

新生儿急性呼吸窘迫综合征中 NETs 与 MAC-1 的相关性及临床意义

陈海, 王雅妮, 鲁思琪, 相虹, 卢红艳, 常明
(江苏大学附属医院儿科, 江苏 镇江 212001)

【摘要】目的: 探讨新生儿急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 中性粒细胞胞外诱捕 (NETs) 与巨噬细胞 1 抗原 (MAC-1) 的相关性及临床意义。**方法:** 选取 32 例 ARDS 患儿为 ARDS 组, 根据病情分为轻度组 ($n=12$)、中度组 ($n=11$) 及重度组 ($n=9$); 另选同期 24 例黄疸新生儿为对照组。比较 ARDS 组和对照组患者及 ARDS 中不同病情患儿血清中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、游离 DNA (cf-DNA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、MAC-1 水平; 通过 Pearson 相关性分析观察 ARDS 组患儿 NE 及 cf-DNA 与 TNF- α 、IL-6 及 MAC-1 水平的相关性; ROC 曲线分析血清 NE 和 cf-DNA 水平对新生儿 ARDS 的预测价值。**结果:** ARDS 组患儿 MAC-1 表达水平增强 ($P < 0.05$); NE、cf-DNA、TNF- α 、IL-6 高于对照组 ($P < 0.05$); ARDS 组不同病情患儿 NE、cf-DNA、TNF- α 、IL-6 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且重度组 $>$ 中度组 $>$ 轻度组。相关性分析显示, ARDS 组患儿血清 NE 及 cf-DNA 与 TNF- α 、IL-6 及 MAC-1 均呈正相关关系 ($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示, NE、cf-DNA 预测新生儿 ARDS 的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.765、0.821, 截断值分别为 347.5 pg/mL、138.17 ng/mL。**结论:** 新生儿 ARDS 患儿 NE 及 cf-DNA 与 TNF- α 、IL-6 及 MAC-1 均呈正相关关系, 临床可通过监测 NE、cf-DNA 水平来评估新生儿 ARDS 病情严重程度。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 中性粒细胞胞外诱捕网; 游离 DNA; 巨噬细胞 1 抗原; 新生儿

【中图分类号】 R720.597 **【文献标志码】** A

Correlation and clinical significance of neutrophil extracellular traps with macrophage-1 antigen level in neonatal ARDS

CHEN Hai, WANG Ya-ni, LU Si-qi, XIANG Hong, LU Hong-yan, CHANG Ming

(Department of Pediatric, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation and clinical significance of neutrophil extracellular trapping (NETs) and macrophage 1 antigen (MAC-1) in neonatal acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods:** 32 children with ARDS were divided into mild group ($n=12$), moderate group ($n=11$) and severe group ($n=9$) according to the severity, and 24 neonates with jaundice were taken as control group. The neutrophil elastase (NE), plasma free DNA (cf-DNA), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and MAC-1 levels were compared between the patients in ARDS group and control groups, as well as children with different conditions in ARDS. The correlation of NE and cf-DNA with general data, TNF- α , IL-6 and MAC-1 levels in ARDS group was analyzed by Pearson correlation analysis. ROC curve was used to analyze the diagnostic and predictive value of NE and cf-DNA in neonatal ARDS. **Results:** The average expression of MAC-1 in ARDS group was higher than that in control group ($P < 0.05$), and the levels of NE, cf-DNA, TNF- α and IL-6 were higher than those in control group ($P < 0.05$). The levels of NE, cf-DNA, TNF- α and IL-6 in severe group were higher than those in moderate group, and moderate group was higher than those in mild group ($P < 0.05$). Pearson analysis showed that serum cf-DNA and NE levels were positively correlated with TNF- α , IL-6 and MAC-1 in ARDS group ($P < 0.05$). ROC showed that the AUC of NE and cf-DNA predicting neonatal ARDS were 0.765 and 0.821, respectively, and the cut-off values were 347.5 pg/mL and 138.17 ng/mL, respectively. **Conclusion:** The levels of NE and cf-DNA in newborns with ARDS are positively correlated with TNF- α , IL-6, and MAC-1. The severity of neonatal ARDS can be assessed by monitoring the levels of NETs markers NE and cf-DNA.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; Neutrophil extracellular traps; Cell-free DNA; Macrophage-1 antigen; Neonates

