

临床论著

TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 在脊柱结核诊疗中的价值王 辉¹,王立楠¹,林剑文²,郭 乐³,蒋 丹⁴,屈昱良³,翟学峰⁵,牛宁奎⁶

(1 宁夏医科大学临床医学院 750004 银川市;2 福建省福州市福清市医院骨科 350300 福州市;3 宁夏医科大学临床医学院医学检验系 750004 银川市;4 广东医科大学医学技术学院 东莞市 523808;5 宁夏医科大学总医院病理科 750004 银川市;6 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市)

【摘要】 目的: 研究转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)、Smad2 (drosophila mothers against decapentaplegic 2)及 Smad3 在脊柱结核诊断及疗效评价中的价值。**方法:** 纳入 2018 年 9 月~2019 年 6 月在宁夏医科大学总医院治疗的确诊为脊柱结核(观察组)和椎间盘退变(对照组)患者各 35 例,分析两组患者临床资料并收集椎间盘病变组织,同时收集观察组术前、术后 6 个月和术后 1 年(分别定义为 A 组、B 组和 C 组)及对照组术前的外周血标本。提取椎间盘组织及外周血标本的 RNA,荧光定量 PCR 法扩增 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的 mRNA,免疫组化染色法检测其在椎间盘组织中的表达水平,ELISA 法测定其在外周血中的蛋白表达水平。 t 检验分析各指标在组间及组内的表达差异;ROC 曲线分析各指标单独及分别联合 ESR、CRP 诊断脊柱结核的价值;曲线回归分析各指标与脊柱结核患者临床资料的相关性。**结果:** 在椎间盘 mRNA 水平,观察组 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 表达高于对照组 ($P<0.05$)。在椎间盘蛋白水平,观察组 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 均为阳性表达,对照组均为阴性表达。在外周血 mRNA 水平,A 组 TGF- β 1 和 Smad3 表达高于对照组,B 组表达低于 A 组($P<0.01$),C 组表达低于 B 组($P>0.05$);Smad2 表达水平在组间及组内比较时均为 $P>0.05$ 。在外周血蛋白水平,A 组 TGF- β 1 表达高于对照组($P<0.01$),B 组表达低于 A 组($P<0.01$),C 组表达低于 B 组($P>0.05$);Smad2 和 Smad3 表达水平在组间及组内比较时均为 $P>0.05$ 。ROC 曲线显示外周血 TGF- β 1 mRNA、TGF- β 1 蛋白、Smad3 mRNA 单独及分别联合 ESR、CRP 诊断脊柱结核的 AUC 分别是 0.7800、0.8000、0.8352、0.8219、0.8705、0.8819、0.7410、0.7552、0.8000,敏感性分别是 93.33%、73.33%、86.67%、70.00%、90.00%、80.00%、46.67%、46.67%、80.00%,特异性分别是 54.29%、80.00%、80.00%、91.43%、88.57%、94.29%、100.00%、100.00%、85.71%(均为 $P<0.01$)。曲线回归分析表明外周血 TGF- β 1 和 Smad3 在 mRNA 水平表达呈显著正相关($R^2=0.8534$, $P<0.01$),外周血 TGF- β 1 蛋白表达水平与脊柱结核患者的年龄、病程、病变椎体数量、ESR、CRP 并无相关性。**结论:** TGF- β 1/Smads 信号通路与脊柱结核发病相关,其中 TGF- β 1/Smad3 可能发挥主要作用;外周血及椎间盘组织 TGF- β 1、Smad3 mRNA 检测可用于辅助脊柱结核诊断及疗效评价;外周血 TGF- β 1 蛋白高表达,且与预后相关,可作为脊柱结核的诊断及疗效评价指标,与 CRP 联合诊断时价值更高。

【关键词】 脊柱结核;转化生长因子 β 1;Smad2;Smad3;诊断及疗效评价

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2022.01.08

中图分类号:R529.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2022)-01-0056-11

The value of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 in the diagnosis and efficacy evaluation of spinal tuberculosis/WANG Hui, WANG Li'nan, LIN Jianwen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2022, 32(1): 56-66

【Abstract】 Objectives: To study the value of transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), Smad2 and Smad3 in the diagnosis and efficacy evaluation of spinal tuberculosis. **Methods:** Thirty-five patients diagnosed with spinal tuberculosis and treated in General Hospital of Ningxia Medical University from September 2018 to

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81860395);宁夏自然科学基金(编号:2020AAC03391);自治区卫生健康系统科研课题(编号:2019-NW-011);宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学国内一流建设学科临床医学)资助项目(编号:NXYLXK2017A05)

第一作者简介: 男(1993-),住院医师,在读医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:18309672091 E-mail:13995235848@163.com

共同第一作者:王立楠 E-mail:wanglinan117@163.com

通讯作者:牛宁奎 E-mail:niuningkui@163.com

June 2019 were enrolled in the experimental group, and another thirty-five patients diagnosed with degenerative intervertebral disc and treated in the same hospital during the same period were enrolled in the control group. The clinical information of patients in both groups were analyzed, and diseased tissues of intervertebral disc of each group of patients were collected. Besides, 35 specimens of peripheral blood of patients in the experimental group were collected before operation(group A), 6 months after operation(group B) and 1 year after operation(group C). And 35 specimens of preoperative peripheral blood in the control group were also collected. The RNA from tissues of intervertebral disc and specimens of peripheral blood were extracted, then the concentration of mRNA of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 was amplified via PCR, and the mRNA expression levels in intervertebral disc were detected via immunohistochemical staining while the expression levels of protein in blood were measured via ELISA. At last, the intragroup and intergroup differences in expressions were analyzed through *t* test, the value of independent indexes and their combined value with ESR and CRP in the diagnosis of spinal tuberculosis were analyzed by ROC curve, and the correlations of the three indexes with clinical data of patients were evaluated by curve regression. **Results:** The mRNA of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 in experimental group was higher than that of control group from the disc ($P<0.05$). TGF- β 1, Smad2 and Smad3 were positively expressed in the experimental group, and negatively expressed in the control group at the level of intervertebral disc protein. In the peripheral blood, mRNA of TGF- β 1 and Smad3 in group A was higher than that in the control group, and it in group B was lower than that in group A ($P<0.01$), in group C it was lower than that in group B ($P<0.05$), but Smad2 had no difference within groups ($P>0.05$). At the protein level, TGF- β 1 in group A was higher than that in the control group ($P<0.01$), and it in group B was lower than that in group A ($P<0.01$), and which was lower in group C than that in group B ($P<0.05$), but Smad2 and Smad3 had no difference within groups ($P>0.05$). The AUC of TGF- β 1 mRNA, TGF- β 1 protein and Smad3 mRNA in blood alone and combined with ESR or CRP respectively were 0.7800, 0.8000, 0.8352, 0.8219, 0.8705, 0.8819, 0.7410, 0.7552 and 0.8000, the sensitivity were 93.33%, 73.33%, 86.67%, 70.00%, 90.00%, 80.00%, 46.67%, 46.67% and 80.00%, respectively, the specificity were 54.29%, 80.00%, 80.00%, 91.43%, 88.57%, 94.29%, 100.00%, 100.00% and 85.71% ($P<0.01$), respectively. The mRNA of TGF- β 1 and Smad3 had positive correlation ($R^2=0.8534$, $P<0.01$), but it was not correlated with age, course of disease, number of diseased vertebrae, ESR and CRP. **Conclusions:** The TGF- β 1/Smads pathway participates the onset of spinal tuberculosis, and TGF- β 1/Smad3 may play a major role. The detection of TGF- β 1 and Smad3 mRNA in peripheral blood and intervertebral disc tissue can be used to assist the diagnosis and efficacy evaluation of spinal tuberculosis. The expression of TGF- β 1 protein in peripheral blood is highly expressed and related to prognosis. It can be used as an index for the diagnosis and efficacy evaluation of spinal tuberculosis, and it's more valuable when combined with CRP.

