doi:10.11659/jjssx.04E019101

·临床研究·

急性脑出血患者血清 CCCK-18 水平检测及意义

程 绩[1],梁燕燕[1,2],曾方政[1],全军承[1],周人杰[1] (1.陆军军医大学第二附属医院急诊科,重庆 400037;2.重庆市第一社会福利院超声科,重庆 400054)

[摘 要] **目的** 探讨细胞角蛋白 18 裂解片段(CCCK-18)在急性脑出血患者病情判断中的价值。**方法** 选取陆军军医大学第二附属医院 2013 年 6 月至 2017 年 6 月 103 例急性脑出血患者,入院后按照美国国立卫生研究院卒中量表评分(NIHSS)分为 3 组:高评分组(NIHSS≥15 分,25 例),中评分组(6 分 < NIHSS < 15 分,40 例),低评分组(NIHSS≤6 分,38 例);另选取 30 名健康体检者作为健康对照组。检测脑出血患者颅内出血量,并运用酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测所有纳入对象血清 CCCK-18 含量;进一步分析血清 CCCK-18 含量与 NIHSS 和颅内出血量的相关性。**结果** 急性脑出血患者血清 CCCK-18 水平明显高于健康对照组,NIHSS 高评分组血清 CCCK-18 水平和颅内出血量显著高于中评分组,且中评分组高于低评分组,以上差异均有统计学意义($P<0.05$);急性脑出血患者血清 CCCK-18 水平与 NIHSS 呈明显正相关($r=0.61$,$P<0.05$),与颅内出血量呈明显正相关($r=0.57$,$P<0.05$)。**结论** 急性脑出血患者血清 CCCK-18 水平明显增高,可以作为评估患者病情严重程度和预后恢复情况的生物学标志物。

[关键词] 急性脑出血;细胞角蛋白 18 裂解片段;脑卒中

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-04-17

Detection and significance of serum CCCK-18 level in acute cerebral hemorrhage patients

CHENG Ji[1], LIANG Yan-yan[1,2], ZENG Fang-zheng[1], QUAN Jun-cheng[1], ZHOU Ren-jie[1] (1. Emergency Department, Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Ultrasound, First Social Welfare Home of Chongqing, Chongqing 400054, China)

Abstract: Objective To investigate the value of serum caspase-cleaved Cytokeratin 18 (CCCK-18) in evaluating the severity of acute cerebral hemorrhage. **Methods** This study comprised of 103 acute cerebral hemorrhage patients and 30 healthy control subjects. According to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), the 103 patients with acute cerebral hemorrhage were divided into three groups: high score group (NIHSS≥15, $n=25$), median score group ($6<$ NIHSS <15, $n=40$), low score group (NIHSS≤6, $n=30$). Hematoma volumes in patients was detected, and serum CCCK-18 content was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The correlations between CCCK-18 and NIHSS and hematoma volumes were performed. **Results** The level of serum CCCK-18 were higher in acute cerebral hemorrhage patients compared with the healthy control group. The serum CCCK-18 levels and hematoma volumes were significantly higher in high score group compared with the median score group, which were also higher than that in low score group ($P<0.05$). The correlation analyzes showed that CCCK-18 levels were significantly positively correlated to NIHSS score ($r=0.61$, $P<0.05$) and hematoma volumes ($r=0.57$, $P<0.05$) in acute cerebral hemorrhage patients. **Conclusion** The elevated serum CCCK-18 level can be a potential predictive biomarker to evaluate the severity and prognosis in acute cerebral hemorrhage patients.

Keywords: acute cerebral hemorrhage; serum caspase-cleaved Cytokeratin 18; stroke

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是一种常见的、频发的、具有高致残率和致死率的急性脑血管病[1]。脑细胞凋亡是脑出血后激活的一种细胞自主、有序的死亡过程,会造成脑组织不可逆的损伤,对患者的病情严重程度和预后产生深远影响[2-3]。细胞角蛋白 18 裂解片段(caspase-cleaved Cytokeratin 18, CCCK-18)是一种在凋亡过程中,细胞角蛋白 18 被活化的半胱天冬酶(caspase)酶解并释放入血的凋亡标志蛋白[4-5]。有研究证实,在急性心肌梗死、败血症、慢性肝炎、乳腺癌患者血清中 CCCK-18 含量显著增高,并且提示升高的 CCCK-18 与危重病情和不良预后密切相关[6-12]。另有研究指出,CCCK-18 可作为预测创伤性脑损伤患者 30 d 病死率的独立风险因子,但其在脑出血患者中的意义目前尚不明确[13]。因此,本研究统计分析血清 CCCK-18 含量与脑出血患者病情程度的关系,探讨 CCCK-18 是否可以作为评估急性脑出血患者病情严重程度和预后恢复情况的生物学标志物。

