

• 神经介入 Neurointervention •

动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者外周血单个核细胞中瞬时受体电位通道 M2 水平与介入治疗预后的关系

吉思璇, 吴迪, 白曼莫

【摘要】 目的 分析动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)患者外周血单个核细胞中瞬时受体电位通道 M2(TRPM2)水平与介入治疗预后的关系。**方法** 选取 2019 年 8 月至 2021 年 5 月在三亚市中医院接受介入治疗的 148 例 aSAH 患者作为研究对象。用 Ficoll 密度梯度离心法和蛋白质免疫印迹法检测外周血单个核细胞中 TRPM2 水平。用改良 Rankin 量表(mRS)评分评价介入治疗 90 d 后预后。用 logistic 回归分析 TRPM2 与 aSAH 患者介入治疗预后的关系。**结果** 根据随访后 mRS 评分将患者分为预后良好组($n=107$)和预后不良组($n=41$)。预后良好组年龄、Hunt-Hess 分级Ⅲ级占比、脑血管痉挛占比和 Glasgow 昏迷量表(GCS)评分低于预后不良组(均 $P<0.05$)。预后良好组治疗前后 TRPM2 水平低于预后不良组(均 $P<0.05$)。治疗后 TRPM2 >0.28 和 Hunt-Hess 分级Ⅲ级是 aSAH 患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。**结论** aSAH 患者介入治疗后 TRPM2 水平高与预后不良有关。

【关键词】 动脉瘤性蛛网膜下腔出血; 外周血单个核细胞; 瞬时受体电位通道 M2; 预后

中图分类号:R743.35 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-07-0655-05

Correlation between transient receptor potential melastatin 2 in peripheral blood mononuclear cells and the prognosis of interventional treatment in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage

Ji Sixuan, Wu Di, Bai Manmo. Department of Medical Imaging, Sanya Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sanya, Hainan Province 572000, China

Corresponding author: Bai Manmo, E-mail: baimanm@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) in peripheral blood mononuclear cells and the prognosis of interventional treatment in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH). **Methods** A total of 148 patients with aSAH, who received interventional treatment at the Sanya Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine of China between August 2019 and May 2021, were prospectively collected. Ficoll density gradient separation method and protein immunoblotting method (Western blotting) were used to measure TRPM2 in peripheral blood mononuclear cells. Modified Rankin Scale (mRS) score was used to evaluate post-intervention 90-day prognosis. Logistic regression analysis was adopted to analyze the relationship of TRPM2 to the prognosis of interventional treatment. **Results** Based on postoperative follow-up mRS scores the patients were divided into good prognosis group ($n=107$) and poor prognosis group ($n=41$). The age, percentage of patients with Hunt-Hess grade Ⅲ, percentage of patients having cerebral vasospasm, and Glasgow coma scale (GCS) score in the good prognosis group were remarkably lower than those in the poor prognosis group (all $P<0.05$). Both the pre-treatment and post-treatment TRPM2 levels in the good prognosis group were significantly lower than those in the poor prognosis group (all $P<0.05$). Pre-treatment TRPM2 >0.28 and Hunt-Hess grade Ⅲ were the independent risk factors for prognosis in patients with aSAH ($P<0.05$). **Conclusion** In patients with aSAH after receiving interventional

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.07.004

基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目(15A200091)

作者单位: 572000 三亚市中医院医学影像科(吉思璇、白曼莫);解放军总医院海南医院放射治疗科(吴迪)

通信作者: 白曼莫 E-mail: baimanm@163.com

treatment, a high TRPM2 level is closely correlated with a poor prognosis. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 655-659)

【Key words】 aneurysmal subarachnoid haemorrhage; peripheral blood mononuclear cell; transient receptor potential melastatin 2; prognosis

