

肺炎支原体肺炎与肺表面活性物质相关蛋白 A 的相关性研究

黄霞,赵德育,王全,刘峰,梁慧*

(南京医科大学附属儿童医院呼吸内科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨肺表面活性物质相关蛋白 A(surfactant protein-A,SP-A)在肺炎支原体肺炎(*Mycoplasma pneumoniae pneumonia*,MPP)中的作用及临床意义。方法:收集 2014 年 1 月 1 日—2015 年 12 月 31 日在南京医科大学附属儿童医院住院的肺炎患儿共 51 例;其中 MPP 患儿 41 例,分别为 MPP 组 15 例,MPP 伴肺不张组 26 例,同时设立同期入院非支原体感染的普通肺炎 10 例为对照组,采用 ELISA 法检测各组患儿血清和肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中 SP-A 含量,逆转录聚合酶链反应方法(RT-PCR)检测血清 SP-A mRNA 相对表达情况。结果:①MPP 组、MPP 伴肺不张组血清、BALF 中 SP-A 蛋白水平均低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),但 MPP 组、MPP 伴肺不张组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。②MPP 组及 MPP 伴肺不张组血清 SP-A 含量及 mRNA 水平与 BALF 中 SP-A 蛋白含量均呈正相关($r=0.42, P=0.01; r=0.41, P=0.04$)。③MPP 伴肺不张组血清、BALF 中 SP-A 含量及血清 SP-A mRNA 水平与肺复张时间无明显相关性(P 值均 >0.05)。结论:MPP 患儿血清、BALF 中 SP-A 蛋白含量明显下降,MPP 中可能存在肺泡 II 型细胞损伤,SP-A 的替代治疗或促进 SP-A 生成的治疗对 MPP 的恢复将有一定意义。

[关键词] 肺表面活性物质;肺炎支原体;肺不张;儿童

[中图分类号] R725.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-719-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170613

Relationship between surfactant protein-A and *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*

Huang Xia, Zhao Deyu, Wang Quan, Liu Feng, Liang Hui*

(Department of Respiratory, Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of surfactant protein A(SP-A) in children with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* (MPP). **Methods:** A total of 51 inpatients diagnosed as pneumonia in Children's Hospital Affiliated to NJMU were selected in the period from 2014-1-1 to 2015-12-30. Among the 51 patients, 41 were MPP patients, and divided into the MPP group(15 cases) and the MPP with atelectasis (MPPA) group (26 cases); the 10 non-MP-induced pneumonia cases during the same period were selected as the control group. The protein levels of SP-A in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured in each group by ELISA. The mRNA levels of SP-A in serum were tested with RT-PCR. **Results:** ① The protein levels of SP-A (both the MPP and the MPPA group) were significantly decreased compared with the levels in the control group ($P<0.05$); However, there was no significance of protein level of SP-A between the MPP and the MPPA group ($P>0.05$). ② The protein and mRNA levels of SP-A in serum were positive relatively with those in BALF ($r=0.42, P=0.01; r=0.41, P=0.04$). ③ The protein and mRNA levels of SP-A showed no correlation with the time of pulmonary re-expansion both in the MPP and the MPPA groups(both $P>0.05$). **Conclusion:** Patients with MPP have decreased SP-A levels in serum and BALF. SP-A levels reflect alveolar type II epithelial cell injury potentially, and thus surfactant replacement or increasing SP-A generation might be efficacious for the treatment of MPP.

