

· 儿科学研究 ·

支气管肺发育不良早产儿外周血清5-脂氧合酶激活蛋白、白三烯C4合成酶及半胱氨酰白三烯受体1的表达研究

张晓洁¹, 李冰洁², 孙中怡², 李淑君², 吴升华², 陈筱青^{2*}

¹南京医科大学第一附属医院检验学部, ²儿科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)及支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)患儿血清中5-脂氧合酶激活蛋白(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)、白三烯C4合成酶(leukotriene C4 synthase, LTC4S)及半胱氨酰白三烯受体1(cysteinyl leukotriene receptor 1, CysLTR1)水平变化的意义,旨在寻找BPD早期敏感的生物学指标。方法:收集2015年8月—2017年12月在南京医科大学第一附属医院儿科收治入院的胎龄<37周、出生体重<2 500 g的新生儿病例。待其出院后根据患儿完整住院信息将病例整理为无肺部疾病的早产儿65例(对照组),不合并BPD的NRDS早产儿60例(NRDS组),BPD早产儿49例(BPD组)。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测新生儿生后3、7、14 d血清中FLAP、LTC4S、CysLTR1水平。比较3组各时间点各指标的浓度水平,采用方差分析、*t*检验及卡方检验等进行统计学分析。结果:生后3 d BPD组血清FLAP、CysLTR1水平均高于对照组和NRDS组(P 均<0.05)。生后7 d BPD组血清FLAP、LTC4S、CysLTR1水平均高于对照组(P 均<0.05),BPD组血清FLAP和CysLTR1水平分别高于NRDS组(P <0.05)。生后14 d BPD组仅血清LTC4S水平高于对照组(P <0.05)。结论:生后3 d血清FLAP、CysLTR1水平,生后7 d血清FLAP、LTC4S和CysLTR1水平,生后14 d血清LTC4S水平可作为BPD早期诊断的生物学指标。

[关键词] 支气管肺发育不良;新生儿呼吸窘迫综合征;5-脂氧合酶激活蛋白;白三烯C4合成酶;半胱氨酰白三烯受体1

[中图分类号] R725.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)03-393-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190316

Research on the expressions of peripheral serum 5 - lipoxygenase activating protein, leukotriene C4 synthase and cysteinyl leukotriene receptor 1 of premature infants with bronchopulmonary dysplasia

Zhang Xiaojie¹, Li Bingjie², Sun Zhongyi², Li Shujun², Wu Shenghua², Chen Xiaoqing^{2*}

¹Department of Laboratory Medicine, ²Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate sensitive biological indicators for early diagnosis of bronchopulmonary dysplasia (BPD) by testing the expressions of 5 - lipoxygenase activating protein (FLAP), leukotriene C4 synthase (LTC4S) and cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLTR1) in serum of premature infants with BPD. **Methods:** Patients of the newborn less than 37 weeks of gestational age and less than 2 500 g of birth weight from the First Affiliated Hospital of NMU were divided into 3 groups based on completed hospitalization information after discharge: premature infants without pulmonary diseases (the control group, $n=65$), premature infants with neonatal respiratory distress syndrome (NRDS) but without BPD (the NRDS group, $n=60$) and premature infants with BPD (the BPD group, $n=49$). Serum levels of FLAP, LTC4S, CysLTR1 of the premature infants were tested by using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) respectively at 3, 7 and 14 days after birth. Statistical analysis was performed by variance analysis, *t*-verification and chi-square test *etc.* to compare the concentrations of 3 groups at different time points. **Results:** Serum levels of FLAP and CysLTR1 of infants with BPD at 3 days after birth were statistically significantly higher than that of NRDS and controls ($P < 0.05$). Serum levels of FLAP, LTC4S and CysLTR1 of infants with BPD at 7 days after birth were significantly higher than that of controls ($P <$

[基金项目] 江苏省妇幼健康科研项目(F201745);江苏省人民医院临床培育项目(2017CX015)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenxq2002@foxmail.com

0.05)。Serum levels of FLAP and CysLTR1 of infants with BPD at 7 days after birth were significantly higher than that of NRDS ($P < 0.05$)。Serum level of LTC4S in infants with BPD at 14 days after birth was higher than that of controls ($P < 0.05$)。Conclusion: Levels of serum FLAP and CysLTR1 of 3 days after birth, levels of FLAP, CysLTR1 and LTC4S of 7 days after birth, and LTC4S level of 14 days after birth may be useful biomarkers for early diagnosis of BPD。