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aneurysmal subarachnoid hemorrhage, aSAH) 是颅内动脉瘤破裂引发的一种脑出血性疾病,致残率和致死率均较高^[1-2]。据报道,aSAH 患者接受及时治疗 1 年内病死率高达 50%,远期病死率仍高达 10%~24%^[3-5]。探究可评估 aSAH 预后的指标有着重要意义,可辅助临床治疗方案的制定。瞬时受体电位通道 M2(transient receptor potential melastatin 2, TRPM2) 是瞬时受体电位蛋白超家族中一员,作为一种重要的离子通道介导多种细胞反应,如通过其钙离子可调节过氧化氢诱导的细胞死亡,还会促进单核细胞和巨噬细胞分泌趋化因子,加剧炎症反应^[6]。Pan 等^[7]研究表明,干扰 TRPM2 表达可降低氧化应激损伤、细胞内钙离子浓度及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白(NLRP3)炎性小体激活,从而抑制葡萄糖剥夺诱导的神经元细胞凋亡。基于上述研究,有理由认为 TRPM2 参与了 aSAH 进展过程,是其预后评估的潜在生物标志物。目前鲜有研究分析 TRPM2 与 aSAH 预后的关系,本研究选取接受介入治疗的 aSAH 患者作为研究对象,分析 TRPM2 与 aSAH 预后的关系,以期对 aSAH 预后评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2019 年 8 月至 2021 年 5 月在三亚市中医院参照《中国蛛网膜下腔出血诊治指南 2019》^[8]、经血管造影确诊并接受介入治疗的 aSAH 患者作为研究对象。纳入标准:①首次发病,且在发病 12 h 内接受支架联合弹簧圈动脉瘤栓塞术治疗;②年龄≤70 岁;③随访资料完整;④签署手术知情同意书。排除标准:①非动脉瘤破裂诱发的脑出血;②有冠心病史、脑卒中史、神经退行性疾病史、下肢动脉硬化闭塞症史或恶性肿瘤史等;③心肝肾功能异常;④生命体征不稳定;⑤国际标准化比值>1.4 或血小板计数<100×10⁹/L。本研究符合《赫尔辛基宣言》,已获医学伦理委员会批准(2021-006)。

1.2 介入治疗

手术在全身麻醉下进行,采用 Seldinger 技术穿刺股动脉,置入 6 F 导管,全身肝素化,DSA 造影测

量动脉瘤大小,选择适宜支架;将支架导管置入距动脉瘤远端 1 cm 处,Echelon 导管送至动脉瘤体 1/2 处,释放弹簧圈,同时半释放支架覆盖动脉瘤颈至弹簧圈填塞致密后退出导管,完全释放支架^[9];即刻造影确定栓塞程度、支架位置等。若术中出现脑血管痉挛给予静脉注射用盐酸罂粟碱(30~120 mg/次,山东北大高科华泰制药公司,国药准字 H20052331)处理。

1.3 外周血中单个核细胞提取

用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血中单个核细胞,操作如下:分别于介入治疗前和治疗 24 h 内抽取 aSAH 患者空腹肘部静脉血 10 mL,用磷酸盐缓冲溶液进行稀释,并将稀释液滴入 Ficoll 分离液中,4℃ 2 000 r/min 离心 20 min,吸取单个核细胞层细胞;再次用磷酸盐缓冲溶液稀释细胞,4℃ 1 500 r/min 离心 10 min,吸取细胞,重复该操作 2 次^[10]。

1.4 TRPM2 水平检测

用蛋白质免疫印迹法检测 TRPM2 水平,操作如下:用含放射免疫沉淀试验(RIPA)溶液裂解细胞,离心后提取蛋白,二辛可酸(BCA)试剂盒定量;凝胶电泳(电压 80~120 V)至溴酚蓝跑出胶面,漂洗、转膜后用脱脂奶粉室温封闭 2 h;一抗兔抗人 TRPM2 多克隆抗体和兔抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(武汉益普生物科技公司)4℃孵育过夜,二抗山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(武汉菲恩生物科技公司)室温孵育 2 h;电化学发光(ECL)液显影,Image J 1.8.0 软件读取蛋白质免疫印迹图像^[11]。计算 TRPM2 相对内参 GAPDH 的表达水平。

