]</sup>。尽早明确 CD 的病因对于临床诊治具有重要意义。研究显示,CRP 和 ESR 判断 CD 活动度具有一定价值,但两者

的敏感度较低,且 ESR 的特异度也较低<sup>[15]</sup>。因此,仍需探究敏感度和特异度均较高的生物标志物以准确判断 CD 活动度。

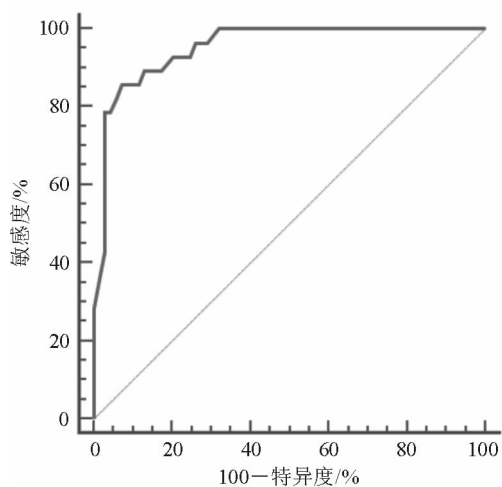


图 2 NRG4 诊断 CD 早期复发的 ROC 曲线

NRG4 基因位于人类染色体 15q24,其蛋白主要表达于棕色脂肪组织<sup>[16]</sup>。已有研究表明,NRG4 具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、抑制肝细胞脂代谢等作用<sup>[17-19]</sup>。研究显示,NRG4 与上皮细胞相关疾病关系密切,如 NRG4 可通过调控 Src 通路抑制坏死性小肠结肠炎肠上皮细胞凋亡<sup>[7]</sup>,并可通过调控 PI3K/Akt 信号转导通路拮抗由 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  诱导的结肠上皮细胞凋亡<sup>[8]</sup>。由此推测,NRG4 在 CD 组织中特异性表达,参与了 CD 的发病及进展,检测其水平可了解肠上皮黏膜细胞的凋亡情况。

本研究采用蛋白质印迹法检测 CD 组织和肠息肉组织中 NRG4 的表达水平,结果显示 CD 组织中 NRG4 的表达水平低于肠息肉组织,提示 NRG4 的表达水平可能与 CD 的发病及进展有关。本研究比较了轻度、中度、重度 CD 患者的 NRG4 表达水平,结果显示随 CD 活动度加重,CD 组织中 NRG4 的表达水平呈下降趋势,且 NRG4 的表达水平与 SES-CD 评分呈负相关关系,进一步证实 NRG4 参与了 CD 的发病及进展过程。本研究构建了 NRG4 诊断中、重度 CD 活动度的 ROC 曲线,结果显示其诊断的 AUC、敏感度和特异度分别为 0.844、68.06% 和 88.00%,这提示 NRG4 对 CD 活动度的判断具有较高价值,但敏感度较低。

CD 反复发作可诱发消化道大出血、肠瘘、肠梗阻、肠穿孔等严重并发症,必要时需采取肠切除手术治疗<sup>[20]</sup>。即使接受了肠切除手术治疗,仍有部分 CD 患者术后复发,且术后复发率较高<sup>[21]</sup>。CD 临床

缓解与复发交替不仅会诱发严重并发症,还会增高癌变风险<sup>[22]</sup>,若能及时了解复发情况,密切观察并采取有效的干预措施,可大幅降低 CD 预后不良风险。本研究构建了 NRG4 诊断 CD 早期复发的 ROC 曲线,结果显示其诊断 CD 早期复发的 AUC、敏感度和特异度分别为 0.952、85.71% 和 92.75%,这提示 CD 组织中 NRG4 的表达水平对于评估 CD 患者的近期预后具有较高价值,有助于及时采取有效的干预措施以避免 CD 复发。为进一步明确 NRG4 与 CD 早期复发的关系,本文采用多因素 logistic 回归方法分析了影响 CD 患者治疗后早期复发的相关因素,结果显示疾病类型为穿透型、合并肛周病变是 CD 早期复发的独立危险因素,NRG4 是 CD 早期复发的独立保护因素。

综上所述,NRG4 在 CD 组织中呈低表达。CD 组织中 NRG4 的表达水平越低,提示患者病情越严重,CD 早期复发的风险也越高。检测 CD 组织中 NRG4 的表达水平有助于了解患者的 CD 活动度和近期预后情况,便于及时采取针对性治疗,从而改善预后。本研究的不足之处在于随访时间较短,下一步研究将延长随访时间,以明确 NRG4 的表达水平对于 CD 患者远期预后的诊断价值。