[Key words] bronchopulmonary dysplasia; neonatal respiratory distress syndrome; 5-lipoxygenase activating protein; leukotriene C4 synthase; cysteinyl leukotriene receptor 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(03):393-397]

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿常见的慢性肺部疾病,是诱发慢性呼吸衰竭的主要病因,多发生于生后有新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)且需要高浓度氧气和机械通气的早产儿,其幸存者往往伴有认知与行为障碍等后遗症。近年来随着围产医学的发展,早产儿存活率大大提高,但BPD发病率仍呈上升趋势。虽然BPD的病因和发病机制至今并未完全阐明,但气道炎症仍是其关键致病因素。现已知BPD的病理改变在出生后即发生,而临床上对BPD的诊断仍以出生后持续吸氧 ≥ 28 d为标准,故寻找BPD早期敏感的生物学指标迫在眉睫。有文献提示,包括白三烯在内的异常上调的炎性因子阻碍了正常的肺发育进程,导致肺泡形成障碍和肺泡微血管成熟延迟,加之高浓度吸氧和机械通气所致肺损伤,最终发生BPD^[1]。

本课题组前期研究发现,BPD患儿生后3 d尿半胱氨酸白三烯E4(cysteinyl leukotriene E4, CysLTE4)水平与对照组比较显著升高,且胎龄、出生体重与新生儿生后3 d尿CysLTE4水平呈负相关,截断值为187.7 ng/L时诊断效能最大,提示尿CysLTE4是有早期诊断意义的生物学指标^[2]。此外,近十年来国外已对CysLTE4抑制剂孟鲁司特对BPD的治疗作用进行相关研究,但动物实验及临床实验部分结果尚未得出统一结论。Jouvencel等^[3]通过构建50%氧气诱导的新生大鼠高氧肺损伤模型,发现孟鲁司特[1 mg/(kg·d), s.c.]对高氧引起的肺泡异常发育无抑制作用。Ee等^[4]应用博来霉素诱导新生大鼠BPD模型,发现博来霉素可增加大鼠肺内白三烯B4(leukotriene B4, LTB4)的表达,但对半胱氨酸白三烯(cysteinyl leukotrienes, CysLTs)表达水平无影响,因此孟鲁司特[10 mg/(kg·d), i.p.]对博来霉素诱导的新生大鼠BPD模型无保护作用。Rupprecht等^[5]进行的1项前瞻性研究结果发现,孟鲁司特可降低23~27孕周早产儿重症BPD的病死率和肺部严

重程度评分。Kim等^[6]研究结果表明,生后早期应用孟鲁司特预防性治疗可能发生BPD的早产儿,结果未显示孟鲁司特对中至重度BPD患儿有预防作用,也未出现药物相关不良反应。

综上所述,CysLTE4信号通路在BPD发生发展过程中具有重要作用,但机制尚未明确。因此本研究选择2016年8月—2017年12月南京医科大学第一附属医院收治的新生儿,测定其生后外周血清中与白三烯合成路径相关的5-脂氧合酶激活蛋白(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)、白三烯C4合成酶(leukotriene C4 synthase, LTC4S)及半胱氨酸白三烯受体1(cysteinyl leukotriene receptor 1, CysLTR1)水平,为今后NRDS和BPD的早期诊断提供线索。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究采用病例对照研究,收集2015年8月—2017年12月在南京医科大学第一附属医院儿科收治入院的所有胎龄 < 37 周、出生体重 $< 2 500$ g、存活30 d以上的新生儿病例。待其出院后根据患儿完整住院信息将病例分为:无肺部疾病的早产儿(对照组)65例,无BPD的呼吸窘迫综合征早产儿(NRDS组)60例,BPD早产儿(BPD组)49例。本研究通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(2016-SR-155)。中国临床试验注册中心注册号:ChiCTR-ORN-16008890。

对照组为无肺部疾病、诊断为高胆红素血症和(或)新生儿感染的早产儿。NRDS及BPD的诊断均符合《实用新生儿学》第4版标准^[7]。NRDS组纳入标准:临床和胸部X线证实Ⅲ、Ⅳ级NRDS,需要应用气管插管、呼吸机辅助呼吸的早产儿。BPD组纳入标准:患儿胎龄 < 37 周,住院期间使用过呼吸机进行辅助治疗,生后28 d仍需用氧,胸部X线检查发现双肺透亮度普遍降低,肺充气过度、肺不张、囊泡形成及间质气肿影,严重病例伴肺动脉高压者可显示