[基金项目] 第三军医大学第二附属医院临床科研项目(2014YLC33)

[通信作者] 周人杰,E-mail:owegno@163.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2013年6月至2017年6月陆军军医大学第二附属医院急诊科收治的103例急性脑出血患者,发病均在6 h内。脑出血的诊断符合《第4届脑血管疾病学术会议诊断标准》,经头颅CT或MRI确诊。脑出血患者按照美国国立卫生研究院卒中量表评分(NIHSS)分为3组:低评分组(NIHSS≤6分,38例),中评分组(6分<NIHSS<15分,40例)和高评分组(NIHSS≥15分,25例),另选取30名健康体检者作为健康对照组。其中高评分组男14例,女11例,年龄47~76岁,平均(64.26±9.12)岁;中评分组男22例,女18例,年龄44~75岁,平均(62.83±10.47)岁;低评分组男22例,女16例,年龄42~74岁,平均(61.36±9.73)岁。排除患有传染病、肾肝疾病、进行抗血小板或抗凝治疗、需要进行急诊手术的患者。健康对照组男16例,女14例;年龄45~73岁,平均(60.58±8.63)岁。4组患者临床资料对比差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准后实施,研究对象或其家属同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫吸附法(ELISA法)检测CCCK-18含量 健康查体者在签署知情同意书后,患者在确诊为脑出血后,立即抽取静脉血约3 mL,放入4 ℃冰箱静止1 h,待凝固后,常温离心10 min(3 000 r/min),分离上层血清,每个样本分别5管80 μL上层血清于-70 ℃保存待检测。采用ELISA法检测血清CCCK-18含量,细胞角蛋白18-M30检测试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司,检测过程严格按照试剂盒的说明操作,至少重复3次。

1.2.2 颅内出血量的计算 按照文献记载的方法,待头颅CT成像后,根据CT图片,采用V=(A×B×C)/2公式计算颅内出血量[14]。V:颅内出血量;A:CT图像下血肿最大横径;B:垂直于A的最大直径;C:血肿层面数。

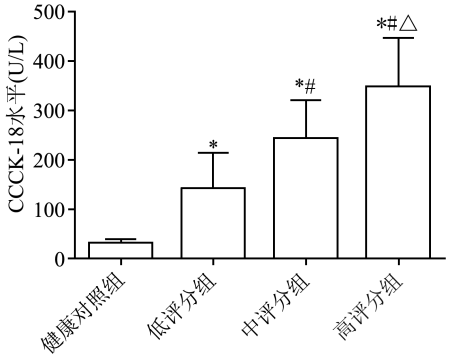
1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析方法。采用Pearson法进行相关性分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清CCCK-18水平的比较

采用ELISA法检测各组血清CCCK-18水平,结果显示:脑出血患者血清CCCK-18水平较健康对照组显著升高,并且中评分组CCCK-18明显高于低评分组,高评分组高于中评分组,以上差异均有统计学意义($P<0.05$),见图1。

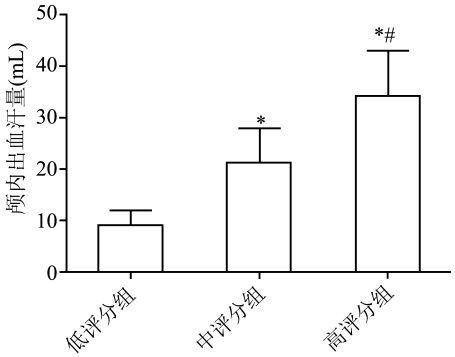


*:与健康对照组比较,$P<0.05$;#:与低评分组比较,$P<0.05$;△:与中评分组比较,$P<0.05$

图1 各组血清CCCK-18水平比较

2.2 脑出血患者颅内出血量的比较

根据脑CT结果,通过公式计算脑出血患者颅内出血量发现:中评分组的颅内出血量显著高于低评分组,高评分组明显多于中评分组,以上差异均有统计学意义($P<0.05$),见图2。



