

变应性鼻炎冲击免疫治疗血清差异蛋白表达及机制研究*

江银丽¹ 朱新华¹ 唐思艺¹ 吴兆坤¹ 雷鹏太¹ 刘月辉¹

[摘要] 目的:检测单纯尘螨过敏的变应性鼻炎(AR)患者 6 d 冲击免疫治疗(RIT)前后相关血清差异蛋白的表达。并对筛选出的 CRP、CTHRC1 与 WDR89 三种表达明显差异蛋白进行检测及鉴定,分析并探讨此 3 种差异蛋白在 AR 的 RIT 中的免疫调节作用及意义。**方法:**收集 AR 患者、RIT 患者及健康对照组血清标本分别为 15 例、15 例、10 例,对本标本进行等重同位素多标签相对定量蛋白组学技术(iTRAQ)研究,利用二维凝胶电泳及质谱分析确定相关差异蛋白,再利用 Cluster3.0 软件及 Java TreeView 软件对所筛选的差异蛋白的合理性进行检验及验证。最后,采用酶联免疫吸附法(ELISA)对筛选出的 CRP、CTHRC1 与 WDR89 蛋白进行鉴定。**结果:**本研究检测到蛋白质总数为 893 个,发现并确认了 53 个差异蛋白。AR 组与健康对照组相比较,差异有统计学意义(差异倍数 >1.2 且 $P<0.05$)的差异性表达蛋白有 24 个,与 AR 的发生密切相关,其中表达上调的 10 个,表达下调的 14 个;RIT 组与 AR 组相比较,差异有统计学意义(差异倍数 >1.2 且 $P<0.05$)的差异性表达蛋白有 29 个,与 RIT 增量阶段的作用相关,其中表达上调的 12 个,表达下调的 17 个。与健康对照组相比较,AR 组表达上调且进行 6 d 的 RIT,表达下调的蛋白质有 CTHRC1、WDR89;与健康对照组相比,AR 组表达下调且进行 6 d 的 RIT,表达上调的蛋白质有 CRP。采用 ELISA 对筛选出的 CRP、CTHRC1 与 WDR89 蛋白进行鉴定,发现 CTHRC1 与 WDR89 差异表达在 AR 及 RIT 方面差异有统计学意义($P<0.05$),而血清 CRP 的差异表达在 AR 及 RIT 方面差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**CTHRC1 与 WDR89 和 AR 发病密切相关,并在 RIT 中起到一定的调节作用,而血清蛋白 CRP 在 AR 及 RIT 中无明显作用。

[关键词] 鼻炎,变应性;冲击免疫治疗;iTRAQ;蛋白组学;差异蛋白

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.08.003

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Study on expression and mechanism of serum differential proteins after rush immunotherapy of allergic rhinitis

JIANG Yinli¹ ZHU Xinhua¹ TANG Siyi¹ WU Zhaokun¹ LEI Pengtai¹ LIU Yuehui¹
(Department of Otolaryngology and Head Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, 330006, China)

Corresponding author: ZHU Xinhua, E-mail: zhuxinhua2003@126.com

Abstract Objective: To detect the expression of differentially expressed proteins in serum of patients with allergic rhinitis who were allergic to dust mites before and after 6-day rush immunotherapy. The three differentially expressed proteins, CRP, CTHRC1 and WDR89, were detected and identified. The immunoregulatory effects and significance of these three differentially expressed proteins in rush immunotherapy of allergic rhinitis were analyzed and discussed. **Method:** The serum samples of 15 patients with allergic rhinitis, 15 patients with rush immunotherapy and 10 patients with healthy control group were collected. The samples were studied by isobaric tags for relative and absolute quantitation(iTRAQ) technique. The related differential proteins were determined by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, and the rationality of the screened differential proteins was tested and verified by Cluster3.0 software and Java TreeView software. Finally, the selected CRP, CTHRC1 and WDR89 proteins were identified by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Result:** In this study, 893 proteins were detected and 53 differential proteins were identified. Compared with healthy control group, 24 proteins which was statistically significant were found in allergic rhinitis group, which were closely related to the occurrence of allergic rhinitis, including 10 up-regulated proteins and 14 down-regulated proteins. Compared with the allergic rhinitis group, patients with allergic rhinitis underwent 6 days of rush immunotherapy. There were 29 proteins whose expression of proteins with a difference of P value of less than 0.05 and 1.2 times higher, which were related to the effect after the incremental phase of rush immunotherapy was completed, of which 12 were up-regulated and 17 were down-regulated. Compared with healthy control group, the expression of up-regulated of al-

*基金项目:国家自然科学基金项目(No:81860184);江西省优势科技创新团队专项计划(No:S2016RCTDB0016);江西省卫生计生厅项目计划(No:20155338);江西省教育厅项目计划(No:190077)

¹南昌大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科(南昌,330006)