1.5 预后随访和评价

采用门诊和电话方式随访,评估 aSAH 患者治疗 90 d 后改良 Rankin 量表(mRS)评分。本研究随访截止时间为 2021 年 9 月 5 日。mRS 评分≤2 分为预后良好,>2 分为预后不良^[12]。

1.6 统计学方法

采用 4.1.0 版 R 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数±标准差表示,两组间比较用独立样本 *t* 检验,组内治疗前后比较用配对样本 *t* 检验;非正态分布的计量资料以 *M*(*P*₂₅, *P*₇₅)表示,两组

间比较用 Mann-Whitney U 检验。计数资料用例和率(%)表示,组间比较用 χ^2 检验。采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)评价 TRPM2 判断 aSAH 预后的价值,logistic 回归分析影响 aSAH 预后的因素。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

符合纳入标准的 aSAH 患者共 165 例,术后随访 148 例,随访率为 89.7%。148 例中男 57 例,女 91 例;年龄范围 40~64 岁,中位年龄 46(45,49)岁;体质指数(BMI)为 (25.45 ± 2.36) kg/m²;有高血压史 71 例,高脂血症史 55 例,糖尿病史 33 例;动脉瘤位于前循环 67 例,后循环 34 例,前后循环 47 例;Hunt-Hess 分级 I、II 级 86 例,III 级 62 例;Fisher 分级 I、II 级 139 例,III 级 9 例;脑血管痉挛 29 例;Glasgow 昏迷量表(GCS)评分为 6(4,7)分。随访结束后,mRS 评分 ≤ 2 分 107 例(预后良好组), > 2 分 41 例(预后不良组)。

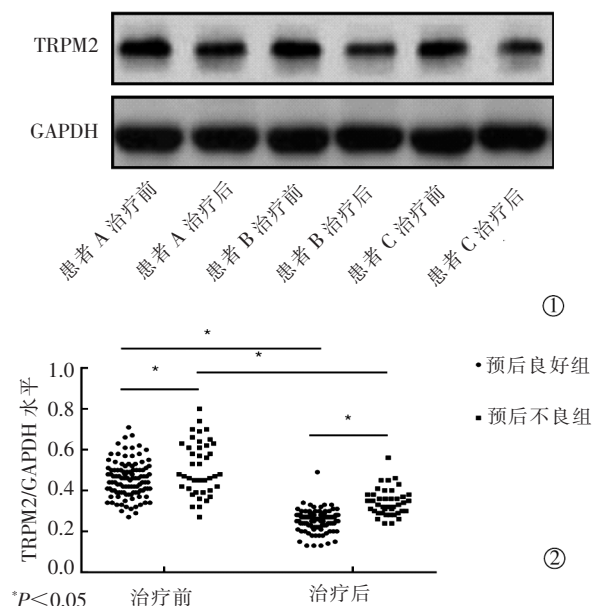
两组间性别构成、BMI、高血压史占比、糖尿病史占比、高脂血症史占比、动脉瘤位置构成和 Fisher 分级构成差异无统计学意义(均 $P>0.05$),预后良好组年龄、Hunt-Hess 分级 III 级占比、脑血管痉挛占比和 GCS 评分均低于预后不良组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1。