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是新生儿常见的危重症, 临床表现

基金项目: 江苏省镇江市科技创新项目 (SS2023012); 江苏省妇幼健康科研项目 (F202067)

作者简介: 陈海 (1998 -), 男, 硕士研究生。E-mail: 245816389@qq.com

通讯作者: 常明。E-mail: changming8@163.com

以氧合障碍、进行性呼吸困难及呼吸衰竭为特征^[1]。尽管临床已有多种对症支持治疗手段,但病死率仍较高,是新生儿死亡的主要病因之一。气道中性粒细胞聚集往往被认为是 ARDS 的标志^[2],其导致肺组织损伤和肺功能障碍的潜在机制仍不清楚。有研究^[3]表明,ARDS 患者体内中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps NETs)水平明显升高,且外周血及支气管肺泡灌洗液中高水平的 NETs 通常与较差的预后相关。巨噬细胞 1 抗原(macrophage-1 antigen, MAC-1)是 $\beta 2$ 整合素中的一员,主要存在于中性粒细胞表面。活化 MAC-1 受体可刺激中性粒细胞通过 NADPH 氧化酶产生大量活性氧^[4],同时 NETs 的生成也部分依赖 NADPH 氧化酶途径^[5],但目前关于 MAC-1 对 NETs 的生成作用尚不明确。本研究旨在探讨新生儿 ARDS 中 NETs 与 MAC-1 的相关性及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2022 年 11 月至 2023 年 10 月江苏大学附属医院收治的 32 例新生儿 ARDS 患儿为 ARDS 组,并根据病情分为轻度组($n=12$)、中度组($n=11$)及重度组($n=9$);另选同期 24 例新生儿黄疸患儿为对照组。本研究经医院伦理委员会审核批准,患儿家长均签署知情同意书。ARDS 组和对照组患儿一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。纳入标准:新生儿 ARDS 符合 2017 年蒙特勒诊断标准^[6]。排除标准:(1)与 ARDS 有不同病理生理基础的新生儿呼吸窘迫综合征;(2)新生儿短暂呼吸增快;(3)先天性肺畸形、肺泡表面活性物质合成相关基因缺陷所致急性呼吸窘迫综合;(4)溶血、感染及遗传代谢等病理因素。

表 1 ARDS 组和对照组患儿一般资料比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

组别	性别		胎龄(周)	出生体质量(g)
	男	女		
对照组($n=24$)	14(58.33)	10(41.67)	38.2 \pm 0.7	3006 \pm 142
ARDS 组($n=32$)	21(65.62)	11(34.38)	37.9 \pm 1.3	3030 \pm 184
t/χ^2 值	0.549		-1.41	-0.528
P 值	0.459		0.163	0.600

1.2 方法

1.2.1 血清学指标检测 入院时抽取患儿静脉血 1 mL,离心,取上层血清于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。采用 PicoGreen 荧光染料法检测游离 DNA(cf-DNA)水平;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆 NS 及肿瘤坏

死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)水平;流式细胞术检测外周血中性粒细胞(PMN)上整合素 MAC-1 水平。

1.2.2 新生儿 ARDS 病情判定标准 轻度为 $4 \leq$ 氧合指数(oxygenation index, OI) < 8 ;中度为 $8 \leq$ OI < 16 ,重度为 OI ≥ 16 。

1.3 观察指标

(1) ARDS 组和对照组 NE、cf-DNA 及 TNF- α 、IL-6 水平;(2) ARDS 不同病情程度患儿血清 NE、cf-DNA 及 TNF- α 、IL-6 水平;(3) ARDS 组和对照组患儿中性粒细胞上 MAC-1 的表达水平;(4) ARDS 组患儿 NE、cf-DNA、MAC-1、TNF- α 及 IL-6 的相关性;(5) 血清 NE、cf-DNA 水平对新生儿 ARDS 的预测价值。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性,以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较行独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验;计数资料以[$n(\%)$]表示,组间比较行独立样本 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关性分析;预测价值采用受试者工作特征(ROC)曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ARDS 组和对照组患儿 NE、cf-DNA、TNF- α 及 IL-6 水平比较