肺动脉干影。本研究已告知患儿家属,并签署知情同意书。排除标准:排除严重的以及血流动力学不稳定的先天性心脏病、先天性代谢紊乱或其他严重先天畸形及染色体异常等疾病;临床资料不全、重症感染、临床接受糖皮质激素治疗病例亦予以排除。

1.2 方法

所有住院早产患儿分别于出生后第3、7、14天清晨抽取静脉血2.5 mL,无需抗凝,立即离心10 min (3 000 r/min),取上清液(血清)置于-20℃低温冰箱密封保存待检,避免反复冻融。应用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清FLAP、LTC4S及CysLTR1水平。试剂盒购自南京科华生物技术有限公司,各指标含量测定严格

按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学方法

用SPSS17.0统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD检验。计数资料以例数和构成比表示,组间比较采用卡方检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组基线值比较

各组性别、出生方式(顺产或剖宫产)及胎龄比较,差异无统计学意义。3组出生体重、1 min Apgar评分和5 min评分差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 3组新生儿临床资料比较

Table 1 Comparisons of neonatal clinical data among three groups

指标	对照组(n=65)	NRDS组(n=60)	BPD组(n=49)	χ^2/F 值	P值
性别(例)				3.330 ^a	0.189
男	36	25	28		
女	29	35	21		
出生方式(例)				1.174 ^a	0.556
顺产	32	34	23		
剖宫产	33	26	26		
胎龄(周)	34.700 ± 1.337	33.333 ± 1.803	34.429 ± 2.440	1.414 ^b	0.263
出生体重(g)	2 442.134 ± 727.072	1 570.833 ± 481.352	1 430.000 ± 139.642	1.414 ^b	0.001
1 min Apgar(分)	9.857 ± 0.363	7.167 ± 2.125	7.800 ± 2.683	9.530 ^b	0.001
5 min Apgar(分)	9.929 ± 0.267	8.250 ± 2.050	8.600 ± 1.670	4.675 ^b	0.018

a: χ^2 值, b: F值。

2.2 3组不同时间点血清FLAP水平比较

生后3 d、7 d 3组血清FLAP水平差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中生后3 d, NRDS组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);生后3、7 d, BPD组与各自对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), BPD组与NRDS组比较,差异也均有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

2.3 3组不同时间点血清LTC4S水平比较

生后7 d、14 d 3组血清LTC4S水平差异均有统

计学意义(P 均 < 0.05)。其中, NRDS组与各自对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05); BPD组与各自对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05); NRDS组和BPD组血清LTC4S水平差异都没有统计学意义($P > 0.05$,表3)。

2.4 3组间不同时间点血清CysLTR1水平比较

生后3 d、7 d, 3组血清CysLTR1水平差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。其中, BPD组与对照组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05); BPD组血清

表2 3组不同时间点血清FLAP水平比较

Table 2 Comparisons of serum FLAP levels at different time points among three groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

时间	对照组	NRDS组	BPD组	F值	P值
生后3 d	50.102 ± 13.327	78.641 ± 16.214 [*]	226.550 ± 47.650 ^{*#}	37.570	<0.001
生后7 d	21.651 ± 10.532	35.402 ± 4.882	203.397 ± 69.280 ^{*#}	18.680	0.003
生后14 d	31.935 ± 4.230	49.662 ± 22.716	46.985 ± 10.231	1.427	0.302

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与NRDS组相比, # $P < 0.05$ 。

表3 3组不同时间点血清LTC4S水平的比较

Table 3 Comparisons of serum LTC4S levels at different time points among three groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

时间	对照组	NRDS组	BPD组	F值	P值
产后3 d	187.009 ± 52.037	443.165 ± 186.108	520.596 ± 126.619	4.606	0.053
产后7 d	25.351 ± 9.481	331.307 ± 111.262*	391.228 ± 170.849*	8.320	0.019
产后14 d	53.638 ± 10.054	123.544 ± 35.414*	147.982 ± 34.579*	11.49	0.006