[Key words] Spinal tuberculosis; TGF- β 1; Smad2; Smad3; Diagnosis and efficacy evaluation

[Author's address] School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

结核病(tuberculosis,TB)是由结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*,MTB)感染引起的慢性传染病,至今仍然是威胁全球的重大公共卫生问题^[1]。结核病主要是由T淋巴细胞介导的免疫反应,多种细胞因子参与了结核病的免疫应答及免疫发病过程。转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,TGF- β)是一种多功能的多肽类细胞因子,在机体的免疫调节、细胞生长和分化、肿瘤免疫等方面均起到了重要的作用,其中TGF- β 1高度保守、生物学活性最强,是人体内的主要存在形式^[2]。在结核病中,TGF- β 1是有效的

免疫抑制剂,可通过Fas/FasL系统增强结核病患者T细胞的凋亡^[3],并使结核患者的巨噬细胞失活,其过度表达可导致结核患者的组织损伤和纤维化^[4]。据国外研究^[5,6]报道,TGF- β 1在结核病患者中的表达升高,其升高与结核病活动有密切关系。Niu等^[4]研究发现,巨噬细胞中的小干扰核糖核酸(siRNA)可沉默TGF- β 1,导致细胞内结核分枝杆菌的滴度显著降低。Warsinske等^[2]的研究也发现,在结核肉芽肿模型中敲除TGF- β 1,有利于细胞毒性T细胞的细菌清除。而Dai等^[7]用重组TGF- β 1作为刺激时可显著增加豚鼠组织中的结

核分枝杆菌载量。此外,结核分枝杆菌及其有效成分可以刺激感染部位新鲜募集的单核巨噬细胞过量表达 TGF- β 1, 刺激成纤维细胞产生并沉积胶原及其他基质成分^[3]。由此可见,TGF- β 1 的过度表达不仅与结核患者的 T 细胞免疫功能低下、巨噬细胞去活化相关联,而且与结核分枝杆菌引起的组织损伤和广泛纤维化密切相关。Peresi 等^[8]研究发现,活动性肺结核患者 TGF- β 1 表达水平升高,治疗后水平下降。上述研究充分证明 TGF- β 1 广泛参与结核病的发生、发展。查阅文献发现 TGF- β 1 对下游信号通路的调控包括依赖于 Smads (drosophila mothers against decapentaplegic)蛋白的经典通路途径和不依赖于 Smads 蛋白的非经典通路途径,其中经典途径为主要调控通路^[9]。该经典信号通路具体转导过程如下:TGF- β 1 先与胞膜上可识别它的 TGF- β II 型受体结合,并与 TGF- β I 型受体形成复合物,随后 TGF- β II 型受体磷酸化 TGF- β I 型受体,然后激活的 TGF- β I 型受体磷酸化 Smad2 和 Smad3 蛋白,最后,磷酸化的 Smad2 和 Smad3 蛋白与 Smad4 蛋白形成复合物后转移至细胞核,并与启动子区域的 DNA 序列特异性结合位点及 Smads 结合元件处的其他转录因子相互作用从而发挥生物学效应。其中 Smad2 和 Smad3 是该条信号通路上的主要受体激活性调节蛋白,上述 TGF- β 1 的多种调节作用正是通过这一途径实现^[9-13]。目前关于 TGF- β 1/Smads 信号通路在 TB 的相关性研究主要集中在肺结核,鉴于脊柱结核(spinal tuberculosis, STB)是全身结核的一部分,我们推测 TGF- β 1 经典信号通路及其相关基因也可能在 STB 的发生发展中发挥着重要作用。从目前文献资料来看,尚未有学者在 STB 中直接研究上述三个指标,故探究 TGF- β 1、Smad2 及 Smad3 在 STB 的诊断及疗效评价中的价值具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 纳入及排除标准

观察组纳入标准:①经临床表现、影像学、细菌学及病理学检查确诊的脊柱结核患者;②具有手术指征并行彻底病灶清除术;③术后予以超短程化疗并治愈;④临床随访资料完整。排除标准:①合并其他部位活动性结核;②合并影响免疫状态的疾病(如感染、创伤、肿瘤、自身免疫性疾病等)。

对照组纳入标准:①经临床表现、影像学检查确诊的腰椎间盘突出或腰椎椎管狭窄症患者;②具有手术指征并行椎间融合术;③临床资料完整。排除标准:①合并脊柱感染及活动性结核;②合并影响免疫状态的疾病(如感染、创伤、肿瘤、自身免疫性疾病等)。

1.2 研究对象及分组

根据纳入排除标准,选择 2018 年 9 月~2019 年 6 月在宁夏医科大学总医院脊柱骨科治疗的 35 例脊柱结核患者作为观察组,其中男 13 例,女 22 例,年龄 20~82 岁,平均 52.4 ± 17.4 岁。病程平均 4.7 ± 3.1 个月(1~12 个月),病变位于胸椎 17 例、胸椎+腰椎 2 例、腰椎 14 例、腰骶段 2 例,单节段受累 28 例、双节段受累 6 例、多节段受累 1 例,病变椎体数共计 81 个,合并椎旁脓肿 23 例、椎管内脓肿 3 例、左侧腰大肌脓肿 2 例,合并椎旁+椎管内脓肿、椎旁+左侧髂窝脓肿、双侧腰大肌脓肿、椎管内+腰大肌脓肿、椎旁+腰大肌脓肿各 1 例。选择同期在同科室治疗的 35 例椎间盘退变患者作为对照组,其中男 15 例,女 20 例,年龄 40~73 岁,平均 57.4 ± 10.3 岁。收集两组患者的椎间盘病变组织,同时收集观察组患者术前、术后 6 个月和术后 1 年(分别定义为 A 组、B 组和 C 组)以及对照组术前的外周血标本。两组患者的年龄、性别构成比差异均无统计学意义($t=1.445, P=0.154; \chi^2=0.238, P=0.626$)。本研究获得了宁夏医科大学总医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.3 标本及临床资料收集

将离体的椎间盘病变组织快速清洗并分割成小块,一部分置于液氮罐后迅速转移至实验室提取 RNA。一部分用于免疫组织化学染色。采集空腹静脉血 5ml,离心后小心分装血浆与血细胞,尽快行下一步实验。收集观察组患者的性别、年龄、病程、病变部位、累及节段、病变椎体数、脓肿部位及术前、术后 6 个月和术后 1 年的临床症状、神经功能情况、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)和 C 反应蛋白(c-reactive protein, CRP)、X 线、CT、MRI 信息;收集对照组患者的性别、年龄、ESR、CRP 及胸部 CT 等相关检查以用于排除感染和肿瘤等。