[Key words] pulmonary surfactant; *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*; pulmonary atelectasis; children

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(06):719-722]

肺炎支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP) 是儿童社区获得性肺炎的常见原因之一, 由肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 感染引起, 其患病率占儿童肺炎的 4%~39%^[1]。

近年 MPP 伴肺不张的报道引起人们关注, 儿童因其肺发育尚不完善, 肺不张更加常见^[2], 住院患儿中 MPP 伴肺不张的发病率为 10.3%, 而在难治性 MPP 中占 26.2%^[3-4]。

肺表面活性物质相关蛋白(surfactant protein, SP), 包括大分子亲水性的肺表面活性物质相关蛋白 A (surfactant protein A, SP-A)、SP-D 和小分子疏水性

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(201108012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 18951769057@189.com

的 SP-B、SP-C,其中以 SP-A 含量最丰富,主要由 II 型肺泡上皮细胞合成分泌,属 C 型凝集素家族成员^[5]。研究证明 SP-A 在肺部免疫应答中发挥重要作用^[6-7],在 MP 感染时对机体有保护作用^[8-10],但 SP-A 与 MPP 伴肺不张的关系尚不明确。本研究通过对 MPP 患儿肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 及血清中的 SP-A 进行测定,探讨 SP-A 在 MPP 伴肺不张中的可能作用及临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象

入组标准:肺炎诊断参照中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的儿童社区获得性肺炎管理指南:①新近出现的咳嗽、咳痰,伴或不伴有胸痛;②发热;③肺部实变体征和(或)闻及湿啰音;④胸部 X 线检查显示片状、斑片状浸润性阴影或间质性改变,伴或不伴有胸腔积液;⑤MPP 特异性 IgM 测定双份血清(间隔 1~2 周)抗体滴度上升 4 倍;或单份血清特异性 IgG 抗体滴度持续升高>1:160。符合①~③项中任何 1 项加上④和⑤项,并除外其他病原体所致肺部感染、肺部肿瘤和非感染性肺间质性疾病等,确诊 MPP。根据影像学将 MPP 组分为两组,伴肺部不张为 MPP 伴肺不张组,不伴肺不张的为 MPP 组。

排除标准:①免疫缺陷患儿;②合并呼吸道基础疾病者(如原发性纤毛运动障碍、囊性纤维化、先天性支气管肺发育异常、血管环畸形、支气管异物、哮喘、肺结核等);③病原学检查(血培养、胸水培养、肺泡灌洗液培养)证实合并有其他病原感染依据者。

共收集 41 例确诊为 MPP 的住院患儿,其中 MPP 组 15 例, MPP 伴肺不张组 26 例,同时收集 10 例非支原体感染的普通肺炎患儿作为对照组,性别构成比及年龄差异均无统计学意义 (P 均>0.05),3 组资料见表 1。

表 1 各组临床资料比较

Table 1 General information of patients

指标	对照组	MPP 组	MPP 伴肺不张组	P 值
性别(例)				0.37
男	4	8	9	
女	6	7	17	
年龄(岁)	5.00±3.23	6.60±3.23	6.20±2.64	0.40

1.2 方法

1.2.1 血清 SP-A 检测

入选者于清晨抽取空腹静脉血 3 mL, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液置于-20℃冰箱待测。SP-A

检测采用酶联免疫吸附试验(试剂盒由武汉博士德公司提供),严格按说明书进行操作。

1.2.2 BALF 中的 SP-A 检测

正规应用大环内酯类抗菌药物治疗 1 周仍存在肺实变或不张需行支气管镜灌洗者,均取患侧 BALF,同样方法检测 SP-A。

1.2.3 SP-A 基因表达分析

采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术。①总 RNA 的提取:按试剂盒说明书操作。用紫外分光光度计测定 $D(260\text{ nm})$ 值计算 RNA 浓度。②反转录:在 20 μL 反转录反应体系中加入样本 RNA、2 倍缓冲液、25 mmol/L 硫酸镁、寡核苷酸、RNA 酶抑制剂、寡核苷酸引物、逆转录酶,混匀后 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 产物即为 cDNA。③PCR 扩增:在 25 μL 反应体系中加入 cDNA 3 μL 及缓冲液、寡核苷酸、*Taq* DNA 聚合酶和 SP-A 引物进行扩增。引物由华大基因公司合成,引物序列分别为:SP-A 上游 5'-TGAAAGGGAGTTC-TAGCATCTCACAGA-3'; 下游 5'-ACATATGCC-TATGTAGGCCTGACTGAG-3'; β -actin 上游 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; 下游 5'-CTC-CTTAATGTCACGCACGATTT-3'; 扩增产物分别为 216 bp 和 530 bp。SP-A PCR 扩增条件:50℃ 30 min, 94℃ 1 min, 45 个循环后, 60℃ 1.5 min, 74℃ 2 min。④产物分析:RT-PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果并照相。用凝胶成像分析系统进行电泳条带分析。用 SP-A 扩增产物与 β -actin 扩增产物的吸光度比值表示每个标本的相对 mRNA 水平。