*:与低评分组比较,$P<0.05$;#:与中评分组比较,$P<0.05$

图2 脑出血患者颅内出血量比较

2.3 CCCK-18与NIHSS的相关性分析

采用Pearson相关性分析法研究脑出血患者血清CCCK-18水平和NIHSS的关系,结果显示:CCCK-18与NIHSS呈明显正相关($r=0.61$,$P<0.05$),见图3。

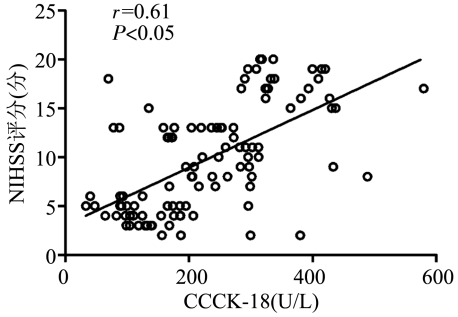


图3 血清CCCK-18与NIHSS的相关性分析

2.4 CCCK-18 与颅内出血量的相关性分析

进一步分析血清 CCCK-18 水平与颅内出血量的相关性,结果显示脑出血患者的颅内出血量与血清 CCCK-18 也呈明显正相关($r=0.57$,$P<0.05$),见图 4。

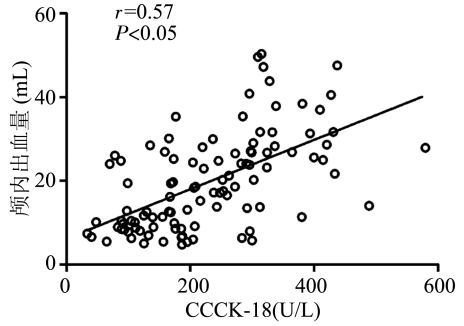


图 4 颅内出血量与血清 CCCK-18 含量的相关性分析

3 讨论

脑出血是一种非外伤性脑实质血管破裂出血、严重威胁人类健康和生活质量的重大脑血管疾病。ICH 患者不仅早期病死率高,即使幸存下来,也会伴有不同程度的脑损伤,引起一系列后遗症[1]。因此,寻找早期评估脑出血患者病情严重程度和预后恢复情况的标志物对脑出血的治疗具有重要意义。本研究依据 NIHSS 将脑出血患者分为低、中、高评分组,检测颅内出血量和血清 CCCK-18 含量发现:与健康人群相比,脑出血患者血清 CCCK-18 水平显著升高,且中评分组的 CCCK-18 和颅内出血量明显高于低评分组,高评分组又高于中评分组,提示血清中 CCCK-18 的含量与出血性脑卒中的发生以及病情严重程度相关。为进一步证实,本研究采用相关性分析发现 CCCK-18 水平与 NIHSS 和颅内出血量呈明显正相关。因此,本研究认为 CCCK-18 可以作为评估脑出血患者病情和预后恢复情况潜在的生物标志物。