1.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time

PCR,qRT-PCR)检测各指标 mRNA 表达量

利用 Trizol 法(美国 Invitrogen 公司)提取椎间盘组织及外周血细胞的总 RNA,Nanodrop 2000(美国 Thermo Fisher 公司)测定 RNA 浓度后利用 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)反转录系统(日本 TaKaRa 公司)将总 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,利用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(日本 TaKaRa 公司)配制 qPCR 反应体系,以 GAPDH 为内参在荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)上测定各指标的相对表达水平,各样本进行 3 次重复实验,按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算结果。具体序列见表 1。

1.5 免疫组织化学染色定性分析各指标蛋白表达情况

椎间盘标本固定于 10%甲醛溶液,取材、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡,选用合适切片行 TGF- β 1、Smad2、Smad3 兔抗人多克隆抗体免疫组织化学染色,依据 DAB 显色试剂盒要求进行实验,显微镜定性分析。

1.6 ELISA 检测各指标蛋白表达量

人 TGF- β 1、Smad2、Smad3 ELISA 试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司,操作步骤严格遵照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件、GraphPad Prism 8.0.1 软件及 Medcalc 15.2.2 软件进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验及单因素方差分析;组间的性别构成比采用 χ^2 检验;对单项及联合检测结果作图绘制成 ROC 曲线,计算曲线下面积(AUC);采用曲线回归分析各指标表达水平与 STB 患者临床特征之间的相关性。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,以 $P<0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析

B、C 组的 ESR 和 CRP 水平较 A 组均降低,差异具有显著统计学意义 ($P<0.01$),C 组的 ESR 和 CRP 水平较 B 组略有下降,差异无统计学意义 ($P>0.05$,表 2)。观察组 35 例患者在术后 6 个月时全身及局部症状消失,神经功能情况较术前明显改善并恢复生活、工作能力,X 线、CT、MRI 示

表 1 qRT-PCR 使用的引物序列

Table 1 The primer sequences used in qRT-PCR

基因名称 Gene name	F/R	引物序列 Primer sequences
TGF- β 1	F	GGACCAGTGGGGAACACTAC
	R	AGAGTCCCTGCATCTCAGAGT
Smad2	F	GATGCCTGTTGTTTGGCCAG
	R	TCTGCCAAAGTGACAGGTCC
Smad3	F	TGCTGGTGACTGGATAGCAG
	R	GCTGCAAGGTGAAGATGTCA
GAPDH	F	CAGGAGGCATTGCTGATGAT
	R	GAAGGCTGGGGCTCATTT

表 2 观察组患者三个不同时间节点的 ESR、CRP

($n=35, \bar{x}\pm s$)

Table 2 ESR and CRP of patients in the experimental group at three different time points

指标 Index	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
ESR(mm/h)	49.26 $\pm$ 19.34	9.29 $\pm$ 3.40 ^①	8.66 $\pm$ 3.80 ^{①②}
CRP(mg/L)	29.92 $\pm$ 22.65	1.78 $\pm$ 0.68 ^①	1.37 $\pm$ 0.67 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.01$;②与 B 组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.01$; ②Compared with group B, $P>0.05$

病灶愈合良好、植骨愈合良好;术后 1 年时上述情况进一步改善。

2.2 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达水平比较

观察组椎间盘组织中的 TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达水平较对照组升高,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

外周血 TGF- β 1 mRNA 表达情况(图 2a):A、B 组较对照组表达升高,差异具有显著统计学意义(均为 $P<0.01$),C 组较对照组表达升高,差异无统计学意义($P=0.0632$),B、C 组较 A 组表达降低,差异具有显著统计学意义(均为 $P<0.01$),C 组较 B 组表达降低,差异无统计学意义($P=0.2425$)。外周血 Smad2 mRNA 表达情况(图 2b):A、B、C 各组与对照组相比及三组之间相比差异无统计学意义(均为 $P>0.05$)。外周血 Smad3 mRNA 表达情况(图 2c):A 组较对照组表达升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),B、C 组较对照组表达升高,差异无统计学意义(分别为 $P=0.2271$ 和 $P=0.9149$),B、C 组较 A 组表达降低,差异具有显著统计学意义(均为 $P<0.01$),C 组较 B 组表达降

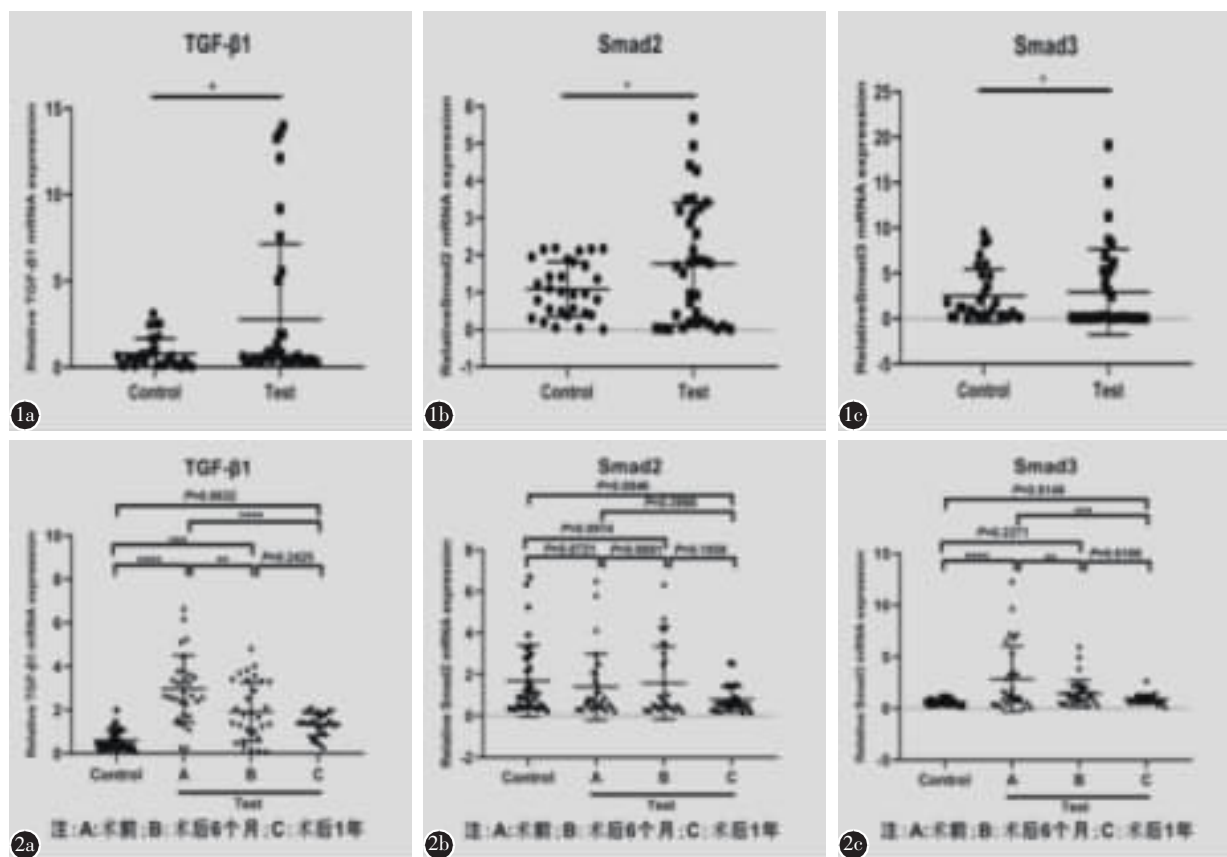


图1 各指标在椎间盘组织中的 mRNA 表达水平比较 图2 各指标在外周血中的 mRNA 表达水平比较 (a TGF-β1; b Smad2; c Smad3)