通信作者:朱新华, E-mail: zhuxinhua2003@126.com

lergic rhinitis group and the expression of down-regulated protein after 6 days of rush immunotherapy were CTHRC1, WDR89; Compared with healthy control group, AR group was down-regulated and the expression of up-regulated protein after 6 days of rush immunotherapy was CRP. CRP, CTHRC1 and WDR89 proteins were identified by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and it was found that the differential expression of CTHRC1 and WDR89 in AR and RIT was statistically significant ($P < 0.05$), but the differential expression of serum CRP in AR and RIT was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** Serum protein CTHRC1 and WDR89 are closely related to the pathogenesis of allergic rhinitis, and played a role in the regulation of rush immunotherapy, while serum protein CRP has no significant effect on AR and RIT.

Key words rhinitis, allergic; rush immunotherapy; iTRAQ; proteomics; differential protein

变应性鼻炎(AR)是一种 I 型非感染性慢性炎症性疾病,主要由暴露于变应原后的鼻黏膜中的 IgE 介导。它是最常见的变应性疾病之一,目前影响了全球超过 40% 的人口。中国一般成年人群中 AR 的标准化患病率已经由 2005 年的 11.1% 升至 2011 年的 17.6%,不同地区有显著的变化^[1-2]。AR 长期迁延,是哮喘、慢性阻塞性肺疾病、心脑血管疾病等系统慢病的源头性疾病,其对患者的日常生活、学习和工作造成不良影响及严重的经济压力和心理负担。

国内外多项研究显示变应原特异性免疫治疗(allergen specific immunotherapy, ASIT)是目前发现的唯一针对病因且可通过调节免疫机制使疾病的自然进程发生改变并最终达到临床治愈 AR 的一线治疗方法^[3-7],治疗结束后仍能维持较长的疗效。目前 ASIT 对 AR 免疫调节机制作用的研究已有大量文献报道,但其作用机制仍未明确,且缺乏长期疗效的明确预测指标。特别是冲击免疫治疗(rush immunotherapy, RIT)在增量阶段完成后,其免疫调节作用机制如何更未阐明。因此,筛选高灵敏度且有效的血清标志物,并在疾病早期寻找干预措施及免疫治疗后的预测疗效指标等,已成为目前临床工作研究的迫切需要。

目前,生命科学的发展已进入后基因组时代,定量蛋白质组学技术使蛋白质组学研究更加深入^[8]。蛋白质组学是 20 世纪提出的分析蛋白质间相互作用和蛋白质功能的科学。而蛋白质是生命活动的直接参与者,其与免疫机制的变化有紧密联系。本课题应用定量蛋白组学方法中的等重同位素多标签相对定量蛋白组学技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)对健康对照组、AR 组及 RIT 组进行血清蛋白组学研究,使用质谱分析筛选出特异的差异蛋白质,并使用 Cluster 3.0 软件及 Java TreeView 软件对经质谱鉴定后的差异蛋白质进行生物信息学分析中的聚类分析,检验所选取的差异表达蛋白质的合理性和准确性,并对发现并筛选出有统计学意义的差异表达蛋白进行验证,初步探讨其在 RIT 中的作用及其意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

15 例 AR 患者(AR 组)均为我科门诊经检查确诊的患者,均住院行 RIT(RIT 组),并排除心肺肝肾疾病及全身性疾病,其中男 9 例,女 6 例;年龄 7~43 岁,平均(19.60 ± 11.08)岁。AR 组诊断均参照 AR 诊断和治疗指南(2015 年,天津)^[9],患者有鼻塞、鼻痒、阵发性打喷嚏及清水样鼻涕症状中的两项或者更多项症状,每日持续或累计在 1 h 以上,可伴有眼红、流泪和眼痒等眼部症状,且全部病例屋尘螨和粉尘螨点刺试验 $\geq ++$,均未进行免疫治疗及任何药物治疗,其一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in the first second, FEV1)大于预测值 70%,检测前 2 周内未使用类固醇激素,并排除伴有其他疾病,如鼻息肉、慢性鼻窦炎、支气管哮喘、分泌性中耳炎、OSA、阿司匹林相关性鼻炎及鼻中隔偏曲等。RIT 组已自愿接受标准化屋尘螨变应原疫苗,为皮下注射 RIT 增量阶段 6 d 后的患者。10 例健康对照组来自该医院的门诊健康体检者,均无家族及个人过敏史,且均无变态反应性疾病史及其他全身系统性疾病,其中男 7 例,女 3 例;年龄 24~51 岁,平均(32.50 ± 9.16)岁。ELISA 验证:另外选取并收集 11 例健康志愿者,40 例 AR 患者及 15 例 RIT 6 d 患者的外周全血,患者均来自我科门诊就诊及住院患者。纳入标准同第 1 部分。其中健康对照组 11 例中,男 6 例,女 5 例,年龄 24~58 岁,平均(33.55 ± 10.00)岁;AR 组中,男 26 例,女 14 例;年龄 6~58 岁,平均(18.52 ± 11.72)岁;RIT 组中,男 9 例,女 6 例;年龄 7~43 岁,平均(19.60 ± 11.08)岁。所有患者或监护人均签署知情同意书,本研究方案获我院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 AR 患者的 RIT 剂量累加阶段方案 所有患者使用的变应原制剂均是丹麦 ALK 公司生产的标准化屋尘螨变应原疫苗进行 RIT^[7,10-11]。剂量累加阶段有 4 种不同浓度分别为:100、1000、10 000、100 000 SQ/mL,分别对应 1、2、3、4 号瓶。RIT 剂量累加阶段方案具体为:第 1 天:1 号瓶 0.1 mL;2 号瓶 0.1 mL;3 号瓶 0.1 mL;第 2 天:3 号瓶

