

## 极低出生体重儿支气管肺发育不良血清敏感标志物的研究

程怀平,田兆方\*,赵 赛,杨丽娟,唐 云,包天平

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科,江苏 淮安 223300)

**[摘要]** **目的:**通过对极低出生体重(very low birth weight, VLBW)患儿血清的可溶性晚期糖基化终产物受体(soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE)、内源性分泌型 RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE)、肺表面活性蛋白 D (surfactant protein D, SP-D)、Clara 细胞蛋白 16 (clara cell 16 kD protein, CC-16) 等血清标志物水平与支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的相关性研究,以期找到早期评估 BPD 发生可能性及严重程度的敏感指标。**方法:**选取极低出生体重儿 60 例,在生后 48 h 内留取血清,ELISA 法测定 sRAGE、esRAGE、SP-D、CC-16 等血清标志物水平,同时记录患儿 BPD 发生情况及程度,统计学分析血清学指标与 BPD 发生及程度的相关性。**结果:**①与非 BPD 组患儿相比,BPD 组患儿血清 sRAGE、esRAGE 水平明显增高( $P$  均  $< 0.01$ );而 SP-D、CC-16 水平差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ );②BPD 患儿中,sRAGE、esRAGE 在轻度、中度及重度组间差异也有统计学意义;③血清 sRAGE、esRAGE 水平与患儿胎龄没有相关性。**结论:**血清 sRAGE、esRAGE 可以作为 VLBW 患儿发生 BPD 及严重程度的一个早期评估指标。

**[关键词]** 极低出生体重儿;支气管肺发育不良;RAGE

**[中图分类号]** R725.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)10-1421-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20151019

## Research on serum biomarkers in very low birth weight infants with bronchopulmonary dysplasia

Cheng Huaiping, Tian Zhaofang\*, Zhao Sai, Yang Lijuan, Tang Yun, Bao Tianping

(Department of Neonatology, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** We aimed to explore sensitive serum biomarkers for the early evaluation of the occurrence and severity of bronchopulmonary dysplasia (BPD) by investigating the correlation between BPD and serum biomarkers including serum soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE), surfactant protein D (SP-D) and Clara cell 16 KD protein (CC-16) in the very low birth weight infants (VLBW). **Methods** The levels of sRAGE, esRAGE, SP-D and CC-16 in serum in 60 VLBW infants were detected by ELISA within 48 hours after birth. Meanwhile, we recorded their occurrence and valued the severity of BPD. Then we used statistical methods to analyze the correlation between serum biomarkers and the incidence and degree of BPD. **Results:** Compared with the normal control group, the levels of serum sRAGE and esRAGE increased significantly ( $P < 0.01$ ) in the BPD group, while there was no significant difference in SP-D and CC-16 levels ( $P > 0.05$ ). Additionally, the serum levels of sRAGE and esRAGE also showed statistic significance among the mild, moderate and severe BPD groups. Serum levels of sRAGE and esRAGE were not associated with gestational age. **Conclusion:** Serum levels of sRAGE and esRAGE can be early serum biomarkers for the occurrence and severity of BPD in VLBW infants.

**[Key words]** very low birth weight infants; bronchopulmonary dysplasia; receptor for advanced glycation end products

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1421-1424]

**[基金项目]** 江苏省临床医学专项(BL2014063);淮安市应用研究与科技攻关(HAS2014010)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lyh0729@163.com

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿、尤其是小早产儿呼吸系统常见疾病,具有独特的临床、影像学及组织学特征,1967年 Northway 等<sup>[1]</sup>首次报道并命名。目前研究普遍认为肺发育同患儿胎龄密切相关,国外研究报道随胎龄增加 BPD 发病率明显降低<sup>[2]</sup>,但同时有研究发现极低出生体重(very low birth weight, VLBW)也是 BPD 发病的独立高危因素<sup>[3]</sup>。由于该病辅助用氧时间长、病死率高,存活者常遗留高反应性气道疾病、反复下呼吸道感染、喂养困难、生长发育迟缓等,因此已成为新生儿重症监护室(NICU)最为棘手的问题之一,也是婴幼儿期慢性呼吸系统疾病的主要病因,严重影响早产儿存活率及生活质量,并给家庭和社会带来沉重的负担。近年来,随着我国围产医学的发展,早产儿,尤其是极低出生体重儿、超低出生体重儿的存活率增加,BPD 发病率有逐年上升的趋势,但目前对于 BPD 仍缺乏能早期诊断、反映病情严重程度的特异性实验室指标。

晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)特异性受体(RAGE)在人体内主要存在 3 种类型:全长型 RAGE、可溶型 RAGE(sRAGE)、内源性分泌型 RAGE(endogenous secretory RAGE, esRAGE)。sRAGE 由全长型 RAGE 经金属蛋白酶水解产生,esRAGE 经 mRNA 选择性剪切后表达分泌至细胞外。RAGE 是免疫球蛋白超家族中一种跨膜模式识别受体,在人体所有细胞表面均有低水平表达,但在生理状态下 RAGE 仅在肺部表达丰富,分布于 I 型肺泡上皮细胞基底侧细胞膜<sup>[4]</sup>。Calfee 等<sup>[5]</sup>通过检测急性肺损伤(ALI)患者血浆 RAGE 浓度发现,血浆 RAGE 基线浓度越高,临床和放射学肺损伤评分越高,死亡风险增加。Uchida 等<sup>[6]</sup>构建盐酸与脂多糖肺损伤模型,提示 ALI 患者血浆 RAGE 主要来源于肺组织,能特异性反映肺泡上皮细胞损伤。我们前期 BPD 动物模型显示肺泡灌洗液中 sRAGE 发生变化,与肺泡损伤程度相关<sup>[7]</sup>;而采用腹腔注射脂多糖(LPS)诱导的新生动物的急性肺损伤程度与血清和肺泡灌洗液中 RAGE 及 sRAGE 的水平也密切相关,这提示 RAGE(sRAGE)有可能在新生儿急性肺损伤的诊断和预后评估中也具有重要价值<sup>[8]</sup>。

本研究同时选择了肺表面活性蛋白 D(surfactant protein D, SP-D)<sup>[9-10]</sup>、Clara 细胞蛋白 16(clara cell 16 kD protein, CC-16)<sup>[11-12]</sup>等目前研究较多的反映肺损伤的血清学标志物,以期对临床 BPD 的早期诊断提供指导作用。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

经医院伦理委员会审核通过,选择 2014 年 1 月—2015 年 3 月在南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科住院的 VLBW 患儿(出生体重 1 000~1 499 g)65 例(其中 5 例存活 <28 d,未纳入最终分组),家属签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标本留取与检测

所有患儿在生后 48 h 内抽取外周静脉血 2 mL,置于血清分离试管中,3 000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,分装入试管,标记相关信息,放置于 -70℃ 冰箱低温冻存,检测前 1 d 4℃ 下溶解,通过 ELISA 法检测血清中 sRAGE、esRAGE、SP-D、CC-16 水平。人 sRAGE ELISA 试剂盒、人 esRAGE ELISA 试剂盒(Cell Signaling Technology 公司,美国);人 SP-D ELISA 试剂盒、人 CC-16 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

#### 1.2.2 BPD 诊断标准及分度

BPD 的诊断标准采用 2000 年 6 月美国国立儿童健康与人类发展研究院(NICHHD),国立心脏、肺和血液研究院及少见疾病委员会共同举办的 BPD 研讨会上提出的标准<sup>[13]</sup>,即 BPD 是指任何氧依赖(>21%) $\geq$ 28 d 的新生儿。临床分度:如患儿胎龄 <32 周,根据校正胎龄 36 周或出院时需氧浓度进行分度;如胎龄  $\geq$ 32 周,根据生后 56 d 或出院时需氧浓度进行分度:①轻度:未用氧;②中度:FiO<sub>2</sub> <30%;③重度:FiO<sub>2</sub>  $\geq$ 30%或需机械通气。肺部 X 线表现不作为疾病严重性的评估依据。

#### 1.2.3 评价方法

为研究与 BPD 发生的相关性,按是否发生 BPD,分为 BPD 组和非 BPD 组,对两组间所有血清学标志物水平进行比较;根据 BPD 临床分度,将 BPD 患儿分为轻度 BPD 组、中度 BPD 组和重度 BPD 组,对 3 组间血清学标志物水平进行比较;最后利用统计学软件,对 60 例患儿胎龄及血清标志物水平进行相关分析。

### 1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS13.0 对数据进行统计分析,计量资料采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本间比较采用样本均数 *t* 检验;多样本间均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *q* 检验;胎龄与血清 sRAGE、esRAGE 水平之间的关系均采用 Pearson

相关分析,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BPD 组与非 BPD 组血清学标志物水平比较