Figure 1 a-c Comparison of mRNA expression levels of various indicators in intervertebral disc tissues Figure 2 Comparison of mRNA expression levels of various indicators in peripheral blood(a TGF-β1; b Smad2; c Smad3)

低,差异无统计学意义($P=0.6166$)。

2.3 各指标在椎间盘组织中的蛋白表达水平比较

观察组 TGF-β1 蛋白表达着色于细胞胞浆,呈棕褐色染色颗粒,着色深度、着色范围均较对照组为著(图 3a,b)。观察组 Smad2 及 Smad3 蛋白表达主要着色于细胞胞浆,偶见于胞核,前者呈浅棕色染色颗粒,后者呈棕色染色颗粒,二者着色深度、着色范围均较对照组为著(图 3c~f)。

2.4 各指标在外周血中的蛋白表达水平比较

外周血 TGF-β1 蛋白表达情况(图 4a):A 组较对照组表达升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),B、C 组与对照组相比差异无统计学意义(分别为 $P=0.2967$ 和 $P=0.9879$),B、C 组较 A 组表达降低,差异具有显著统计学意义(均为 $P<0.01$),C 组较 B 组表达降低,差异无统计学意义($P=0.5123$)。外周血 Smad2 及 Smad3 蛋白表达情

况(图 4b、4c):A、B、C 各组与对照组相比及三组之间相比差异无统计学意义(均为 $P>0.05$)。

2.5 各指标单独及联合 ESR 和 CRP 对 STB 的诊断价值

外周血 TGF-β1、Smad3 对 STB 的诊断价值见图 5;外周血 TGF-β1、Smad3 分别联合 ESR、CRP 对 STB 的诊断价值见图 6;外周血各指标对 STB 的诊断价值汇总见表 3。

2.6 TGF-β1 与 STB 患者临床特征及外周血 Smad3 的相关性

曲线回归分析结果显示外周血 TGF-β1 蛋白表达水平与 STB 患者的年龄、病程、病变椎体数、ESR、CRP 均无相关性(图 7a~e);外周血 TGF-β1 mRNA 表达水平和 Smad3 mRNA 表达水平呈显著正相关(图 7f)。

3 讨论

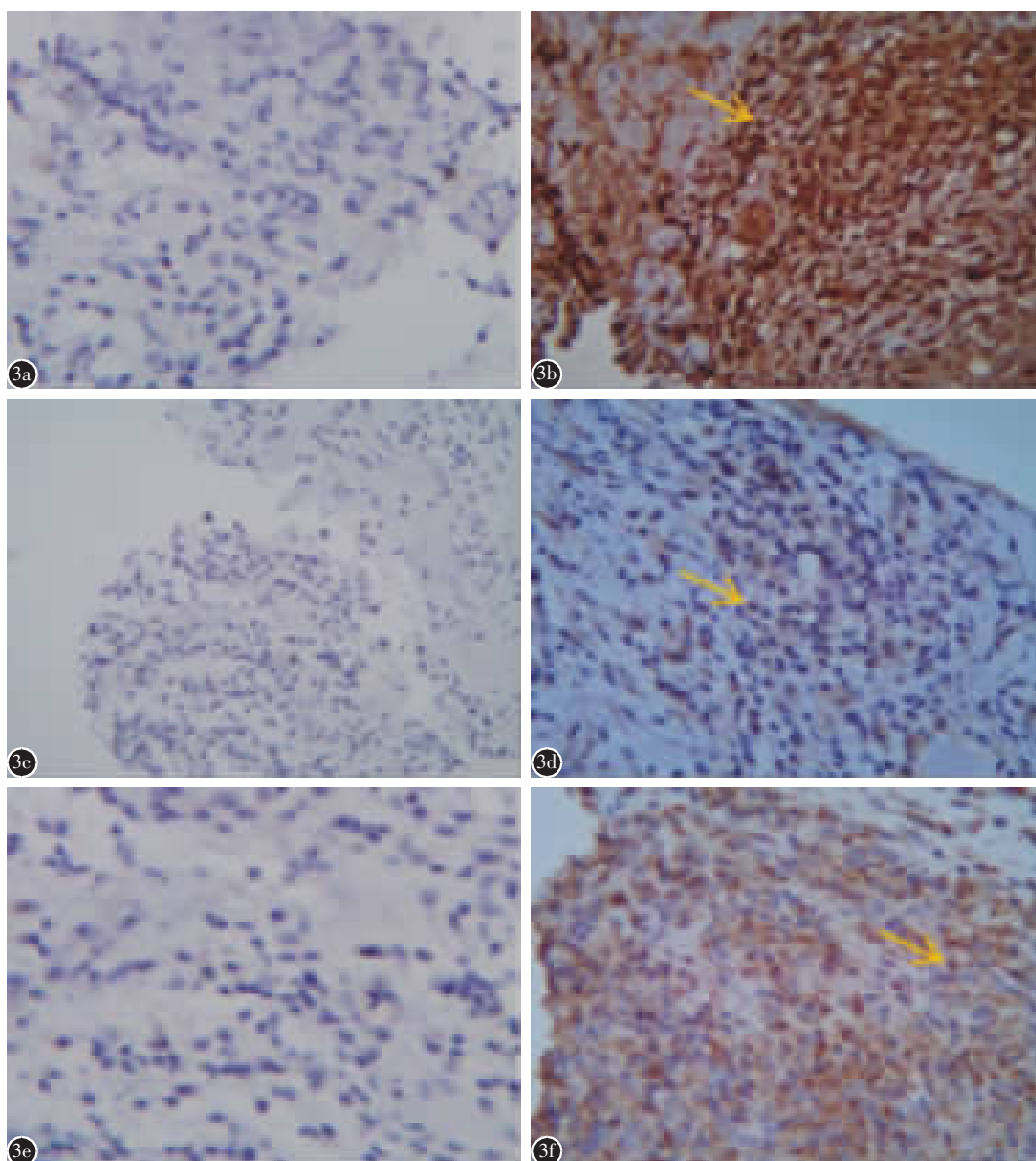


图 3 各指标在椎间盘组织中的蛋白表达水平比较 **a、b** 对照组与观察组 TGF- β 1 免疫组化染色 (HE $\times$ 200), 黄色箭头示观察组 TGF- β 1 阳性表达细胞 **c、d** 对照组与观察组 Smad2 免疫组化染色 (HE $\times$ 200), 黄色箭头示观察组 Smad2 阳性表达细胞 **e、f** 对照组与观察组 Smad3 免疫组化染色, 黄色箭头示观察组 Smad3 阳性表达细胞 (HE $\times$ 200)