预后良好组治疗前后 TRPM2 水平分别为

表 1 两组基线资料比较

参数	预后良好组 (n=107)	预后不良组 (n=41)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	46.7 \pm 4.8	49.8 \pm 5.2	3.482	0.001
性别[n(%)]			0.089	0.765
男性	42(39.25)	15(36.59)		
女性	65(60.75)	26(63.41)		
BMI(kg/m ²)	25.32 \pm 2.47	25.82 \pm 2.02	1.162	0.247
高血压史[n(%)]	49(45.79)	22(53.66)	0.734	0.391
糖尿病史[n(%)]	26(24.30)	7(17.07)	0.893	0.345
高脂血症史[n(%)]	41(38.32)	14(34.15)	0.221	0.638
动脉瘤位置[n(%)]			0.073	0.964
前循环	49(45.79)	18(43.90)		
后循环	24(22.43)	10(24.39)		
前后循环	34(31.78)	13(31.71)		
Hunt-Hess 分级[n(%)]			54.466	<0.01
I、II 级	82(76.64)	4(9.76)		
III 级	25(23.36)	37(90.24)		
Fisher 分级[n(%)]			3.712	0.054
I、II 级	103(96.26)	36(87.80)		
III 级	4(3.74)	5(12.20)		
脑血管痉挛[n(%)]	8(7.48)	21(51.22)	36.000	<0.01
GCS 评分	5.36 \pm 1.76	6.88 \pm 2.00	4.511	<0.01

(0.45 ± 0.09) g/L、(0.25 ± 0.05) g/L, 均低于预后不良组(0.51 ± 0.13) g/L、(0.34 ± 0.06) g/L, 差异均有统计学意义($t=2.645$, $P=0.011$; $t=7.768$, $P<0.01$)。预后良好组、预后不良组治疗后 TRPM2 水平均低于治疗前, 差异均有统计学意义($t=20.208$, 9.806 , 均 $P<0.01$); 治疗前后 TRPM2 水平变化值分别为 0.19 (0.12, 0.27) 和 0.13 (0.08, 0.27), 差异无统计学意义($Z=1.652$, $P=0.098$)。见图 1。



①治疗前后 TRPM2 蛋白质免疫印迹图像;②两组治疗前后 TRPM2 水平比较

图 1 aSAH 患者治疗前后 TRPM2 水平

治疗前 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的 ROC 曲线下面积(AUC)、最佳截断点、灵敏度和特异度分别为 0.622(95%CI:0.511~0.734)、0.55、41.46% 和 87.85%, 治疗后 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的 AUC、最佳截断点、灵敏度和特异度分别为 0.885(95%CI:0.822~0.947)、0.28、82.93% 和 80.37%, 治疗后 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的 AUC 高于治疗前 TRPM2, 差异有统计学意义($Z=4.672$, $P<0.01$)。

将 aSAH 患者预后作为因变量, 年龄、GCS 评分、治疗后 TRPM2、Hunt-Hess 分级、Fisher 分级和脑血管痉挛作为自变量纳入线性回归分析(变量赋值见表 2), 结果显示上述因素的容忍度均大于 0.1, 方差膨胀因子均小于 10, 见表 3; 提示上述因素不存在共线性。将上述因素纳入多因素 logistic 回归分析, 结果显示 GCS 评分高、治疗后 TRPM2 >0.28 和 Hunt-Hess 分级 III 级是 aSAH 患者预后的独立危险因素($P<0.05$), 见表 4。

表 2 变量赋值

变量参数	赋值
年龄	原始值录入
GCS 评分	原始值录入
治疗后 TRPM2	$\leq 0.28=0, > 0.28=1$
Hunt-Hess 分级	I + II = 0, III = 1
Fisher 分级	I + II = 0, III = 1
脑血管痉挛	未发生=0, 发生=1
预后	预后良好=0, 预后不良=1

表 3 各变量共线性检验结果

变量参数	容忍度	方差膨胀因子
年龄	0.858	1.166
GCS 评分	0.932	1.072
治疗后 TRPM2	0.764	1.308
Hunt-Hess 分级	0.754	1.326
Fisher 分级	0.683	1.465
脑血管痉挛	0.546	1.833