ARDS 组患儿血清 NE、cf-DNA、TNF- α 、IL-6 水平平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 ARDS 组和对照组血清 NE、cf-DNA、TNF- α 及 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NE (pg/mL)	cf-DNA (ng/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
对照组($n=24$)	320.73 \pm 33.41	115.37 \pm 21.71	27.23 \pm 4.04	24.72 \pm 6.09
ARDS 组($n=32$)	352.40 \pm 24.37	147.94 \pm 26.48	51.93 \pm 7.94	47.07 \pm 8.29
t 值	4.14	4.98	17.17	11.29
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 ARDS 组中不同病情患儿血清 NE、cf-DNA、TNF- α 及 IL-6 水平比较

ARDS 组中不同病情患儿血清 NE、cf-DNA、TNF- α 及 IL-6 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),且重度组 $>$ 中度组 $>$ 轻度组。见表 3。

2.3 ARDS 组和对照组患儿中性粒细胞上 MAC-1 的表达水平比较

ARDS 组患儿中性粒细胞 MAC-1 表达水平高

于对照组, 差异有统计学意义 [(30 409. 51 ± 9 140. 35) vs. (16 435. 78 ± 2 597. 08) , $P < 0. 05$] 。

表 3 ARDS 不同病情患儿血清 NE、cf-DNA、TNF- α 及 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NE (pg/mL)	cf-DNA (ng/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
轻度组 (n=12)	321.72 ± 8.10	118.10 ± 10.03	42.86 ± 3.56	38.74 ± 5.05
中度组 (n=11)	355.26 ± 10.95 *	145.10 ± 8.60 *	53.03 ± 5.01 *	46.46 ± 5.08 *
重度组 (n=9)	377.43 ± 9.70 ** #	177.90 ± 11.05 ** #	59.08 ± 4.38 ** #	55.24 ± 4.62 ** #
F 值	18.689	42.069	185.889	93.677
P 值	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05

* $P < 0. 05$, 与轻度组比较; # $P < 0. 05$, 与中度组比较。

2.4 ARDS 组患儿 NE、cf-DNA、MAC-1、TNF- α 及 IL-6 的相关性

相关性分析显示, ARDS 组患儿血清 NE、cf-DNA 与 TNF- α 、IL-6 均呈正相关关系 ($P < 0. 05$); 中性粒细胞上 MAC-1 与 NE 及 cf-DNA 均呈正相关关系 ($P < 0. 05$)。见表 4。

表 4 ARDS 组患儿 NE、cf-DNA、MAC-1、TNF- α 及 IL-6 的相关性

	NE		cf-DNA	
	r 值	P 值	r 值	P 值
TNF- α	0.073	0.036	0.784	0.021
IL-6	0.068	0.044	0.381	0.032
MAC-1	0.293	0.031	0.654	0.017

2.5 血清 NE、cf-DNA 水平对新生儿 ARDS 的预测价值

ROC 曲线分析显示, NE、cf-DNA 水平均对新生儿 ARDS 有预测价值 ($P < 0. 05$)。见表 5。

表 5 血清 NE、cf-DNA 水平对新生儿 ARDS 的诊断价值

指标	AUC 值	约登指数	敏感度	特异度	截断值
NE	0.765	0.456	0.656	0.80	347.50 pg/mL
cf-DNA	0.821	0.465	0.625	0.84	138.17 ng/mL

3 讨论

ARDS 是由多种因素参与的危重症疾病, 特征表现为急性发作的肺组织损伤和肺功能障碍。新生儿 ARDS 受早产、胎膜早破、胎粪吸入及宫内窘迫等围生期因素影响, 且不同个体间的肺功能、肺发育程度及免疫功能也存在生理性差异^[7-8]。因此新生儿 ARDS 在病因、临床表现、治疗及预后方面均有其特殊性, 临床病症往往更严重, 具有更长的病程和更高的病死率。寻找新的生物标志物对疾病进行早期的诊断及严重程度的评估, 并采取有效的预防措施, 对