0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL; 第3天: 3号瓶 0.8 mL; 4号瓶 0.1 mL, 0.2 mL; 第4天: 4号瓶 0.3 mL, 0.4 mL; 第5天: 4号瓶 0.5 mL, 0.5 mL; 第6天: 4号瓶 1.0 mL。

1.2.2 血清样本收集 对健康对照组及2个实验组的所有患者均在空腹时抽取5 mL的静脉血, 然后置于室温下30 min, 4℃下以3 000 r/min离心15 min, 取其上清液, 在4℃下以3 000 r/min离心5 min, 提取各组血清标本, 在30 min内混合, 并分装至1 mL的EP管内, 置于-80℃冰箱快速冻存。

1.2.3 去除血清高丰度蛋白 取适量样本, 采用对应物种的去血清高丰度亲和色谱柱 Agilent Multiple Affinity Removal LC Column-Human14 试剂盒, 对应 protocol 中的操作方法去除血清中白蛋白、IgG 等14种高丰度蛋白质, 得到低丰度组分溶液。并使用紫外检测280 nm和214 nm。应用5 kD超滤管进行超滤浓缩, 加入一倍体积的SDT裂解液, 以沸水浴10 min, 以转速为14 000 g离心15 min, 取上清液。

1.2.4 总蛋白浓度的测定 采用BCA法进行蛋白质定量。分装样品, -80℃保存。①配置BCA反应液: 将BCA试剂A与BCA试剂B按50:1体积比混匀(每个样品用量200 μL); ②取12联条检测条(碧云天, FST012)置于检测板上, 在适量孔中各加入200 μL混合好的BCA反应液; ③加入标准品和待测样品: 前5个孔分别加入2 μL BSA蛋白标准品(浓度分别为0 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL), 后面孔中依次加入2 μL待检测的蛋白溶液样品, 枪头搅拌混匀液体; ④37℃孵育0.5 h; ⑤使用酶标仪570 nm测定蛋白浓度, 绘制标准曲线, 计算蛋白样本浓度。

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 将蛋白样品与6 X SDS-PAGE蛋白上样缓冲液按5:1的比例混匀, 然后按电泳操作说明方法进行电泳及染色、脱色。

1.2.6 超滤管酶解^[12] 各样品取蛋白质溶液30 μL, 分别加入DTT至终浓度为100 mmol/L, 以沸水浴5 min, 后冷却至室温。加入UA buffer 200 μL进行混匀, 转入30 kD超滤离心管中, 以12 500 g离心25 min, 弃去滤液。加入IAA buffer 100 μL, 以600 r/min振荡1 min, 在室温条件下进行30 min避光反应, 以12 500 g离心25 min。加入100 μL UA buffer, 以12 500 g离心15 min, 对该步骤重复2次。加入100 μL 10倍稀释的Dissolution buffer, 以12 500 g进行离心15 min, 对该步骤重复2次。加入Trypsin buffer 40 μL(4 μg Trypsin in 40 μL Dissolution buffer), 以600 r/min振荡1 min, 在37℃的环境下放置16~18 h。更换新的收集管, 以12 500 g离心15 min; 再加入

20 μL Dissolution buffer, 以12 500 g进行离心15 min, 收集滤液, 肽段定量。

1.2.7 相对和绝对定量的等量异位标签标记 按照AB SCIEX公司2004年iTRAQ标记试剂盒说明书进行标记。

1.2.8 高PH反相分级 将每组标记后的肽段进行混合, 采用Agilent 1260 infinity II HPLC系统进行分级、洗脱, 收集洗脱组分约36份。样品冻干后, 用0.1% FA复溶合并为10份。