Figure 3 Comparison of protein expression levels of various indicators in intervertebral disc tissues **a, b** TGF- β 1 immunohistochemical staining of the control group and the experimental group (HE $\times$ 200), the yellow arrow indicates the TGF- β 1 positive expression cell in the experimental group **c, d** Smad2 immunohistochemical staining of the control group and the experimental group (HE $\times$ 200), the yellow arrow indicates the Smad2 positive expression cell in the experimental group **e, f** Smad3 immunohistochemical staining of the control group and the experimental group (HE $\times$ 200), the yellow arrow indicates the Smad3 positive expression cell in the experimental group

STB 经过早期规范抗结核药物治疗可有 95% 的患者被治愈^[14], 但若得不到及时诊治可出现脊柱不稳、后凸畸形、脊髓和神经压迫甚至瘫痪等严重并发症^[15,16]。因此, 对 STB 患者进行早期诊治是减少并发症、改善预后和提高生活质量的关键。然

而, STB 早期症状不典型, 相关影像学特征与化脓性感染、真菌性感染、布氏杆菌性脊柱炎及脊柱肿瘤相似, 致使早期诊断面临诸多困难^[17,18]。传统的涂片抗酸染色镜检、MTB 培养、结核菌素皮肤针刺试验、血清抗结核抗体试验等诊断 STB 的价值

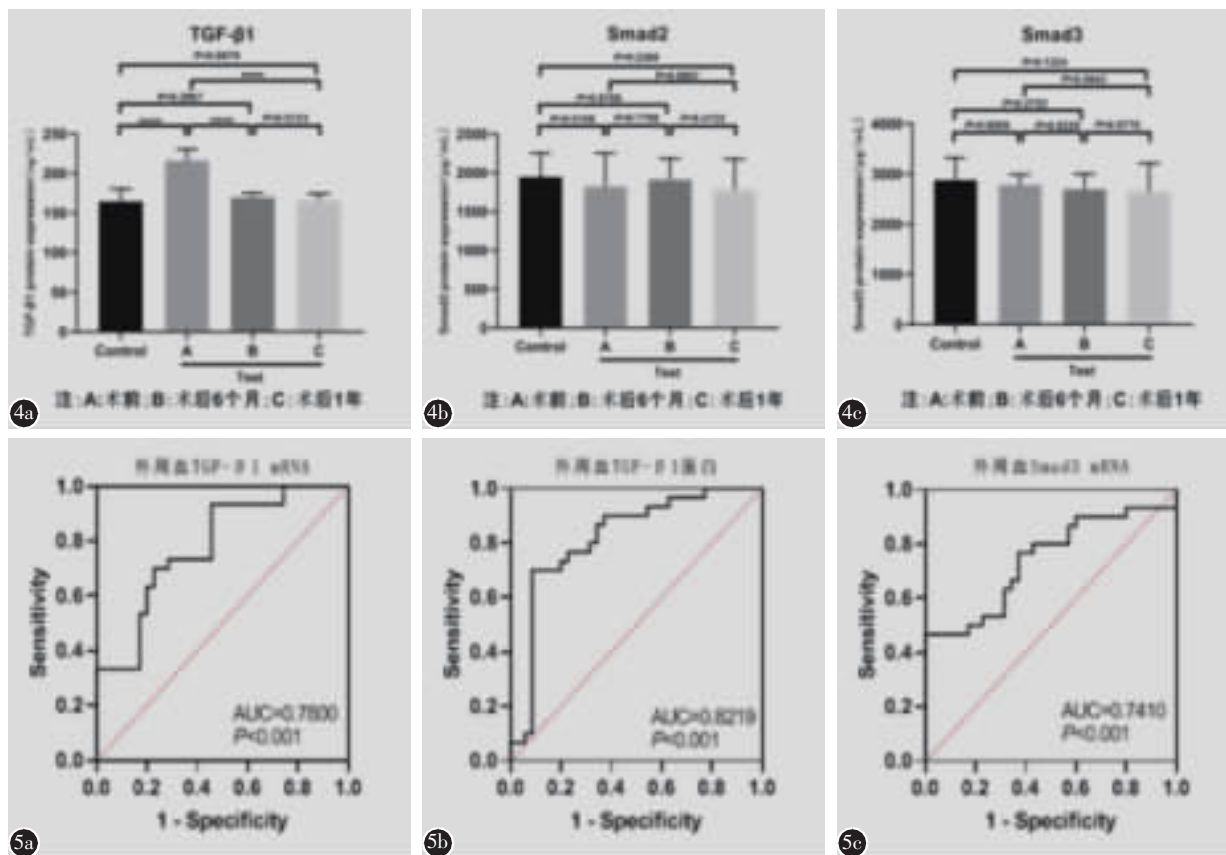


图 4 各指标在外周血中的蛋白表达水平比较(a TGF-β1;b Smad2;c Smad3) 图 5 外周血 TGF-β1、Smad3 诊断 STB 的 ROC 曲线(a TGF-β1 mRNA;b TGF-β1 蛋白;c Smad3 mRNA)

Figure 4 Comparison of protein expression levels of various indicators in peripheral blood **Figure 5** ROC curve of TGF-β1 and Smad3 in the diagnosis of STB in peripheral blood(a TGF-β1 mRNA; b TGF-β1 protein; c Smad3 mRNA)

不如诊断肺结核那般优异^[18,19]。检测病灶组织中有无 MTB 及消长情况虽然可靠,但可操作性差;PCR 法检测外周血 MTB 又存在阳性率低、无法判断 MTB 死活、假阳性或假阴性等不足^[20-23]。ESR 和 CRP 是评估 STB 感染严重程度和治疗效果的重要炎症指标,但均缺乏特异性^[24-27]。综上,目前尚缺乏诊断 STB 的特异性方法,故探究快速、简便、特异性和敏感性良好的早期诊断生物标记物是十分必要的。

相关研究表明,感染某些细菌后的宿主会在 mRNA、蛋白表达水平发生改变,通过对宿主 mRNA、蛋白表达变化的分析,可反映宿主病变的程度并确定感染的类型^[28-30]。本研究从 mRNA 及蛋白水平对 TGF-β1、Smad2、Smad3 在 STB 患者椎间盘病变组织和不同治疗阶段(术前、术后 6 个月、术后 1 年)外周血中的表达量进行检测,初步探讨其作为 STB 早期诊断分子标记物及疗效评价指标的价值,以及参与脊柱结核发病可能的作

用机制。

我们采用 qRT-PCR 法检测了 35 例 STB 椎间盘组织中 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 表达水平,与对照组比较其表达水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时,免疫组化染色定性分析结果显示上述指标在观察组椎间盘均阳性表达,而对照组均阴性表达。在椎间盘组织 mRNA 及蛋白两个水平表明 TGF-β1/Smads 信号通路参与了 STB 的发病过程。由于穿刺或手术获取椎间盘病灶标本创伤大、患者耐受性差,我们探究了外周血中各指标对 STB 的诊断价值。首先,收集 STB 患者术前、术后 6 个月及术后 1 年的外周血标本 35 份并检测上述指标在外周血中的 mRNA 表达水平,结果显示 STB 患者术前组的 TGF-β1 及 Smad3 的 mRNA 表达水平与对照组相比升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),表明其可作为 STB 潜在的诊断标志物。同时发现 STB 患者术后 6 个月和术后 1 年的外周血标本中的 TGF-β1、