降低 ARDS 并发症的发生及病死率具有重要意义。

NETs 是一种中性粒细胞胞外的网状结构, 由 cf-DNA、组蛋白、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、过氧化物酶 (MPO) 及钙卫蛋白等组成。一方面 NETs 可通过直接清除病原体、限制炎症扩散及免疫调节来发挥保护作用; 另一方面累积的 NETs 又有损伤上皮细胞、促进炎性因子分泌及促进血小板聚集血栓形成等不良反应^[9]。NETs 参与脓毒症、肺炎等多种疾病的发生发展过程, 危重患者的外周血及支气管肺泡灌洗液中 NETs 水平明显升高, 且通常与较差的预后相关。在受到损伤或毒素刺激后, NETs 及各种炎性因子 (如 TNF- α 、IL-6 及 IL-12 等) 也由此大量产生。过量的 NETs 可通过 NE 及髓过氧化物酶 (MPO) 的细胞毒性作用直接破坏气血屏障结构, 而过度产生的炎性因子及活性氧 (ROS), 可导致细胞因子风暴和严重肺损伤, 导致气血屏障的破裂, 肺屏障的损伤又进一步促使炎症细胞更多地外渗到肺泡中, 从而加剧炎症状态并导致组织损伤, 在炎症级联反应和气血屏障破裂之间形成恶性循环^[10-11]。目前在多种疾病中均发现有 NETs 的参与, 通过测量 NETs 中的蛋白成分和 DNA 复合物可间接反映 NETs 含量。本课题组前期研究^[12]发现, 急性肺损伤小鼠模型肺泡灌洗液中 NETs 水平较正常小鼠模型明显升高, 且肺组织炎性因子 TNF- α 及 IL-6 水平上升明显, 加重肺部炎症, 而经 DNA 酶处理治疗后, 观察发现肺部炎症较前减轻, 且 NETs 水平及炎症指标均较前好转, 证明 NETs 及 TNF- α 、IL-6 等炎性因子影响肺损伤的发生发展, 且与肺部严重程度具有一定相关性。

本研究结果显示, ARDS 组患儿血清 cf-DNA 及 NE 水平高于对照组 ($P < 0. 05$), 分别从细胞水平及血清水平提示 ARDS 新生儿 NETs 含量升高, 与本课题组前期研究结果相符^[13-14]。且随着病情程度的加重, 患儿血清 cf-DNA 及 NE 水平也随之上升 ($P < 0. 05$), 血清 TNF- α 及 IL-6 水平也有同样表现。相关性分析显示, 血清 NE 与 cf-DNA 水平与 TNF- α 、IL-6 均呈正相关关系 ($P < 0. 05$), 考虑 NETs 与 TNF- α 、IL-6 在新生儿 ARDS 的发展过程中相互堆叠促进, 加剧机体炎症反应, 加重肺损伤程度。ROC 分析也显示, 血清 NE 与 cf-DNA 水平对新生儿 ARDS 的诊断均有一定价值 ($P < 0. 05$)。

MAC-1 是 $\beta 2$ 整合素中的一员, 在机体中发挥着抗炎和免疫调节作用, 具有广泛的配体识别特性^[15]。有研究^[16]发现, 激活的 MAC-1 可通过下游

的 ROS 生成激活 Src 激酶 Syk 和 PI3k- δ , 触发 NETs 的生成。NETs 会导致自身免疫复合物的增加, MAC-1 可协同 Fc γ RIIIB 受体激活, 以 Src/Syk 通路的信号传导方式增强氧化应激反应, 诱导 NETs 形成^[17]。因此不同配体激活下的 MAC-1 所参与的细胞因子调节通路也大相径庭, 但本质上仍是以生成 ROS 为核心。除以上途径, 还推测当炎症反应发生后, 激活的 MAC-1 可通过 NADPH 氧化酶产生大量活性氧, 以经典的 Raf-MEK-ERK 和 p38-MAPK 生成通路参与到 NETs 的形成释放中。生成的 NETs 中 MPO 一方面可上调细胞表面 MAC-1 的表达水平, 另一方面又作为配体与 MAC-1 结合导致 PI3K/Akt、p38 MAPK、MAPK/ERK 等通路的激活, 促进 NETs 的生成, 二者相互堆叠, 放大炎症反应。本研究结果也表明, ARDS 组患儿外周血中性粒细胞上 MAC-1 呈现过表达 ($P < 0.05$), 且血清 NETs 水平与 MAC-1 呈正相关 ($P < 0.05$)。MAC-1 在中性粒细胞发挥功能中具有重要意义, 过去常认为 MAC-1 发挥抗炎、抗感染作用。本研究表明 MAC-1 还发挥促进 NETs 生成及放大炎症反应的作用, 能否成为抗炎治疗的靶点, 仍有待挖掘研究。