1.2.9 质谱分析 ①Easy nLC色谱: 每份样品以纳升流速Easy nLC系统进行分离。②质谱鉴定: 样品先经色谱分离, 再进行质谱分析: Q-Exactive Plus质谱仪。分析时长是60 min, 检测方式为正离子, 母离子扫描范围为350~1 800 m/z, 一级质谱分辨率为70 000, AGC target为3e6, 一级Maximum IT为50 ms。多肽和多肽碎片的质量电荷比的采集: 每次全扫描后采集10个碎片图谱, MS2 Activation Type为HCD, 二级质谱分辨率17 500, Isolation window为2 m/z, Microscans为1, Normalized Collision Energy为30eV, 二级Maximum IT为45 ms。

1.2.10 质谱原始数据处理 ①质谱原始文件处理: 本研究使用高分辨质谱仪Q Exactive Plus进行iTRAQ定量蛋白质组学分析。使用Proteome Discoverer 2.1软件将Q Exactive Plus产生的原始图谱文件转化为.mgf文件, 通过软件内置的工具提交到MASCOT2.6服务器进行数据库检索。然后再通过Proteome Discoverer 2.1将MASCOT服务器上形成的查库文件传回软件, 对数据进行筛选(标准: FDR<0.01), 获得高度可信的定性结果。②数据库选择: 本研究所使用的数据库为Uniprot_HomoSapiens_20386_20180905。③蛋白质定性和定量分析参数: 蛋白质组学定性分析中的金标准: MASCOT, 本课题采用MASCOT 2.6进行数据库搜索。在定量分析过程中, 本课题采用Proteome Discoverer 2.1软件对肽段报告离子峰强度值进行抽提, 并对定量值进行归一化处理。

1.2.11 蛋白质聚类分析 聚类分析时, 对目标蛋白质集合的定量信息进行归一化到(-1, 1)区间。其次, 使用Cluster 3.0软件同时对2个维度: 样品和蛋白质的表达量进行分类。最后, 使用Java TreeView软件生成层次聚类热图。

1.2.12 酶联免疫吸附试验 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测CRP、CTHRC1与WDR89, 严格按照CRP、CTHRC1与WDR89试剂盒说明书进行操作。

1.2.13 结果计算与判断 以OD值为横坐标, 标准物的浓度为纵坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线, 据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度, 再乘

以稀释倍数;或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism7 统计软件进行分析。CTHRC1、WDR89 与 CRP 的 ELISA 结果均不服从正态分布,故使用 GraphPad Prism7 中的单因素(一维分组)—多组—One-way ANOVA(and Non-parametric)—不服从正态分布—非参检验—Kruskal-Wallis 检验方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白质样本质检结果

定量以及 SDS-PAGE 结果显示蛋白质质量好,总量足够,且样本间平行性较好;蛋白预质谱显示酶解正常,色谱质谱行为正常。

2.2 质谱鉴定和定量结果评估

是质谱平台对质谱实验的一个评估,相当于正式实验的质控。本研究此次质谱的正式实验是成功的。

2.3 蛋白质定量结果

2.3.1 AR 组与健康对照组的蛋白质组差异表达图谱 与健康对照组相比,AR 组有 10 个差异蛋白表达上调(表达差异倍数 > 1.2 倍且 $P < 0.05$),14 个差异蛋白表达下调[(表达差异倍数 $< 1/1.2$

(0.83)倍且 $P < 0.05$)]。

2.3.2 RIT 组与 AR 组的蛋白质组差异表达图谱

与 AR 组相比,RIT 组有 12 个差异蛋白表达上调(表达差异倍数 > 1.2 倍且 $P < 0.05$),17 个差异蛋白表达下调[(表达差异倍数 $< 1/1.2$ (0.83)倍且 $P < 0.05$)]。

通过对比,我们发现 AR 组与健康对照组相比有显著表达差异的蛋白质,上调(10 个差异蛋白质):CTHRC1、WDR89、POSTN、ARPC4、PLIN3、PRG2、SYNE2、NPM1、LYVE1、RECK;下调(14 个差异蛋白质):CRP、SDR9C7、PLA2G7、MDN1、HPR、KRT36、GRID2、APOM、XPNPEP2、AP-OD、SEMA4D、HCLS1、CDHR2、TCN2;RIT 组与 AR 组相比有显著表达差异的蛋白质,上调(12 个差异蛋白质):CRP、DSP、REEP6、APOC3、SAA1、ORM2、APCS、GHR、DDX60、HEXB、CAMP、CPQ;下调(17 个差异蛋白质):CTHRC1、WDR89、RNASE4、LAMP2、CFHR2、CCL14、PPIC、FABP1、ALB、FCGR3B、LAMA1、ABCA1、TBC1D1、JCHAIN、GAPDH、HRK、HMGB2。与健康对照组相比,AR 组表达上调,且与 AR 组相比,RIT 组表达下调的差异蛋白质有 2 个:CTHRC1(图 1)、WDR89(图 2);与健康对照组相比,AR 组表达下调,且与 AR 组相比,RIT 组表达上调的差异蛋白质有 1 个:CRP(图 3)。