与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

CysLTR1水平与NRDS组比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 ,表4)。

3 讨论

1967年Northway等^[8]首次发现并报道了继发于

严重NRDS并以炎症为主要表现的“经典型BPD”。随着产前糖皮质激素及产后外源性肺泡活性物质的应用,极低出生体重儿存活率大大提高,BPD的总体发病率并未减少,反而有逐步上升趋势,并出现与以往临床特征不同且以肺发育阻滞为主要表

表4 3组不同时间点血清CysLTR1水平的比较

Table 4 Comparisons of serum CysLTR1 levels at different time points among three groups ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

时间	对照组	NRDS组	BPD组	F值	P值
产后3 d	225.329 ± 71.507	270.425 ± 112.465	686.651 ± 235.639*#	11.430	0.003
产后7 d	80.464 ± 44.540	108.727 ± 40.956	713.781 ± 178.950*#	32.280	<0.001
产后14 d	113.850 ± 21.789	271.379 ± 65.253	312.180 ± 181.589	2.068	0.182

与对照组相比,* $P < 0.05$;与NRDS组相比,# $P < 0.05$ 。

现的“新型BPD”,此外糖皮质激素易引起患儿神经系统发育不良如脑瘫等不良影响^[9-10]。迄今BPD的发病机制尚未阐明,但气道炎症过程在BPD发病机制中发挥重要作用^[11-12]。目前临床上对BPD的诊断以持续吸氧 ≥ 28 d为依据,但肺损伤在产后甚至胎儿时期即已发生,此外因缺少确切影像学及生物学指标等客观依据,临床医师的决策差异也往往会造成BPD诊断的相对“武断性”,因此寻找BPD早期敏感的生物学指标,可为BPD的早期诊治及早期预测NRDS患儿是否有并发BPD的风险提供宝贵线索。

白三烯是花生四烯酸代谢产生的具有高度生物活性的炎性介质。白三烯可分为白三烯A4(leukotriene A4, LTA4)、LTB4、白三烯C4(leukotriene C4, LTC4)、白三烯D4(leukotriene D4, LTD4)和白三烯E4(leukotriene E4, LTE4)5个亚型,其中LTC4、LTD4和LTE4因其化学结构中均含有半胱氨酸基故合称CysLTs,其生理活性最强。5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LO)和FLAP是CysLTs合成途径中的关键酶,而5-LO的催化作用有赖于其与5-LO激活蛋白结合而实现^[13]。CysLTs通过与靶细胞膜上相应的G蛋白偶联受体结合发挥生物学作用,根据CysLTs对经典拮抗剂的敏感性不同可分为CysLT1受体和CysLT2受体,敏感者为CysLTR1,不敏感者为CysLTR2。其中CysLTR1为高亲和力受体,主要

在人类平滑肌细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和嗜酸性粒细胞中表达,与炎症关系密切^[14]。CysLTR2为低亲和力抗体,主要分布在心脏、大脑和肾上腺等。当CysLTs与CysLTR1结合后可参与气道炎症细胞聚集和炎症介质释放,诱发气道高反应性,引起气道重塑,在气道炎症中发挥重要作用^[15-16]。现已有研究证实BPD组新生儿体内白三烯含量高于正常同龄儿^[17-18]。同时,本课题组先前对新生儿产后3 d尿CysLTE4水平检测结果也发现:BPD患儿产后3 d尿CysLTE4水平较早产非BPD组和足月非BPD组高,且差异有统计学意义^[2]。有研究显示,口服CysLTR1拮抗剂孟鲁司特可降低23~27周胎龄早产儿重度BPD死亡率以及肺部严重度积分,以上均提示CysLTs的水平变化有可能提示BPD肺部的早期炎症病变^[5]。白三烯在血中半衰期很短,约几秒钟至1分钟即可从胆汁、尿液排出,此外虽然白三烯生物活性较强但体内含量较低,故本实验选取白三烯合成过程中的重要因子FLAP、LTC4S及CysLTR1作为检测因子,侧面反映NRDS及BPD患儿血清中CysLTs水平。本研究发现:NRDS组和BPD组在产后3~14 d各个时间点血清FLAP、LTC4S和CysLTR1水平均高于对照组。产后3 d,3组间血清FLAP及CysLTR1表达水平存在统计学差异,其中,NRDS组仅血清FLAP水平与对照组比较差异有统计学意