1.2.4 随访

术后随访胸片,由 1 名呼吸科医师和 2 名放射科医师共同读片,肺复张时间通过讨论达成一致意见。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析。所有计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,分析 SP-A 含量在 3 组之间的差异。3 组均值比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK- q 检验,相关性分析采用 Spearman 秩相关系数, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 SP-A 含量

MPP 组为(25.70±6.51) pg/mL, MPP 伴肺不张组为

(2508±621)pg/mL,对照组为(31.01±4.89)pg/mL。MPP 组及 MPP 伴肺不张组均低于对照组 ($P<0.05$),但 MPP 组与 MPP 伴肺不张组之间无明显差异 ($P>0.05$)。

2.2 BALF 中 SP-A 含量

MPP 组为 (33.33±6.56)pg/mL,MPP 伴肺不张组为 (31.13±7.92)pg/mL,对照组为 (42.85±6.06)pg/mL。MPP 组及 MPP 伴肺不张组均低于对照组 ($P<0.05$),但 MPP 组与 MPP 伴肺不张组之间无明显差异 ($P>0.05$)。血清与 BALF 中 SP-A 含量呈正相关 ($r=0.42,P=0.01$)。

2.3 血清 SP-A mRNA 的表达水平

MPP 组血清 SP-A mRNA 相对表达量为 1.29 ± 0.96 ,MPP 伴肺不张组为 1.97 ± 0.9 ,对照组为 3.36 ± 1.09 。MPP 组及 MPP 伴肺不张组均低于对照组 ($P<0.05$),但 MPP 组与 MPP 伴肺不张组之间无明显差异 ($P>0.05$)。血清 SP-A mRNA 表达水平与 BALF 中 SP-A 含量呈正相关 ($r=0.41,P=0.04$)。

2.4 不同部位肺不张患者血清、BALF 中 SP-A 含量及血清 SP-A mRNA 相对表达水平

肺不张部位以右上叶为主,不同部位肺不张患者血清、BALF 中 SP-A 含量及血清 SP-A mRNA 相对表达水平无明显差异 ($P>0.05$,表 2)。术后随访肺不张患儿肺复张时间,其中 5 例随访至 8 周仍未复张,此后失访,余 21 例中位肺复张时间为 3 周(1~15 周)。肺复张时间与血清、BALF 中 SP-A 含量及血清 SP-A mRNA 相对表达水平无明显相关性 ($P>0.05$)。

表 2 肺不张不同部位血清、BALF 中 SP-A 含量及血清 SP-A mRNA 相对表达水平

Table 2 Protein levels of SP-A of different parts of atelectasis in serum and BAL

部位	例数[n(%)]	血清(pg/mL)	BALF(pg/mL)	mRNA
右上	9(34.62)	23.16±4.55	27.38±7.44	2.17±0.09
右中	4(15.38)	28.79±8.70	37.44±3.51	1.93±1.07
右下	2(7.69)	24.51±2.43	32.15±0.42	2.79±1.16
左上	4(15.38)	22.70±5.31	34.32±11.69	2.02±0.65
左下	4(15.48)	23.37±8.48	28.22±2.02	1.85±1.31
多叶	3(11.54)	31.70±2.30	36.32±7.54	0.97±0.87
P 值		0.26	0.17	0.33