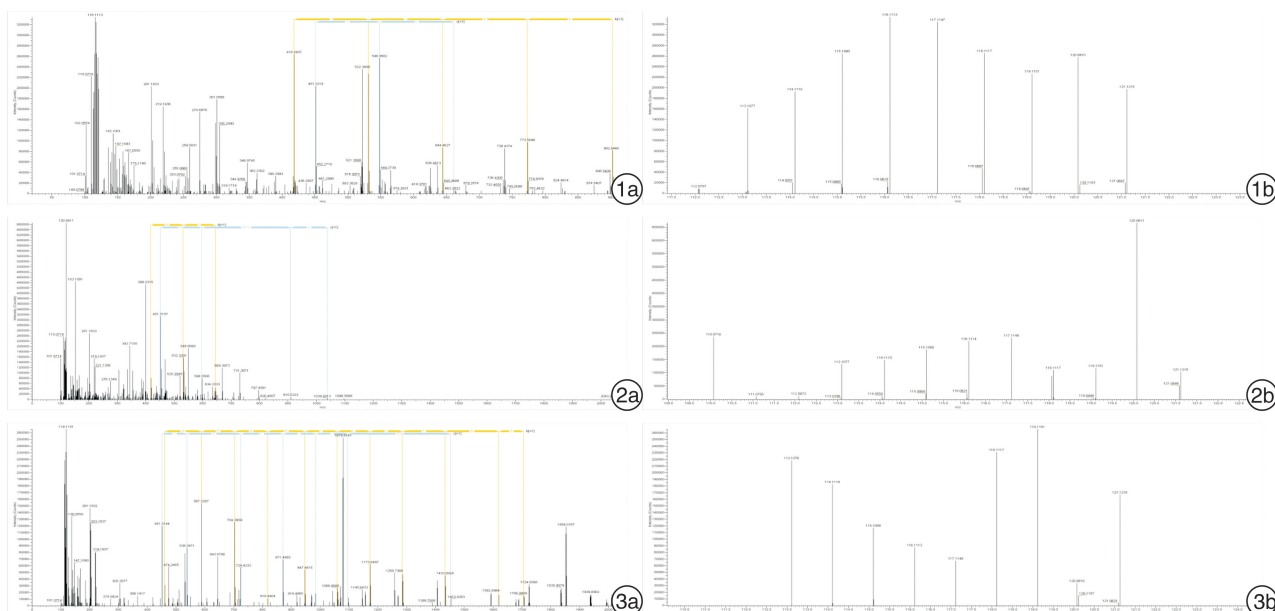


图 1 血清 CTHRC1 肽段 1a:串联质谱进行肽段测序结果;1b:不同 iTRAQ 标签对肽段进行定量结果(健康对照组-iTRAQ113、114;AR 组-iTRAQ115、116、117;RIT 组-iTRAQ118、119、121); 图 2 血清 WDR89 肽段 2a:串联质谱进行肽段测序结果;2b:不同 iTRAQ 标签对肽段进行定量结果(健康对照组-iTRAQ113、114;AR 组-iTRAQ115、116、117;RIT 组-iTRAQ118、119、121); 图 3 血清 CRP 肽段 3a:串联质谱进行肽段测序结果;3b:不同 iTRAQ 标签对肽段进行定量结果(健康对照组-iTRAQ113、114;AR 组-iTRAQ115、116、117;RIT 组-iTRAQ118、119、121)。

2.4 生物信息分析

蛋白质聚类分析(Clustering):笔者将经质谱鉴定后所筛选出的差异蛋白汇入 Cluster3.0 软件及 Java TreeView 软件进行聚类分析,生成层次聚类热图(图 4)。

图 4a:AR 组(B 表示)、健康对照组(A 表示)的相对丰度经 Z-score 标准化后将蛋白质分为两大类,一类为在 AR 组中表达上调而在健康对照组中表达下调,说明这些蛋白可能在 AR 发生中起上调作用,另一类则与之表现相反。图 4b:RIT 组(C 表示)、AR 组的相对丰度经 Z-score 标准化后将蛋白质分为两大类,一类为在 RIT 组中表达上调而在 AR 组中表达下调,说明这些蛋白可能在 RIT

6 d 后起上调作用,另一类则与之表现相反。

2.5 ELISA 检测血清中 CRP、CTHRC1 与 WDR89 的含量的测定

血清中 CRP 的表达量:与健康对照组相比,AR 组其表达量差异无统计学意义($P>0.05$);与 AR 组相比,RIT 组其表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。血清中 CTHRC1 的表达量:与健康对照组相比,AR 组其表达差异有统计学意义($P<0.0001$);与 AR 组相比,RIT 组其表达差异有统计学意义($P<0.0001$)。血清中 WDR89 表达量:与健康对照组相比,AR 组其表达差异有统计学意义($P<0.0001$);与 AR 组相比,RIT 组其表达差异有统计学意义($P<0.0001$)。见图 5。