## 参 考 文 献

- 郝晓炜,王静,相宏飞. 克罗恩病患者血清 miR-223 表达与炎症反应状态及预后的关系[J]. 国际消化病杂志, 2019, 39(4): 295-298.
- Huang Z, Liu X, Yang F, et al. Diagnostic efficacy of double-balloon enteroscopy in patients with suspected isolated small bowel Crohn's disease [J]. BMC Gastroenterol, 2020, 20(1): 42.
- Greenstein RJ, Su L, Fam PS, et al. Crohn's disease: failure of a proprietary fluorescent in situ hybridization assay to detect *M. avium* subspecies paratuberculosis in archived frozen intestine from patients with Crohn's disease[J]. BMC Res Notes, 2020, 13(1): 96.
- Meng J, Huang S, Sun C, et al. Comparison of three magnetization transfer ratio parameters for assessment of intestinal fibrosis in patients with Crohn's disease[J]. Korean J Radiol, 2020, 21(3): 290-297.
- Kocak MZ, Aktas G, Atak BM, et al. Is Neuregulin-4 a predictive marker of microvascular complications in type 2 diabetes mellitus?[J]. Eur J Clin Invest, 2020, 50(3): e13206.
- Tutunchi H, Ostadrahimi A, Hosseinzadeh-Attar MJ, et al. A systematic review of the association of neuregulin 4, a brown fat-enriched secreted factor, with obesity and related metabolic disturbances[J]. Obes Rev, 2020, 21(2): e12952.

- protects rats against chronic liver allograft dysfunction [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(27): 3537-3550.
- 15 Fan J, Chen Q, Wei L, et al. Asiatic acid ameliorates CCL<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats: involvement of Nrf2/ARE, NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , and JAK1/STAT3 signaling pathways[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3595-3605.
- 16 Wang R, Wang J, Song F, et al. Tanshinol ameliorates CCL<sub>4</sub>-

induced liver fibrosis in rats through the regulation of Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 1281-1292.

(收稿日期:2020-07-13)

(本文编辑:林磊)

(上接第 302 页)

- 7 McElroy SJ, Castle SL, Bernard JK, et al. The ErbB4 ligand neuregulin-4 protects against experimental necrotizing enterocolitis[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2768-2778.
- 8 Bernard JK, McCann SP, Bhardwaj V, et al. Neuregulin-4 is a survival factor for colon epithelial cells both in culture and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47): 39850-39858.
- 9 中华医学会病理学分会消化病理学组筹备组, 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 中国炎症性肠病组织病理诊断共识意见[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4): 268-274.
- 10 Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD[J]. *Gastrointest Endosc*, 2004, 60(4): 505-512.
- 11 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018 年, 北京)[J]. *中华消化杂志*, 2018, 38(5): 292-311.
- 12 Zheng S, Chen Y, Zheng S, et al. Inhibition of Mastermind-like 1 alleviates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(14): 1099-1108.
- 13 黄超群, 王德欣. 结肠型与非结肠型克罗恩病的预后及预后不良相关危险因素分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2018, 27(5): 518-522.
- 14 杨荣萍, 高翔, 何瑶, 等. 克罗恩病预后不良预测因素的研究 [J]. *胃肠病学*, 2012, 17(3): 151-155.
- 15 陈金敏, 周经委, 邓飞鸿, 等. 非侵入性分子标志物评估临床缓解期炎症性肠病内镜活动度价值研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2016, 36(11): 971-974.
- 16 Pfeifer A. NRG4: an endocrine link between brown adipose

tissue and liver[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(1): 13-14.

- 17 Ebi M, Kataoka H, Shimura T, et al. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma[J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(6): 1151-1155.
- 18 Feng Y, Teitelbaum DH. Epidermal growth factor/TNF- $\alpha$  transactivation modulates epithelial cell proliferation and apoptosis in a mouse model of parenteral nutrition[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(2): G236-G249.
- 19 Ma Y, Gao M, Liu D. Preventing high fat diet-induced obesity and improving insulin sensitivity through neuregulin 4 gene transfer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26242.
- 20 Af Björkstén CG, Jussila A, Kemppainen H, et al. Relationship of faecal calprotectin and long-term outcomes in Finnish patients with Crohn's disease: retrospective multi-centre chart review study[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2019, 54(10): 1226-1232.
- 21 Jørgensen AR, Thomsen SF, Karmisholt KE, et al. Clinical, microbiological, immunological and imaging characteristics of tunnels and fistulas in hidradenitis suppurativa and Crohn's disease[J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(2): 118-123.
- 22 Fennern E, Williamson J, Plietz M, et al. Surgical techniques and differences in postoperative outcomes for patients with Crohn's disease with ileosigmoid fistulas: A single-institution experience, 2010-2016[J]. *Dis Colon Rectum*, 2019, 62(10): 1222-1230.

(收稿日期:2020-05-11)

(本文编辑:周骏)