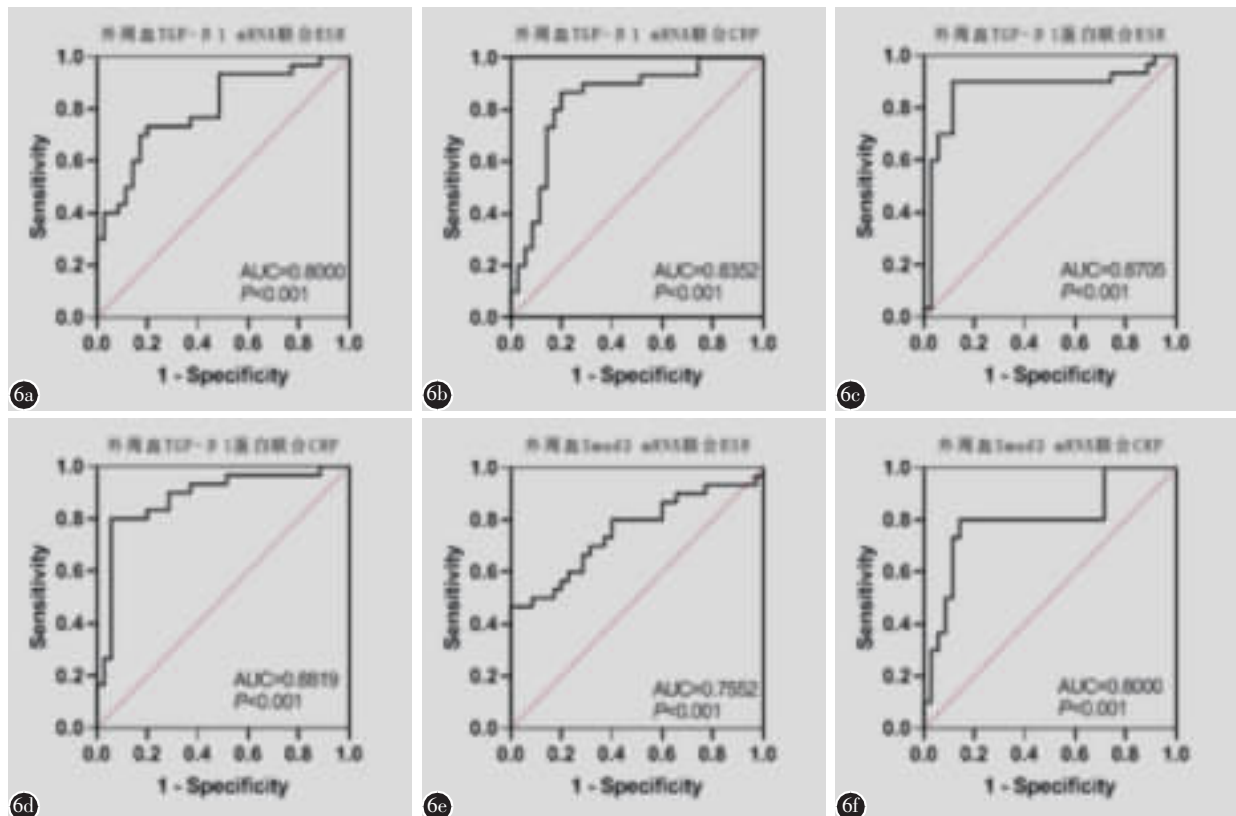


图 6 外周血 TGF- β 1、Smad3 联合 ESR、CRP 诊断 STB 的 ROC 曲线 (a TGF- β 1 mRNA+ESR; b TGF- β 1 mRNA+CRP; c TGF- β 1 蛋白+ESR; d TGF- β 1 蛋白+CRP; e Smad3 mRNA+ESR; f Smad3 mRNA+CRP)

Figure 6 ROC curve of TGF- β 1 and Smad3 combined with ESR and CRP in the diagnosis of STB in peripheral blood (a TGF- β 1 mRNA+ESR; b TGF- β 1 mRNA+CRP; c TGF- β 1 protein+ESR; d TGF- β 1 protein+CRP; e Smad3 mRNA+ESR; f Smad3 mRNA+CRP)

表 3 外周血各指标对 STB 的诊断价值汇总

指标 Index	AUC	95%CI	P	截断值 Cutoff value	敏感性(%) Sensitivity	特异性(%) Specificity
TGF- β 1 mRNA	0.7800	0.660~0.873	<0.01	0.4762	93.33	54.29
TGF- β 1 mRNA+ESR	0.8000	0.682~0.889	<0.01	0.5333	73.33	80.00
TGF- β 1 mRNA+CRP	0.8352	0.723~0.916	<0.01	0.6667	86.67	80.00
TGF- β 1 蛋白 TGF- β 1 protein	0.8219	0.707~0.906	<0.01	0.6143	70.00	91.43
TGF- β 1 蛋白+ESR/TGF- β 1 protein+ESR	0.8705	0.764~0.941	<0.01	0.7587	90.00	88.57
TGF- β 1 蛋白+CRP/TGF- β 1 protein+CRP	0.8819	0.778~0.949	<0.01	0.7429	80.00	94.29
Smad3 mRNA	0.7410	0.617~0.842	<0.01	0.4667	46.67	100.00
Smad3 mRNA+ESR	0.7552	0.633~0.853	<0.01	0.4667	46.67	100.00
Smad3 mRNA+CRP	0.8000	0.682~0.889	<0.01	0.6571	80.00	85.71

Smad3 mRNA 表达水平较术前均下降,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),且术后 1 年的表达水平与术后 6 个月相比差异无统计学意义 ($P>0.05$),并接近对照组的表达水平,二者相比差异无统计学意义 ($P>0.05$),表明 TGF- β 1、Smad3 mRNA 亦可作为 STB 的疗效评价指标。采用 ROC

曲线进一步分析 TGF- β 1、Smad3 mRNA 在 STB 患者外周血中作为诊断标志物的价值,结果显示 TGF- β 1 mRNA 的 AUC 为 0.7800,当截断值为 0.4762 时,敏感性为 93.33%,特异性为 54.29%; Smad3 mRNA 的 AUC 为 0.7410,当截断值为 0.4667 时,敏感性为 46.67%,特异性为 100.00%。