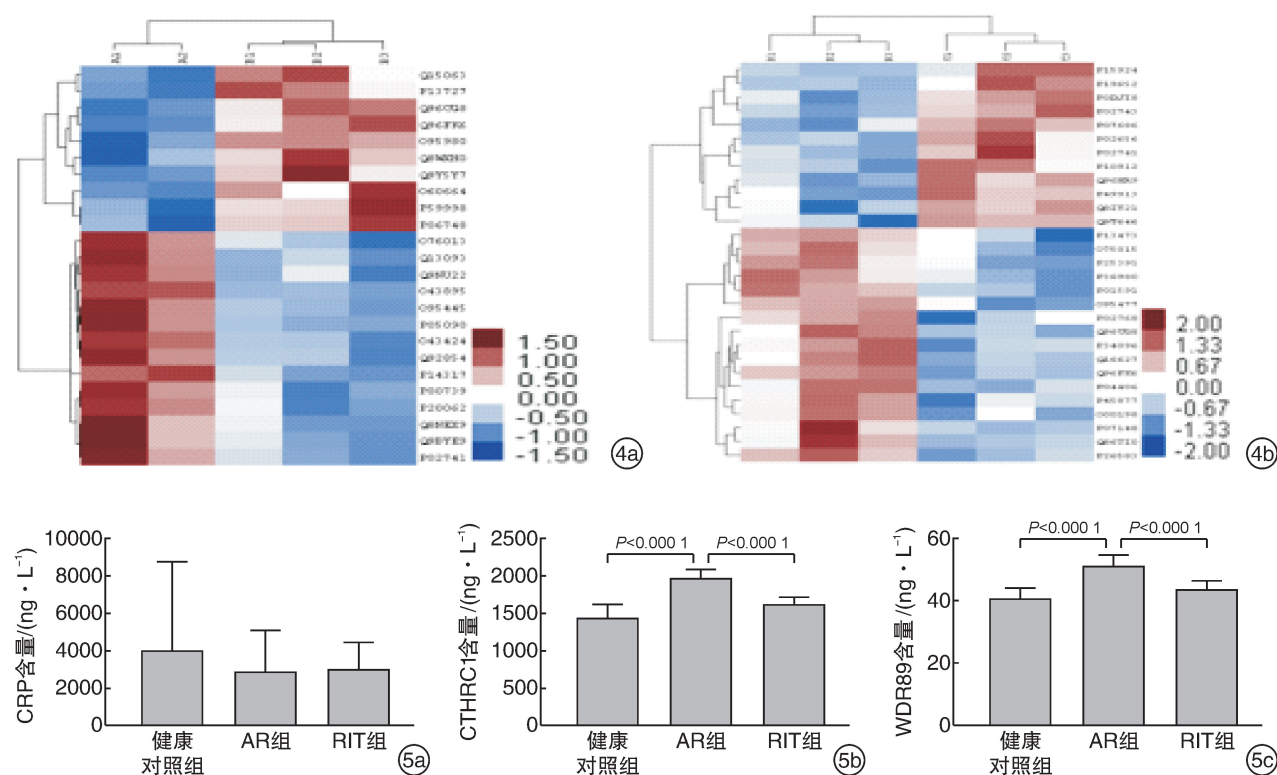


图 4 层次聚类热图 4a:蛋白质聚类分析结果(B vs A); 4b:蛋白质聚类分析结果(C vs B); 红色代表上调的蛋白质,蓝色代表下调的蛋白质,白色代表无明显变化; 图 5 血清中 CRP(5a)、CTHRC1(5b)与 WDR89(5c)的表达量

3 讨论

蛋白质是生命活动的直接参与者,其与免疫机制的变化有紧密联系。蛋白质组学是分析蛋白质间相互作用和蛋白质功能的科学,而定量蛋白质组学技术使蛋白质组学研究更加深入^[8]。本研究利用 iTRAQ 进行差异蛋白研究,发现并鉴定到 893 个蛋白质,共确认了 53 个差异蛋白。通过进一步对比分析,我们发现 CTHRC1、WDR89 及 CRP 这 3 种蛋白在 AR 中有差异表达,且给予短时间内大剂量屋尘螨变应原疫苗 RIT 之后,表达也有差异,表明此 3 种差异蛋白可能在 AR 的发病及 RIT 的作用机制中起到一定的作用,但经 ELISA 验证后,

CTHRC1、WDR89 这 2 个蛋白差异有统计学意义,而 CRP 蛋白不具有统计学意义。

CTHRC1 编码一种可能通过参与血管重塑在动脉损伤的细胞反应中发挥作用的蛋白。该基因突变与 Barrett 食管和食管腺癌有关。许多研究表明 CTHRC1 在实体肿瘤中高度上调,如黑色素瘤、非小细胞肺癌等。CTHRC1 表达在肿瘤和自身免疫性疾病(类风湿性关节炎)的发病机制中起到一定作用^[13]。