脑损伤是脑出血患者病情严重程度和预后恢复情况的重要病理学基础,其中脑细胞死亡又是引起脑损伤的关键环节。细胞死亡分为坏死和凋亡两种方式,坏死是细胞的被动死亡方式,常累及多个细胞,并引起明显的炎症反应;而凋亡是通过形成凋亡小体或邻近正常细胞的吞噬作用影响单个细胞的主动死亡过程[2-3]。研究显示,细胞死亡与脑出血的发展关系密切,脑出血大鼠模型的脑组织中发现凋亡相关基因(p53、bax、活化的半胱天冬酶-3)的高表达以及抗凋亡基因(bcl-2、bcl-xl)的低表达[15-16]。Qureshi 等[17]在对 12 例脑出血患者进行血肿清除术后发现,血肿基质和血肿周边组织中凋亡是脑组织的主要死亡方式。除此之外,脑出血后引起系统性炎症反应进一步促进脑细胞凋亡[18-19]。由此可见,脑细胞凋亡对出血性脑卒中具有重要作用。虽然前期的动物和人群实验已证实了脑出血后脑组织的凋亡改变,但血清中可被检测到的凋亡标志蛋白 CCCK-18 水平与脑出血的关系尚不明确[4-5]。已有研究表明血清 CCCK-18 的水平与肝炎[9-11]、肿瘤[12]、器官移植[20]、败血症[7-8]患者的病情严重程度关系紧密,病情越重,血清中 CCCK-18 的值越高。另有研究还发现,创伤性脑损伤患者血清 CCCK-18 的水平与患者 30 d 病死率呈明显正相关,并认为其可以作为预测创伤性脑损伤患者 30 d 病死率的独立风险因子[13]。Lorente 等[21]通过检测恶性大脑中动脉梗死患者血清 CCCK-18 发现,存活患者的 CCCK-18 的水平显著低于死亡患者。除此之外,本研究与 Lorente 等[22]和 Gu 等[23]的研究结果相近,其研究发现脑出血患者血清 CCCK-18 的水平与患者 30 d 病死率和 6 个月病死率密切相关,CCCK-18 水平越高,病死率越高,同样证实了血清 CCCK-18 在脑出血患者中的重要价值。但本研究相较于上述研究还有很多的不同点。首先,上述研究并未纳入健康对照人群,无法明确血清 CCCK-18 水平是否在脑出血患者中特异性升高以及其对脑出血病的评判价值;而本研究通过对比健康人群和脑出血患者血清中 CCCK-18 的含量,首先确定了脑出血患者血清中 CCCK-18 含量确实显著高于健康对照组后才进行后续试验。其次,Lorente 等[22]和 Gu 等[23]的研究对象是严重的脑出血患者,并未纳入轻、中度患者,其研究目的是分析 CCCK-18 和病死率之间的关系;而本研究关注的重点是 CCCK-18 水平的高低与对患者病情严重程度的关系,基于 NIHSS 纳入轻、中、重度脑出血患者,通过相关性分析发现患者脑出血病情越重,血清 CCCK-18 的水平越高。最后,在临床和本研究中证实,颅内出血量也是判定脑出血患者病情严重程度和预后的重要指标[24-25],Lorente 等[22]和 Gu 等[23]的研究并未关注颅内出血量与患者血清 CCCK-18 的关系,而本文通过对脑出血患者颅内出血量和 CCCK-18 的相关性分析发现,颅内出血量越大,血清 CCCK-18 水平越高。尽管如此,本研究仍然存在一定的局限性。首先,本研究并未在不同时间点对脑出血患者血清 CCCK-18 水平进行监测,无法比较这一参数随着病情进展的动态变化;其次,未涉及脑组织凋亡的相关检测,无法确定血清 CCCK-18 的水平与脑组织凋亡的相关性;最后,未选择终点观测指标(30 d病死率或 6 个月病死率),无法准确评估 CCCK-18 的水平对患者预后,尤其是病死率的影响。因此,后续应从以上几个方面继续深入研究血清 CCCK-18

和脑出血的相关性。

综上所述,脑出血患者血清 CCCK-18 水平显著高于健康人群,且 NIHSS 越高、颅内出血量越多的患者,血清 CCCK-18 值越高。本研究为评判脑出血患者病情严重程度提供了一项新的潜在性生物标志物,并以降低血清 CCCK-18 水平为靶点,为减轻脑出血患者脑组织的凋亡程度和功能缺陷提供了新的治疗思路。

[参考文献]

[1] Flaherty ML, Haverbusch M, Sekar P, et al. Long-term mortality after intracerebral hemorrhage[J]. Neurology, 2006, 66(8): 1182 – 1186. doi: 10.1212/01.wnl.0000208400.08722.7c.

[2] Lee I, Cheng WC, Chung CY, et al. Dexamethasone reduces brain cell apoptosis and inhibits inflammatory response in rats with intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosci Res, 2015, 93(1): 178 – 188. doi: 10.1002/jnr.23454.

[3] Han L, Ni Y, Cao M, et al. A new role discovered for IGTP: the protective effect of IGTP in ICH-induced neuronal apoptosis[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(5): 713 – 724. doi: 10.1007/s10571 – 015 – 0251 – 1.

[4] Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis[J]. J Cell Biol, 1997, 138(6): 1379 – 1394. doi: 10.1083/jcb.138.6.1379.

[5] Leers MP, Kölgen W, Björklund V, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis[J]. J Pathol, 1999, 187(5): 567 – 572. doi: 10.1002/(SICI)1096 – 9896(199904)187:5 < 567: AID-PATH288 > 3.0.CO;2 – J.

[6] Adlbrecht C, Hoetzenecker K, Posch M, et al. Elevated levels of interleukin-1beta-converting enzyme and caspase-cleaved cytokeratin-18 in acute myocardial infarction[J]. Eur J Clin Invest, 2007, 37(5): 372 – 380. doi: 10.1111/j.1365 – 2362.2007.01803.x.