与非 BPD 组相比, BPD 组患儿血清 sRAGE、esRAGE 水平显著增高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 而两组患儿血清 SP-D、CC-16 水平无显著差异 ( $P$  均  $> 0.05$ , 表 1)。

### 2.2 不同分度 BPD 患儿血清 sRAGE、esRAGE 水平比较

不同分度 BPD 间血清 sRAGE、esRAGE 水平的差异均存在统计学意义 ( $P$  均  $< 0.001$ ); 组间比较显示轻度 BPD 组 vs. 中度 BPD 组、中度 BPD 组 vs. 重度 BPD 组间在 sRAGE、esRAGE 等指标方面差异均有显著性 ( $P$  均  $< 0.05$ , 表 2)。

### 2.3 胎龄与血清 sRAGE、esRAGE 水平相关性分析

Pearson 相关分析结果显示, 胎龄与血清 sRAGE、esRAGE 水平之间无相关性 ( $r_1=0.171, P=0.191; r_2=0.174, P=0.185$ )。

表 1 BPD 组与非 BPD 组血清学标志物水平比较

组别	例数	sRAGE(pg/mL)	esRAGE(pg/mL)	SP-D(pg/mL)	CC-16(ng/mL)
BPD 组	41	1 652.0 $\pm$ 383.2	1 004.0 $\pm$ 227.0	212.0 $\pm$ 19.3	10.0 $\pm$ 0.9
非 BPD 组	19	891.5 $\pm$ 108.5	549.0 $\pm$ 64.6	202.3 $\pm$ 16.0	9.9 $\pm$ 1.2
<i>t</i> 值		8.466	8.542	1.896	0.598
<i>P</i> 值		$< 0.001$	$< 0.001$	0.063	0.552

表 2 不同分度 BPD 患儿血清 sRAGE、esRAGE 水平比较  
Table 2 The levels of sRAGE and esRAGE in serum in three groups with different degree of BPD

组别	例数	sRAGE(pg/mL)	esRAGE(pg/mL)
轻度 BPD 组	11	1 215.0 $\pm$ 80.5	761.2 $\pm$ 55.0
中度 BPD 组	16	1 548.4 $\pm$ 119.0*	934.5 $\pm$ 84.2*
重度 BPD 组	14	2 115.0 $\pm$ 156.6**	1 274.0 $\pm$ 116.7**
<i>F</i> 值		168.1	105.9
<i>P</i> 值		$< 0.001$	$< 0.001$

与轻度 BPD 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与中度 BPD 组比较, \*\* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

BPD 由 Northway 等于 1967 年首次提出, 认为本病常继发于有严重呼吸窘迫综合征(RDS)的早产儿, 并将此命名为传统 BPD。然而随着产前类固醇激素的应用, 肺表面活性物质(PS)替代治疗及机械通气方式的改进, 目前更为常见的是一种新型 BPD, 多发生于胎龄 30 周左右的 VLBW, 出生时仅有轻度或无肺部疾病, 不需给氧或仅需低浓度氧, 住院期间逐渐出现氧依赖, 持续时间超过校正胎龄 36 周。临床和实验研究发现, 新型 BPD 可能是宫内感染引起的炎症介质损伤和肺发育改变的共同结果<sup>[14]</sup>。即使在传统 BPD 中, 近来研究发现, 引起肺损伤的原因也是炎症, 而机械通气等只是促进炎症的因素<sup>[15]</sup>。

RAGE 属于广泛表达于细胞表面的免疫球蛋白超家族多配体受体成员, 通过与不同配体结合发挥多种生物学效应, 参与糖脂代谢、细胞增殖与分化、炎症反应等生理病理过程<sup>[16-17]</sup>。而作为一种诱饵受