然而,目前 CTHRC1 在 AR、哮喘及其相关免疫治疗方面在国内外尚未见报道。本研究结果发现:CTHRC1 在 AR 的发病中可能起到一定的免

疫调节作用,而经过 RIT 增量阶段后,其表达量明显降低,显示 RIT 可能通过抑制 CTHRC1,从而控制 AR 的症状。说明 AR 患者治疗前后血清中 CTHRC1 的含量变化,可能作为一种 RIT 或 SCIT 的治疗效果的预测参考指标。

WDR 蛋白家族(Trp-asp repeat protein family)是含有多个保守 WD 基序(WD motif)且广泛存在于真核生物中的蛋白质类。目前已知多种 WDR 蛋白在肿瘤细胞中异常表达。其中 WDR 蛋白家族中的 WDR66 可能是食管鳞状细胞癌危险分层的有用生物标志物。WDR66 表达可能作为上皮细胞的间质转化的正性调节剂,在食管鳞状细胞癌的生长和侵袭中,发挥着重要作用。此外, WDR66 可能是治疗鳞状细胞癌的新型药物靶标^[14]。Kannan 等^[15]认为 WD40-重复序列(WDR)蛋白家族为研究 WDR 蛋白在微管神经元调节和自噬中的意义提供了一个起点。

WDR89(WD 重复结构域 89)是蛋白质编码基因,其在淋巴结、甲状腺等 25 种组织中的表达普遍存在,而其目前相关临床应用研究尚不多见,且 WDR89 在 AR、哮喘及其相关免疫治疗方面在国内外尚未见报道。本研究结果表明 WDR89 可能在 AR 的发生发展过程中起到一定的作用,而经过 RIT 增量阶段完成后,其表达量明显降低,表明 RIT 可能通过抑制 WDR89,从而控制 AR 的症状。说明 AR 患者血清中 WDR89 的含量变化亦可能作为预测 RIT 治疗效果的预测参考指标。

CRP 首先被鉴定为急性炎症患者血清中,与肺炎球菌结合蛋白的碳水化合物抗体反应的物质,是肝脏合成的五聚体,其水平随炎症升高而升高。该基因编码的蛋白质属于 pentaxin(穿透素)家族。在组织损伤、感染或其他炎性刺激的急性期反应期间,该蛋白在血浆中的水平显著增加。有研究表明 CRP 与组胺水平、哮喘急性发作、变应性炎症状态、哮喘的严重程度和控制程度有关^[16-19]。Ra 等^[20]研究发现高灵敏度 CRP 作为小气道炎症标志物的可能性。

然而,本研究中,在 AR 及 RIT 的验证过程中差异表达出现无意义的结果,可能因免疫机制调节作用的复杂性及本研究中的样本量不多,或许还有一些未知的其他原因。因此针对 CRP 在 AR 及 RIT 中的应用研究尚需进一步更深入细致的工作。

综上所述,本研究结果发现 AR 患者及 RIT 前后 CTHRC1 与 WDR89 比较差异有统计学意义,而此 2 种蛋白在 AR 及哮喘方面尚未见报道,而 CRP 在本研究验证中却未发现具有统计学意义的结果。本研究在 AR 免疫治疗特别是 RIT 方面进行了初步探讨。由于本研究例数尚不多,因此需要

进一步加大病例数进行更深入细致的研究。是否 CTHRC1 与 WDR89 这两种蛋白在 AR 相关免疫治疗中作为预测指标及其相关作用机制,尚需进一步深入细致研究。

参考文献

- [1] Cheng L, Chen JJ, Fu QL, et al. Chinese Society of Allergy Guidelines for Diagnosis and Treatment of Allergic Rhinitis [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2018, 10(4): 300-353.
- [2] Wang XD, Zheng M, Lou HF, et al. An increased prevalence of self-reported allergic rhinitis in major Chinese cities from 2005 to 2011 [J]. Allergy, 2016, 71(8): 1170-1180.
- [3] Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(2): 358-368.
- [4] Jutel M, Agache I, Bonini S, et al. International consensus on allergy immunotherapy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(3): 556-568.
- [5] 程雷. 特异性免疫治疗是变应性鼻炎的一线疗法 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2016, 30(4): 1-2.
- [6] Jutel M, Kosowska A, Smolinska S. Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2016, 8(3): 191-197.
- [7] 朱新华. 变应性鼻炎冲击免疫治疗的临床应用 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2017, 31(3): 13-17.
- [8] Zhang C. Proteomic Studies on the Development of the Central Nervous System and Beyond [J]. Neurochem Res, 2010, 35(10): 1487-1500.
- [9] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2015 年, 天津) [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 51(1): 6-6.
- [10] Tabar AI, Echechipia S, García BE, et al. Double-blind comparative study of cluster and conventional immunotherapy schedules with Dermatophagoides pteronyssinus [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(1): 109-118.
- [11] Cox LS. Shooting for a faster approach to the immunotherapy target: will cluster become conventional? [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2009, 102(3): 177-178.
- [12] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [13] Wu Q, Yang Q, Sun H. Role of collagen triple helix repeat containing-1 in tumor and inflammatory diseases. [J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13(4): 621-624.
- [14] Wang Q, Ma C, Kemmner W. Wdr66 is a novel marker for risk stratification and involved in epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 137.