表 4 logistic 分析 aSAH 患者预后风险因素

影响因素	系数值	标准误	卡方值	P 值	OR 值	95%CI
年龄	0.106	0.070	2.272	0.132	1.112	0.969~1.276
GCS 评分	0.671	0.219	9.414	0.002	1.956	1.274~3.002
治疗后 TRPM2($> 0.28/\leq 0.28$)	3.014	0.760	15.716	< 0.01	20.374	4.591~90.424
Hunt-Hess 分级(III/I + II)	4.093	0.964	18.047	< 0.01	59.944	9.069~396.217
Fisher 分级(III/I + II)	-0.185	1.411	0.017	0.896	0.831	0.052~13.222
脑血管痉挛(发生/未发生)	1.431	0.948	2.277	0.131	4.181	0.652~26.805
常量	-14.391	4.186	11.818	0.001	< 0.001	—

3 讨论

准确评估 aSAH 预后具有重要意义,有助于制定患者后续治疗方案。目前临床主要应用 Hunt-Hess 分级评价 aSAH 患者预后^[13],但该分级各等级间划分标准的界限不清晰,受主观因素影响较大^[14-15],因此亟需探究评价 aSAH 患者预后的新指标。TRPM2 是一种非选择性钙离子可渗透的阳离子通道,在体内广泛分布,对氧化应激的激活高度敏感^[16]。氧化应激损伤一般多通过破坏细胞内离子稳态诱导细胞死亡。多数研究表明 TRPM2 在介导氧化应激诱导的细胞死亡过程中发挥着重要作用,包括脑缺血-再灌注损伤、 β -淀粉样蛋白寡聚体相关神经毒性和记忆障碍、神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶离子/1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶诱导的细胞死亡和破坏血管内皮功能^[17-20]等。

本研究结果显示,预后良好组治疗前后 TRPM2 水平均低于预后不良组,提示 TRPM2 与 aSAH 患者预后有关,是评估其预后的潜在生物标志物;结果还显示预后良好组和预后不良组治疗后的 TRPM2 水平均低于治疗前,提示介入治疗会影响 aSAH 患者 TRPM2 水平,但其具体原因仍需研究探明。本研究用 AUC 评价 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的价值,结果显示治疗后 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的 AUC、灵敏度和特异度分别为 0.885、82.93% 和 80.37%,治疗后 TRPM2 判断 aSAH 患者预后的 AUC 高于治疗前 TRPM2,表明治疗后 TRPM2 判断 aSAH 患者预后有一定价值,可辅助临床决策。

既往有研究表明,TRPM2 与炎症反应、氧化应激及调节细胞内钙离子浓度等有关,并通过上述机

制参与神经元凋亡^[6-7]。本研究中多因素 logistic 回归分析结果显示,治疗后 TRPM2 > 0.28 是 aSAH 患者预后的独立危险因素,推测其原因是治疗后 TRPM2 水平与神经元凋亡、脑部炎症和氧化应激损伤、细胞内钙离子浓度及 NLRP3 炎症小体激活等有关,上述因素均与神经元的功能和生存状态有关,因此可反映患者预后;研究结果还显示 GCS 评分高和 Hunt-Hess III 级是 aSAH 患者预后的独立危险因素,这与既往研究^[21-22]报道一致。张鹏等^[23]研究表明,脑血管痉挛和 Fisher 分级与 aSAH 患者预后不良有关。本研究结果显示脑血管痉挛并非 aSAH 患者预后的独立危险因素,推测其原因与研究样本量大小有关,还需开展大样本研究予以验证。

综上所述,aSAH 患者介入治疗后 TRPM2 水平高与预后不良有关。本研究尚存在一定不足,如仅分析治疗前后两个时间点的 TRPM2 水平与 aSAH 患者预后的关系,后续将增加时间梯度,进一步探究;此外,对于接受外科手术治疗后患者 TRPM2 是否可用于预后评估及其临床价值,还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Rouanet C, Silva GS. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: current concepts and updates[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2019, 77: 806-814.
- [2] Zhou B, He Y, Cheng J, et al. Treatment of the acute thromboembolic event during endovascular embolization of intracranial aneurysm[J]. J Intervent Med, 2020, 3: 208-212.
- [3] Kiiski H, Langsjo J, Tenhunen J, et al. S100B, NSE and MMP-9 fail to predict neurologic outcome while elevated S100B associates