3 讨论

MP 侵入人呼吸道后,其尖端可吸附于纤毛上皮细胞受体上,损害上皮细胞,使黏膜的清除功能异常,同时由于气道炎症,支气管黏膜水肿,分泌物堵塞气道致肺不张。MPP 一般临床表现较轻,且对大环内酯类药物敏感,一部分患儿甚至呈自限性病程。

对 MPP 伴肺不张的治疗主要是应用大环内酯类药物、支气管扩张剂、激素、纤维支气管镜等^[11],纤维支气管镜技术在肺不张治疗中发挥重要作用,但是近几年重症 MPP 伴肺不张有明显增加趋势,部分难治性 MPP 合并肺不张经纤维支气管镜反复灌洗治疗后,仍不可能完全复张,甚至导致其他后遗症,如支气管扩张等,使治疗陷入困境。

近来研究表明 SP-A 在 MP 感染时对机体有保护作用。SP-A 通过 MP 表面蛋白 MPN372 及二棕榈磷脂酰甘油结合 MP,抑制其增殖^[8-9],然后通过氮氧化物机制,介导肺泡巨噬细胞杀灭 MP^[10]。同时 SP-A 还可以通过抑制肥大细胞、嗜酸性粒细胞释放炎症因子如 TNF- α 等机制,来抑制过度的促炎反应,从而维持气道稳态^[8,12-13]。但此类研究多为动物实验,SP-A 与人 MPP 伴肺不张的关系尚不明确。

SP-A 产生异常或功能障碍与肺部疾病相关,与此同时肺部感染改变了 SP-A 的新陈代谢。既往研究表明急性呼吸窘迫综合征、特发性肺纤维化、细菌性肺炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病患者 BALF 中 SP-A 含量下降^[14]。舒林华等^[15]发现,病变侧 BALF 中 SP-A 含量显著低于健侧。Nakos 等^[16]检测了 8 例机械通气患者肺不张前、中、后支气管 BALF 中 SP 的变化,发现患侧 SP-A 含量减少。本研究亦提示 MPP 伴或不伴肺不张患者 BALF 中 SP-A 含量下降,但样本量均不多,有待更大样本的研究来证实。

SP-A 主要由 II 型肺泡上皮细胞合成分泌,首先存在于肺泡表面,然后可经肺间质渗漏至循环中,循环中的 SP-A 亦具有重要临床意义。本研究中 MPP 患儿血清 SP-A 含量下降,且血清 SP-A mRNA 的表达水平亦低于对照组,提示 MPP 中 SP-A 生成减少,导致 BALF 及血清中含量均减少,这也间接提示 MPP 可能存在 II 型肺泡上皮细胞的损伤,SP-A 分泌减少,造成局部免疫应答减弱,肺泡表面张力下降,从而可能造成肺不张。故测定 BALF 及血清 SP-A 含量可间接反映气管上皮损伤。近期研究发现慢性阻塞性肺疾病急性加重患者血清 SP-D 含量高于静止期患者及健康对照组^[17-18],提出 SP-D 可预测慢性阻塞性肺疾病恶化。故希望后续能进一步增加样本数量,并联合检测 MPP 患儿血清、BALF 中的 SP-D 含量,观察肺表面活性物质与 MPP 的相关性。

本研究发现 MPP 肺不张以右上肺为主,这与张永明等^[3]报道符合,MPP 组与 MPP 伴肺不张组血清、BALF 中 SP-A 含量差异无统计学意义,可能与样本量少有关,但至少可以说明 MPP 中可能存在 SP-A

生成减少。本研究未发现肺复张时间与血清、BALF中SP-A含量及血清SP-A mRNA相对表达水平存在相关性,尚需进一步研究观察。外源性肺表面活性物质的替代治疗目前广泛应用于早产儿呼吸窘迫综合征,主要通过气道内给药。肺表面活性物质已试用于成人急性呼吸窘迫综合征,通过气道滴入或雾化吸入,但疗效不如人意,可能是因为气道炎症和组织重塑存在个体差异^[7]。在其他如哮喘、肺炎、胎粪吸入综合征、肺出血、肺不张、先天性膈疝、支气管肺发育不良等一些肺部疾病中也有应用,在动物研究中,还可用于治疗甲型流感、坏死性小肠结肠炎,但尚有待进一步研究^[7,19]。目前已证明一些药物可增加内源性肺表面活性物质含量,如糖皮质激素、甲状腺激素、氨溴索、羟化氯喹等^[7],但数据有限。