格拉斯哥受益量表中文版的效度和信度评价*

沈颖¹ 肖丽丽¹ 罗琼¹ 冯艳梅¹ 郑重¹

[摘要] 目的:对格拉斯哥受益量表中文版(C-GBI)进行效度和信度评价。方法:通过问卷访谈形式对 98 例耳鼻咽喉科疾病患者在手术或其他医疗干预后进行受益评估,用内容效度、结构效度(包括探索性因子分析及验证性因子分析)、内部一致性、折半信度等对格拉斯哥受益量表中文版的效度和信度进行评价。结果:C-GBI 由 3 个维度 18 项条目组成,有良好的内容效度。运用主成分分析法对量表进行因子分析,提取出 3 个公因子,问题 10 出现因子错误对应,予以删除。调整后的 C-GBI 3 个公因子旋转后累积方差贡献率达 70.32%,每个条目在其对应公因子上的载荷系数均大于 0.4,且具有良好的聚合效度和区分效度。信度方面,调整后的 C-GBI 各维度及总体的 Cronbach α 系数、Spearman-Brown 系数及 Guttman Split-Half 系数均大于 0.6。结论:C-GBI 虽有一个条目在结构效度分析中存在因子错误对应,但删除该项后的量表仍具有良好的效度和信度,可作为临床上对耳鼻咽喉科疾病患者在医疗干预后受益情况的评价指标。

[关键词] 耳鼻咽喉科学;格拉斯哥受益量表;医疗干预;效度;信度

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.08.004

[中图分类号] R76 **[文献标志码]** A

Evaluation of the validity and reliability of the Chinese version of Glasgow Benefit Inventory

SHEN Ying XIAO Lili LUO Qiong FENG Yanmei ZHENG Zhong

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital; Otolaryngology Institute of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233, China)

Corresponding author: FENG Yanmei, E-mail: feng.yanmei@126.com

Abstract Objective: To evaluate the validity and reliability of the Chinese version of Glasgow Benefit Inventory. **Method:** Using the Chinese version of Glasgow benefit inventory(C-GBI) to evaluate how the otorhinolaryngological(ORL) interventions have altered the quality of life of 98 cases of ORL department and analyze the validity and reliability of the test results, which is assessed by content validity, construct validity, internal consistency and split-half reliability. **Result:** The results show that the C-GBI has 3 dimensions and 18 items. The content validity of C-GBI is acceptable. Three factors were extracted by exploratory factor analysis. Since item No. 10 matched Factor 3 in error, we decided to delete it after discussions. After this adjustment, exploratory factor analysis yielded with an three-factor solution, explaining 70.32% of the total variance and the loading coefficient for each of the 17 C-GBI questions is above 0.4. The results also show good convergent validity and discriminant validity. Reliability using Cronbach α , Spearman-Brown and Guttman Split-Half was higher than 0.6 for total score and its three subscales of the adjusted C-GBI. **Conclusion:** After deleting one item of the C-GBI which matched

*基金项目:国家自然科学基金(No:81771015);申康“促进市级医院临床技能与临床创新三年行动计划”(No:16CR4027A);上海交通大学“高峰高原计划”(No:20152526)

¹上海交通大学附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科 上海交通大学耳鼻咽喉科研究所(上海,200233)
通信作者:冯艳梅,E-mail:feng.yanmei@126.com

- [15] Kannan M, Bayam E, Wagner C, et al. WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(44): E9308—E9317.
- [16] Lin RY, Trivino MR, Curry A, et al. Interleukin 6 and C-reactive protein levels in patients with acute allergic reactions: an emergency department-based study[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001, 87(5): 412—416.
- [17] Fujita M, Ueki S, Ito W, et al. C-reactive protein levels in the serum of asthmatic patients[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2007, 99(1): 48—53.
- [18] Kilic H, Karalezli A, Hasanoglu HC, et al. The relationship between hs-CRP and asthma control test in asthmatic patients [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2012, 40(6): 362—367.
- [19] Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, et al. High-sensitivity C-reactive protein: A predictive marker in severe asthma[J]. Respirology, 2008, 13(5): 664—669.
- [20] Ko AR, Kim YH, Sol IS, et al. High-Sensitivity C-Reactive Protein Can Reflect Small Airway Obstruction in Childhood Asthma[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(3): 690—697.

(收稿日期:2019-10-14)