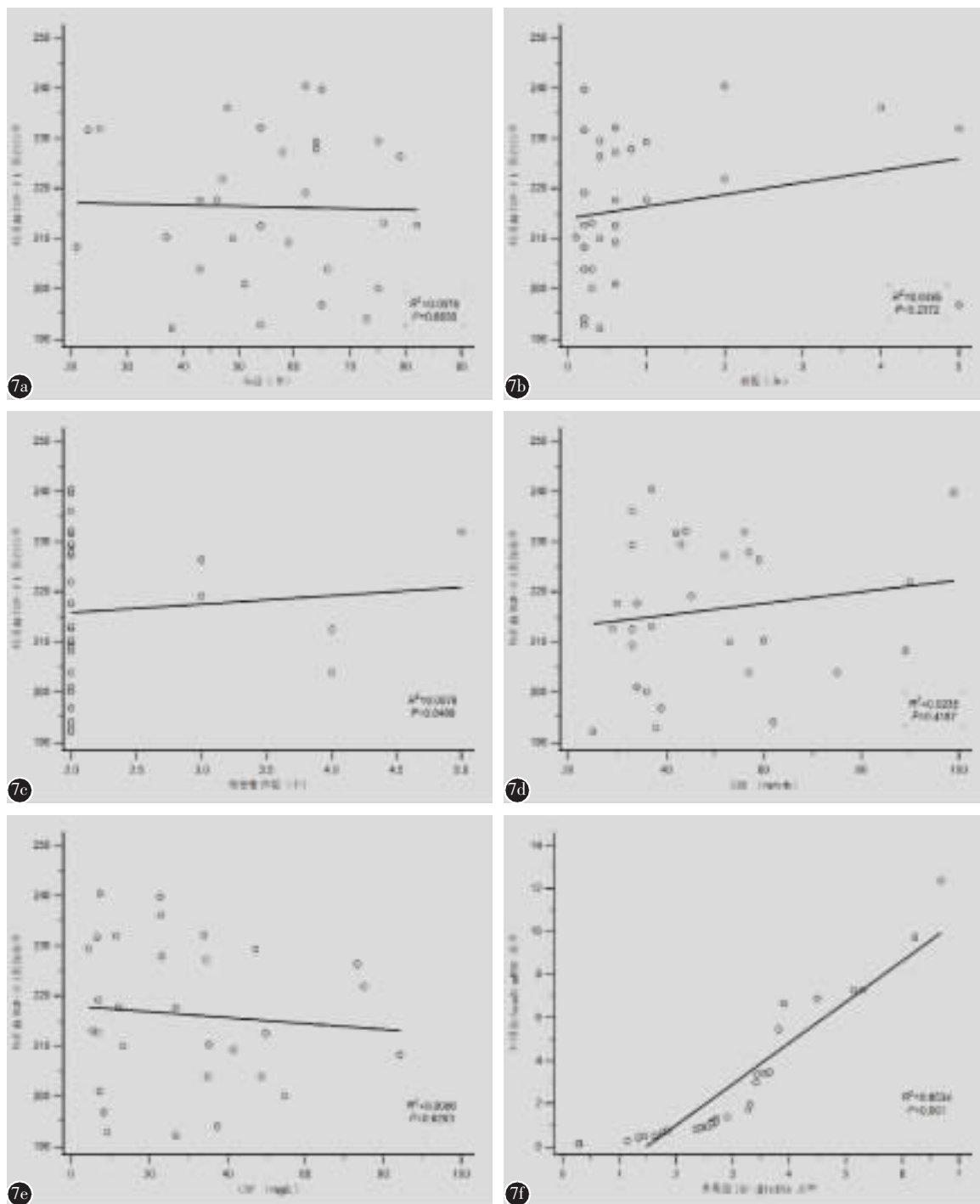


图 7 a~f TGF-β1 与 STB 患者临床特征及 Smad3 的相关性

Figure 7 a~f The correlation between TGF-β1 and STB patients' clinical characteristics and Smad3

显而易见, TGF-β1 mRNA 对 STB 具有更高的诊断价值, 但特异性较差。ESR 和 CRP 是评估 STB 感染严重程度和治疗效果的重要炎症指标, 有研究表明多种指标联合诊断时可进一步提高疾病的诊断率^[31], 故我们将 TGF-β1、Smad3 mRNA 同 ESR、CRP 进行协同 ROC 曲线分析, 结果显示联

合诊断后能明显提高诊断的特异性或敏感性。其中, TGF-β1 mRNA 联合 CRP 的诊断价值最好, AUC 为 0.8352, 当截断值为 0.6667 时, 敏感性为 86.67%, 特异性为 80.00%。

由于自然界普遍存在 RNA 酶, 单链 mRNA 很容易被降解^[32], 故而以 mRNA 表达水平作为诊

断指标时稳定性较差。因此,我们进一步采用 ELISA 法检测了 STB 患者不同治疗阶段外周血浆中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的蛋白表达情况,结果显示 STB 患者术前外周血中仅有 TGF- β 1 蛋白表达水平较对照组升高,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),而 Smad2 和 Smad3 蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。有研究发现许多物种和细胞在同一基因位点编码的 mRNA 和蛋白的表达水平并不存在严格的相关性,即使相关时也与状态有关^[33],而且 Smads 蛋白是 TGF- β 家族从细胞膜受体到细胞核的胞内信号转导分子^[13],主要在胞内发挥作用,以上可能是其在外周血浆中变化不明显的原因。以上结果表明,外周血 TGF- β 1 蛋白可作为 STB 的潜在诊断标志物,采用 ROC 曲线进一步分析其诊断价值,结果显示 AUC 为 0.8219,当截断值为 0.6143 时,敏感性为 70.00%,特异性为 91.43%。同时发现 STB 患者术后 6 个月和术后 1 年外周血中的 TGF- β 1 蛋白表达水平较术前下降,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),且术后 1 年的表达水平与术后 6 个月的表达水平相比差异无统计学意义($P>0.05$),并接近对照组的表达水平,表明 TGF- β 1 蛋白亦可作为 STB 的疗效评价指标。将 TGF- β 1 蛋白与 ESR、CRP 进行协同 ROC 曲线分析,结果显示 TGF- β 1 蛋白联合 CRP 的诊断价值最好, AUC 为 0.8819,当截断值为 0.7429 时,敏感性为 80.00%,特异性为 94.29%,且优于 TGF- β 1 mRNA 联合 CRP 的诊断价值。进一步将 TGF- β 1 蛋白表达水平与 STB 患者的部分临床特征进行相关性分析,结果显示其与 STB 患者的年龄、病程、病变椎体数、ESR、CRP 均无相关性($P>0.05$)。TGF- β 1 和 Smad3 在 STB 患者术前外周血的 mRNA 水平均高表达,相关性分析结果显示二者呈显著正相关($R^2=0.8534, P<0.01$)。TGF- β 1 被证实具有抗炎作用,主要是通过 Smad3 来发挥其抗炎作用,间接说明了 Smad3 在 TGF- β 1/Smads 经典信号通路中处于重要位置^[34,35],TGF- β 1/Smad3 可能是 STB 发病的主要信号通路。

值得一提的是,由于我院腰椎峡部裂或胸腰椎爆裂骨折患者中无法获得足够数量的正常椎间盘标本,本次研究以退变椎间盘组织进行替代。查阅文献发现 TGF- β 1/Smad 信号通路亦参与了椎间盘退变疾病的发生发展过程。朱兆华等^[36]应用

免疫组化染色法对退变性腰椎滑脱症患者椎间盘和腰椎爆裂性骨折患者正常椎间盘中 TGF- β 1 和 Smad3 表达水平进行测定,发现退变间盘组 TGF- β 1 和 Smad3 表达水平显著高于正常间盘组 ($P<0.01$)。本研究最终筛选出外周血 TGF- β 1 mRNA、Smad3 mRNA 和 TGF- β 1 蛋白可作为辅助 STB 诊断及疗效评价的新指标,而前期检测发现 STB 椎间盘组织中 TGF- β 1 和 Smad3 mRNA 表达水平均高于退变间盘组,结合朱兆华等的研究可推测 STB 椎间盘中二者的表达水平亦明显高于正常椎间盘,故我们认为用退变椎间盘替代正常椎间盘并不会对本研究的结论造成根本影响,同时可与退变间盘性疾病进行鉴别诊断,而与 ESR、CRP 及影像学检查等传统方法联合使用时则更有助于 STB 诊断。