综上, 新生儿 ARDS 患儿 NETs、TNF- α 、IL-6 及 MAC-1 均呈高表达, 且病情越重 NE、cf-DNA 及 TNF- α 、IL-6 水平越高, 同时 NE 及 cf-DNA 与 TNF- α 、IL-6 及 MAC-1 均呈正相关关系, 临床可通过监测 NE、cf-DNA 水平来评估新生儿 ARDS 病情严重程度。

参考文献

- [1] De Luca D, Tingay DG, van Kaam AH, *et al.* Epidemiology of neonatal acute respiratory distress syndrome: prospective, multicenter, international cohort study [J]. *Pediatric Critical Care Medicine; a Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 2022, 23 (7): 524 - 534.
- [2] Lv D, Xu Y, Cheng H, *et al.* A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries [J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 394 (2): 112101.
- [3] Grégoire M, Uhel F, Lesouhaitier M, *et al.* Impaired efferocytosis and neutrophil extracellular trap clearance by macrophages in ARDS [J]. *The European Respiratory Journal*, 2018, 52 (2): 1702590.
- [4] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532 - 1535.
- [5] Song C, Li H, Li Y, *et al.* NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization [J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 382 (2): 111486.
- [6] De Luca D, van Kaam AH, Tingay DG, *et al.* The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity [J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2017, 5 (8): 657 - 666.
- [7] 刘慧, 伍莉, 吴芳, 等. 新生儿急性呼吸窘迫综合征的母孕期高危因素分析 [J]. *重庆医学*, 2021, 50 (1): 54 - 57, 62.
- [8] Willis GR, Mitsialis SA, Kourembanas S. "Good things come in small packages": application of exosome-based therapeutics in neonatal lung injury [J]. *Pediatric Research*, 2018, 83 (1 - 2): 298 - 307.
- [9] Pastor B, Abraham JD, Pisareva E, *et al.* Association of neutrophil extracellular traps with the production of circulating DNA in patients with colorectal cancer [J]. *iScience*, 2022, 25 (2): 103826.
- [10] Zhang H, Wang Y, Qu M, *et al.* Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis [J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2023, 13 (1): e1170.
- [11] D'Alessandro M, Conticini E, Bergantini L, *et al.* Neutrophil extracellular traps in ANCA-associated vasculitis and interstitial lung disease: a scoping review [J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2022, 12 (2): 317.
- [12] 徐苏晴, 常明, 宓兰兰, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在新生大鼠急性肺损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36 (5): 913 - 917, 923.
- [13] 相虹, 吴泽明, 陈海, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在新生儿急性呼吸窘迫综合征中的表达及意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2023, 25 (4): 357 - 361.
- [14] 吴泽明, 朱海金, 陈海, 等. NETs 在急性呼吸窘迫综合征新生儿中的变化及意义 [J]. *医学研究杂志*, 2023, 52 (7): 152 - 156.
- [15] Maronek M, Gromova B, Liptak R, *et al.* Extracellular DNA correlates with intestinal inflammation in chemically induced colitis in mice [J]. *Cells*, 2021, 10 (1): 81.
- [16] Sekheri M, Othman A, Filep JG. $\beta 2$ integrin regulation of neutrophil functional plasticity and fate in the resolution of inflammation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 660760.
- [17] Behnen M, Leszczek C, Möller S, *et al.* Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via Fc γ RIIIB and Mac-1 [J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md; 1950)*, 2014, 193 (4): 1954 - 1965.

(收稿日期: 2024 - 03 - 30

修回日期: 2024 - 04 - 09)