体, sRAGE 游走于循环中可竞争结合 RAGE 的配体, 抑制下游信号的传递, 从而保护效应细胞免受配体-RAGE 轴过度活化导致的不利影响, 其在多种疾病发生发展过程中的积极意义已初见端倪。比如 Cohen 等<sup>[18]</sup>发现严重创伤早期患者血液中凝血系统和补体系统激活的同时伴有 sRAGE 释放; Romero 等<sup>[19]</sup>的研究表明羊水中 sRAGE 和 esRAGE 水平与感染和炎症相关。而 RAGE 在急性肺损伤(ALI)时也具有重要作用, 当各种因素导致 I 型肺泡上皮细胞损伤时, RAGE 的胞外段经蛋白水解从 RAGE 分子上裂解下来, 形成 sRAGE, 后者通过受损的肺泡壁和毛细血管壁进入肺泡水肿液和循环系统中, 并能够被检测到<sup>[6]</sup>。国外临床研究显示有较高 sRAGE 血浆基础水平的 ALI 患者病情较重, 机械通气对潮气量的需求增加, 且预后较差<sup>[5]</sup>。目前对于 BPD 与 RAGE 的关系还没有报道, 本研究发现, 相比较于非 BPD 患儿, BPD 患儿早期血清 sRAGE、esRAGE 水平明显升高; 且 BPD 患儿中, sRAGE、esRAGE 水平较高的患儿, 其发生 BPD 的程度也较重。这提示我们, BPD 患儿早期即可能存在不同程度的肺损伤, 或者存在宫内感染继而导致 BPD 的发生, 具体机制还有待进一步研究证实。本研究还发现, 在 VLBW 中, 胎龄与患儿血清 sRAGE、esRAGE 水平之间并无明显相关性, 这说明 sRAGE、esRAGE 可以作为一个独立的特异性指标, 来评估该群体 BPD 发生的风险。

综上所述, 血清 sRAGE、esRAGE 可以考虑作为预测 VLBW 发生 BPD 及严重程度的特异性指标。当然由于本研究样本量偏小, 且未能检测肺泡灌洗

液中的 sRAGE、esRAGE 水平,存在一定局限性。今后可扩大样本,并可以检测不同病程时期 sRAGE、esRAGE 水平,更加深入地研究 sRAGE、esRAGE 与 BPD 之间的相关性。

#### [参考文献]

- [1] Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia[J]. *N Engl J Med*, 1967, 276(7): 357-368
- [2] Egretau L, Pauchard JY, Semama DS, et al. Chronic oxygen dependency in infants born at less than 32 weeks' gestation; incidence and risk factors [J]. *Pediatrics*, 2001, 108(2): E26-31
- [3] Bhering CA, Mochdece CC, Moreira ME, et al. Bronchopulmonary dysplasia prediction model for 7-day-old infants[J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2007, 83(2): 163-170
- [4] Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells[J]. *Genes Cells*, 2004, 9(2): 165-174
- [5] Calfee CS, Parsons P, Matthay M, et al. Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury[J]. *Thorax*, 2008, 63(12): 1083-1089
- [6] Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(9): 1008-1015
- [7] Tian ZF, Li YH, Ji P, et al. Mesenchymal stem cells protects hyperoxia-induced lung injury in newborn rats via inhibiting receptor for advanced glycation end-products/nuclear factor  $\kappa$ B signaling[J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(2): 242-247
- [8] 俞敏, 赵赛, 程怀平, 等. RAGE 与腹腔注射 LPS 诱导新生大鼠急性肺损伤的相关性研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(8): 1051-1055
- [9] Ryckman KK, Dagle JM, Kelsey K, et al. Genetic associations of surfactant protein D and angiotensin-converting enzyme with lung disease in preterm neonates[J]. *J Perinatol*, 2012, 32(5): 349-355
- [10] Eisner MD, Parsons P, Matthay MA, et al. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury[J]. *Thorax*, 2003, 58(11): 983-988
- [11] Determann RM, Millo JL, Waddy S, et al. Plasma CC16 levels are associated with development of ALI/ARDS in patients with ventilator-associated pneumonia; a retrospective observational study[J]. *BMC Pulm Med*, 2009, 9: 49
- [12] Schrama AJ, Bernard A, Poorthuis BJ, et al. Cord blood Clara cell protein CC16 predicts the development of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Eur J Pediatr*, 2008, 167(11): 1305-1312
- [13] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(7): 1723-1729
- [14] Viscardi RM. Perinatal inflammation and lung injury[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012, 17(1): 30-35
- [15] Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2006, 11(5): 354-362
- [16] Jing R, Cui M, Wang J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) soluble form (sRAGE) a new biomarker for lung cancer [J]. *Neoplasma*, 2010, 57(1): 55-61
- [17] Herold K, Moster B, Chen Y, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress[J]. *Leukoc Biol*, 2007, 82(2): 204-212
- [18] Cohen MJ, Carles M, Brohi K, et al. Early release of soluble receptor for advanced glycation endproducts after severe trauma in humans[J]. *J Trauma*, 2010, 68(6): 1273-1278
- [19] Romero R, Espinoza J, Hassan S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation [J]. *J Perinat Med*, 2008, 36(5): 388-398

[收稿日期] 2015-07-15