[7] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. Higher serum caspase-cleaved cytokeratin-18 levels during the first week of sepsis diagnosis in non-survivor patients[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(10): 1621 – 1629. doi: 10.1515/cclm – 2016 – 1034.

[8] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. Sustained high serum caspase-3 concentrations and mortality in septic patients[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(2): 281 – 288. doi: 10.1007/s10096 – 017 – 3129 – y.

[9] Bantel H, Lügering A, Heidemann J, et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury[J]. Hepatology, 2004, 40(5): 1078 – 1087. doi: 10.1002/hep.20411.

[10] Sgier C, Müllhaupt B, Gerlach T, et al. Effect of antiviral therapy on circulating cytokeratin-18 fragments in patients with chronic hepatitis C[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(12): 845 – 850. doi: 10.1111/j.1365 – 2893.2009.01251.x.

[11] Li J, Verhaar AP, Pan Q, et al. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) predict severity of liver disease in chronic hepatitis B[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2017, 10: 203 – 209. doi: 10.2147/CEG.S135526.

[12] Gemechu Y, Seifu D, Tigneh W, et al. Caspase-Cleaved Cytokeratin 18 as a potential molecular biomarker for monitoring chemotherapeutic response in breast cancer patients[J/OL]. J Mol Genet Med, 2018, 12(1). doi: 10.4172/1747 – 0862.1000339.

[13] Lorente L, Martín MM, González-Rivero AF, et al. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 in patients with severe traumatic brain injury are associated with mortality: a pilot study[J]. PloS One, 2015, 10(3): e0121739. doi: 10.1371/journal.pone.0121739.

[14] Khan M, Baird GL, Elias R, et al. Comparison of intracerebral hemorrhage volume calculation methods and their impact on scoring tools[J]. J Neuroimaging, 2017, 27(1): 144 – 148. doi: 10.1111/jon.12370.

[15] He M, Wang Y, Shen J, et al. Bex1 attenuates neuronal apoptosis in rat intracerebral hemorrhage model[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(4): 527 – 535. doi: 10.1016/j.prp.2018.02.012.

[16] Yao Q, Liu Q, Xu H, et al. Upregulated expression of SSTR3 is involved in neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage in adult rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(8): 1407 – 1416. doi: 10.1007/s10571 – 017 – 0471 – 7.

[17] Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage[J]. Neurosurgery, 2003, 52(5): 1041 – 1047.

[18] Kalita J, Bastia J, Bhoi SK, et al. Systemic inflammatory response syndrome predicts severity of stroke and outcome[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(7): 1640 – 1648. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.03.057.

[19] Zhao L, An R, Yang Y, et al. Melatonin alleviates brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via attenuating inflammation, apoptosis, and oxidative stress: the role of SIRT1 signaling[J]. J Pineal Res, 2015, 59(2): 230 – 239. doi: 10.1111/jpi.12254.

[20] Lorente L, Rodriguez ST, Sanz P, et al. Prognostic value of serum caspase-cleaved cytokeratin-18 levels before liver transplantation for one-year survival of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): E1524. doi: 10.3390/ijms17091524.

[21] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. High serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 are associated with malignant middle cerebral artery infarction patient mortality[J]. BMC Neurol, 2018, 18(1): 32. doi: 10.1186/s12883 – 018 – 1038 – z.

[22] Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, et al. Association between serum levels of caspase-cleaved cytokeratin-18 and early mortality in patients with severe spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 23. doi: 10.1186/s12868 – 018 – 0424 – 1.

[23] Gu SJ, Lu M, Xuan HF, et al. Predictive value of serum caspase-cleaved cytokeratin-18 concentrations after acute intracerebral hemorrhage[J]. Clin Chim Acta, 2016, 452: 124 – 128. doi: 10.1016/j.cca.2015.11.011.

[24] Yang X, Ren W, Zu H, et al. Evaluate the serum cortisol in patients with intracerebral hemorrhage[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2014, 123: 127 – 130. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.05.019.

[25] Lee SH, Park KJ, Kang SH, et al. Prognostic factors of clinical outcomes in patients with spontaneous thalamic hemorrhage[J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 2638 – 2646. doi: 10.12659/MSM.894132.

(编辑:陈庆利)