然而,本次研究样本数量有限,仍需进一步扩大样本量来验证目前的研究成果。

4 参考文献

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 [M]. Geneva: World Health Organization, 2020.
2. Warsinske HC, Pienaar E, Linderman JJ, et al. Deletion of TGF- β 1 increases bacterial clearance by cytotoxic T cells in a tuberculosis granuloma model[J]. Front Immunol, 2017, 8: 1843.
3. Zhai W, Wu F, Zhang Y, et al. The immune escape mechanisms of mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 340.
4. 牛宁奎, 吴龙云, 何进文, 等. HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体对体外 BCG 感染的人巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(10): 918-924.
5. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, et al. What is transforming growth factor-beta(TGF-beta)[J]. Br J Plast Surg, 2001, 57(3): 215-221.
6. Niemczyk M, Foroniewicz B, Mucha K. The role of TGF beta [J]. Pol Arch Med Wewn, 2005, 113: 401-408.
7. Dai G, McMurray DN. Effects of modulating TGF-beta 1 on immune responses to mycobacterial infection in guinea pigs[J]. Tuber Lung Dis, 1999, 79: 207-214.
8. Peresi E, Silva SM, Calvi SA, et al. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis [J]. J Bras Pneumol, 2008, 34(11): 942-949.
9. Cai H, Su S, Li Y, et al. Protective effects of Salvia miltiorrhiza on adenine-induced chronic renal failure by regulating the metabolic profiling and modulating the NADPH oxidase/ROS/ERK and TGF-beta/Smad signaling pathways [J]. J

- Ethnopharmacol, 2018, 212: 153–165.
10. Sureshababu A, Syed MA, Boddupalli CS, et al. Conditional overexpression of TGF- β 1 promotes pulmonary inflammation, apoptosis and mortality via TGF β R2 in the developing mouse lung[J]. Respir Res, 2015, 16(1): 4.
 11. Lin E, Kuo P, Liu Y, et al. Transforming growth factor- β signaling pathway associated genes Smad2 and TGF β R2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13589.
 12. Singh M, Vaughn C, Sasaninia K, et al. Understanding the relationship between glutathione, TGF- β , and Vitamin D in combating mycobacterium tuberculosis infections[J]. J Clin Med, 2020, 9(9): 2757.
 13. Tecalco-Cruz AC, Rios-Lopez DG, Vazquez-Victorio G, et al. Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease[J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3(1): 15.
 14. Lee KY. Comparison of pyogenic spondylitis and tuberculous spondylitis[J]. Asian Spine J, 2014, 8(2): 216–223.
 15. Niu N, Wang Q, Shi J, et al. Clinical and genomic responses to ultra-short course chemotherapy in spinal tuberculosis [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 1681–1688.
 16. 施建党, 刘园园, 王骞, 等. 病椎固定治疗胸、腰椎结核的疗效分析[J]. 中华骨科杂志, 2016, 36(11): 681–690.
 17. Khanna K, Sabharwal S. Spinal tuberculosis: a comprehensive review for the modern spine surgeon[J]. Spine J, 2019, 19(11): 1858–1870.
 18. Chen CH, Chen YM, Lee CW, et al. Early diagnosis of spinal tuberculosis[J]. J Formos Med Assoc, 2016, 115(10): 825–836.
 19. Chatterjee S, Banta A. The spectrum of tuberculosis of the spine in pediatric age group: a review[J]. Childs Nerv Syst, 2018, 34(10): 1937–1945.
 20. Yuen KY, Chan KS, Chan CM, et al. Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction assay[J]. J Infection, 1997, 34(1): 29–33.
 21. Del PR, Mosca A, D'Alagni M, et al. Detection of mycobacterium tuberculosis DNA in blood of patients with acute pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-isotopic hybridisation assay[J]. J Med Microbiol, 1997, 46(6): 495–500.
 22. Crump JA, Tuohy MJ, Morrissey AB, et al. Performance of nucleic acid amplification following extraction of 5 milliliters of whole blood for diagnosis of mycobacterium tuberculosis bacteremia[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 138–141.
 23. 牛宁奎. 超短程化疗对脊柱结核患者外周血基因表达谱变化的研究[D]. 天津医科大学, 2016.
 24. Ren HL, Jiang JM, Wang JX, et al. Is duration of preoperative anti-tuberculosis treatment a risk factor for postoperative relapse or non-healing of spinal tuberculosis[J]. Eur Spine J, 2016, 25(12): 3875–3883.
 25. Dunn RN, Ben HM. Spinal tuberculosis: review of current management[J]. Bone Joint J, 2018, 100-B(4): 425–431.
 26. 吕贵何, 宗治贤, 陈祝明, 等. 脊柱结核的发病机制、诊断及治疗相关进展[J]. 系统医学, 2019, 4(2): 174–177.
 27. Kim JH, Ahn JY, Jeong SJ, et al. Prognostic factors for unfavourable outcomes of patients with spinal tuberculosis in a country with an intermediate tuberculosis burden: a multi-centre cohort study[J]. Bone Joint J, 2019, 101-B(12): 1542–1549.
 28. Korma W, Mihret A, Chang Y, et al. Antigen-Specific cytokine and chemokine gene expression for diagnosing latent and active tuberculosis[J]. Diagnostics, 2020, 10(9): 716.
 29. Farsida, Shabariah R, Hatta M, et al. Relationship between expression mRNA gene Treg, Treg, CD4(+), and CD8(+) protein levels with TST in tuberculosis children: a nested case-control[J]. Ann Med Surg(Lond), 2021, 61: 44–47.
 30. Cao D, Wang J, Ji Z, et al. Profiling the mRNA and miRNA in peripheral blood mononuclear cells in subjects with active tuberculosis[J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 4223–4234.
 31. Yang Y, Zhang H, Zhang M, et al. Elevation of serum CEA and CA15-3 levels during antitumor therapy predicts poor therapeutic response in advanced breast cancer patients [J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 7549–7556.
 32. Liu H, Lu G, Wang W, et al. A panel of CircRNAs in the serum serves as biomarkers for mycobacterium tuberculosis infection[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1215.
 33. Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, et al. Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells[J]. Cell, 2012, 151(3): 671–683.
 34. Liu H, Dong F, Li G, et al. Liuweiwuling tablets attenuate BDL-induced hepatic fibrosis via modulation of TGF- β /Smad and NF- κ B signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 210: 232–241.
 35. Van DAG, Beuningen HM, Vitters EL, et al. Interleukin 1 β -induced SMAD2/3 linker modifications are TAK1 dependent and delay TGF β signaling in primary human mesenchymal stem cells[J]. Cell Signal, 2017, 40: 190–199.
 36. 朱兆华, 申才良, 张建湘, 等. TGF- β 1 和 Smad3 在退变性腰椎滑脱症患者椎间盘中的表达及其相关因素分析[J]. 安徽医药, 2013, 17(2): 219–222.

(收稿日期:2021-06-09 末次修回日期:2021-11-06)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 彭向峰)