MP感染可能会通过损伤肺泡Ⅱ型上皮细胞,从而影响SP-A的分泌,引起肺不张。SP-A的替代治疗或促进SP-A生成的治疗将有一定意义。

[参考文献]

- [1] Meyer Sauter PM, Unger WW, Nadal D, et al. Infection with and carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in Children [J]. Front Microbiol, 2016, 7:329
- [2] Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Front Microbiol, 2016, 7:513
- [3] 张永明, 刘秀云, 江裁芳. 儿童肺炎支原体肺炎合并肺不张发病率及预后研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2010, 25(2):143-146
- [4] Zhang Y, Zhou Y, Li S, et al. The clinical characteristics and predictors of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. PLoS One, 2016, 11(5):e0156465
- [5] Nayak A, Dodagatta-Marri E, Tsolaki AG, et al. An insight into the diverse roles of surfactant proteins, SP-A and SP-D in innate and adaptive immunity[J]. Front Immunol, 2012, 3:131
- [6] Nathan N, Taytard J, Duquesnoy P, et al. Surfactant protein A: A key player in lung homeostasis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 81(Pt A):151-155
- [7] Han S, Mallampalli RK. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections[J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(5):765-774
- [8] Ledford JG, Goto H, Potts EN, et al. SP-A preserves airway homeostasis during *Mycoplasma pneumoniae* infection in mice[J]. J Immunol, 2009, 182(12):7818-7827
- [9] Julie G, Ledford, Dennis R, et al. Genetic variation in surfactant protein-A2(SP-A2) leads to differential binding to *Mycoplasma pneumoniae* membranes and regulation of host response[J]. J Immunol, 2015, 194(12):6123-6132
- [10] Hickman-Davisjm H, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, et al. Role of surfactant protein-A in nitric oxide production and mycoplasma killing in congenic C57BL/6 mic [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(3):319-325
- [11] Yan Y, Wei Y, Jiang W, et al. The clinical characteristics of corticosteroid-resistant refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. Sci Rep, 2016, 6:39929
- [12] Hsia BJ, Ledford JG, Potts-Kant EN, et al. Mast cell TNF receptors regulate responses to *Mycoplasma pneumoniae* in surfactant protein A (SP-A)^{-/-} mice [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 130(1):205-214
- [13] Ledford JG, Mukherjee S, Kislan MM, et al. Surfactant protein-A suppresses eosinophil-mediated killing of *Mycoplasma pneumoniae* in allergic lungs [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e32436
- [14] Lin XF, Zhang L, Shi SY, et al. Expression of surfactant protein-A in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2):1667-1672
- [15] 舒林华, 刘芬, 尚云晓, 等. 肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液和血清中肺表面活性蛋白的变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(72):928-932
- [16] Nakos G, Tsangaris H, Liokatis S, et al. Ventilator-associated pneumonia and atelectasis: evaluation through bronchoalveolar lavage fluid analysis [J]. Intensive Care Med, 2003, 29(4):555-563
- [17] Ju CR, Liu W, Chen RC. Serum surfactant protein D: biomarker of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Dis Markers, 2012, 32(5):281-287
- [18] Zien Alaabden A, Mohammad Y, Fahoum S, et al. The role of serum surfactant protein D as a biomarker of exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Qatar Med J, 2015, 2015(2):18
- [19] Lopez E, Gascoin G, Flamant C, et al. Exogenous surfactant therapy in 2013: what is next? Who, when and how should we treat newborn infants in the future?[J]. BMC Pediatr, 2013, 13:165

[收稿日期] 2016-08-19