- with milder initial clinical presentation after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurol Sci*, 2018, 390: 129-134.
- [4] Roquer J, Cuadrado-Godia E, Guimaraens L, et al. Short- and long-term outcome of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurology*, 2020, 95: e1819-e1829.
- [5] Mikhail M, Ayling O, Eagles ME, et al. Association between weekend admissions and mortality after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the “weekend effect” revisited[J]. *J Neurosurg*, 2019, 132: 1167-1173.
- [6] Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, et al. Roles of TRPM2 in oxidative stress[J]. *Cell Calcium*, 2011, 50: 279-287.
- [7] Pan T, Zhu QJ, Xu LX, et al. Knocking down TRPM2 expression reduces cell injury and NLRP3 inflammasome activation in PC12 cells subjected to oxygen-glucose deprivation[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 2154-2161.
- [8] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组, 中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国蛛网膜下腔出血诊治指南 2019[J]. *中华神经科杂志*, 2019, 52: 1006-1021.
- [9] 李成林, 梁上男, 吴炎宇, 等. 颅内动脉瘤支架结合弹簧圈栓塞术后不同维持时间双联抗血小板治疗对迟发性脑缺血的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2020, 29: 815-820.
- [10] Jia Y, Xu H, Li Y, et al. A modified Ficoll-Paque gradient method for isolating mononuclear cells from the peripheral and umbilical cord blood of humans for biobanks and clinical laboratories[J]. *Biopreserv Biobank*, 2018, 16: 82-91.
- [11] Pillai - Kastoori L, Schutz - Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis[J]. *Anal Biochem*, 2020, 593: 113608.
- [12] Jeong HG, Kim BJ, Choi JC, et al. Posttreatment National Institutes of Health Stroke Scale is superior to the initial score or thrombolysis in cerebral ischemia for 3-month outcome[J]. *Stroke*, 2018, 49: 938-944.
- [13] 贾建平, 陈生弟. 神经病学(第 8 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 218.
- [14] Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms[J]. *J Neurosurg*, 1968, 28: 14-20.
- [15] 邱涛, 兰青. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血的分级系统及其意义[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015, 20: 382-384.
- [16] Malko P, Jiang LH. TRPM2 channel-mediated cell death: an important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101755.
- [17] Alim I, Teves L, Li R, et al. Modulation of NMDAR subunit expression by TRPM2 channels regulates neuronal vulnerability to ischemic cell death[J]. *J Neurosci*, 2013, 33: 17264-17277.
- [18] Ostapchenko VG, Chen M, Guzman MS, et al. The transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel contributes to β -amyloid oligomer-related neurotoxicity and memory impairment[J]. *J Neurosci*, 2015, 35: 15157-15169.
- [19] Sun Y, Sukumaran P, Selvaraj S, et al. TRPM2 promotes neurotoxin MPP⁺/MPTP-induced cell death[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 409-420.
- [20] Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, et al. Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis[J]. *Circ Res*, 2014, 114: 469-479.
- [21] Lin Q, Ba HJ, Dai JX, et al. Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 concentrations and prognosis of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 54-58.
- [22] Zhu Y, Jiang H, Li Y, et al. Serum alkaline phosphatase level is associated with angiographic vasospasm, delayed cerebral ischemia-caused clinical deterioration, and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurocrit Care*, 2019, 31: 466-475.
- [23] 张鹏, 李育平, 王晓东, 等. 结合炎症反应指数的 Nomogram 模型对 aSAH 患者预后预测的价值[J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17: 216-220.

(收稿日期: 2021-11-15)

(本文编辑: 边 倩)