义,而BPD组血清FLAP及CysLTR1表达水平与对照和NRDS组比较,差异均有统计学意义,故生后3 d血清FLAP及CysLTR1表达水平可以作为提示BPD的生物学指标,且可能作为辅助判断NRDS是否合并BPD的指标。生后7 d,3组血清FLAP、LTC4S及CysLTR1表达水平均存在统计学差异,其中,NRDS组仅血清LTC4S水平与对照组比较差异有统计学意义,BPD组血清FLAP、LTC4S及CysLTR1表达水平均比对照组显著增高,血清FLAP和CysLTR1水平与NRDS组比较差异有统计学意义,这提示生后7 d血清FLAP、LTC4S及CysLTR1水平均可作为提示BPD的指标,生后7 d血清FLAP和CysLTR1水平还可辅助判断NRDS患儿是否合并BPD。生后14 d,3组仅血清LTC4S表达水平差异有统计学意义,NRDS组和BPD组与对照组比较差异均有统计学意义,而NRDS组和BPD组血清LTC4S表达水平差异无统计学意义,生后14 d血清LTC4S水平可以作为提示BPD的指标。

综上所述,本研究提示生后3 d血清FLAP和CysLTR1表达水平,生后7 d血清FLAP、LTC4S、CysLTR1表达水平,生后14 d血清LTC4S水平均可作为早期提示BPD的生物学指标,其中,生后3 d和生后7 d的血清FLAP和CysLTR1水平均可以作为辅助判断NRDS患儿有无合并BPD风险的指标。这将为BPD的早期诊断和早期治疗提供新思路,但不同胎龄、不同出生体重新生儿血清中FLAP、LTC4S和CysLTR1的参考范围有待进一步增加样本量、重复试验加以确认。

[参考文献]

[1] Shahzad T, Radajewski S, Chao CM, et al. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development[J]. *Mol Cell Pediatr*, 2016, 3(1): 23-29

[2] 金蕊, 卢红艳, 罗妍妍, 等. 尿半胱氨酸白三烯E4诊断支气管肺发育不良的临床评价[J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(9): 703-707

[3] Jouvencel P, Fayon M, Choukroun ML, et al. Montelukast does not protect against hyperoxia-induced inhibition of alveolarization in newborn rats [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2003, 35(6): 446-451

[4] Ee MT, Kantores C, Ivanovska J, et al. Leukotriene B4 mediates macrophage influx and pulmonary hypertension in bleomycin-induced chronic neonatal lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2): L292-L302

[5] Rupperecht T, Rupperecht C, Harms D, et al. Leukotriene receptor blockade as a life-saving treatment in severe

bronchopulmonary dysplasia [J]. *Respiration*, 2014, 88(4): 285-290

[6] Kim SB, Lee JH, Lee J, et al. The efficacy and safety of Montelukast sodium in the prevention of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Korean J Pediatr*, 2015, 58(9): 347-353

[7] 邵晓梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 416-422

[8] Northway WH, 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

[9] 纪凤娟, 殷勇, 徐娟, 等. 早产儿生后早期应用糖皮质激素预防支气管肺发育不良的Meta分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(6): 638-645

[10] Day CL, Ryan RM. Bronchopulmonary dysplasia: Old becomes new again[J]. *Pediatr Res*, 2017, 81(1-2): 210-213

[11] Chen XQ, Wu SH, Luo YY, et al. Lipoxin A4 attenuates bronchopulmonary dysplasia via upregulation of let-7c and downregulation of TGF- β 1 signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2094-2108

[12] 李冰洁, 李淑君, 罗妍妍, 等. 脂氧素A-4调控转化生长因子- β 1干预小鼠支气管肺发育不良的机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(11): 1326-1332

[13] Gerstmeier J, Newcomer ME, Dennhardt S, et al. 5-Lipoxygenase-activating protein rescues activity of 5-lipoxygenase mutations that delay nuclear membrane association and disrupt product formation [J]. *FASEB J*, 2016, 30(5): 1892-1900

[14] Opene M, Kurantsin-mills J, Husain S, et al. Sick erythrocytes and platelets augment lung leukotriene synthesis with downregulation of anti-inflammatory proteins: relevance in the pathology of the acute chest syndrome [J]. *Pulm Circ*, 2014, 4(3): 482-495

[15] Eiyomo Mwa Mpollo MS, Brandt EB, Shanmukhappa SK, et al. Placenta growth factor augments airway hyperresponsiveness via leukotrienes and IL-13 [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 571-584

[16] McGovern T, Goldberger M, Chen M, et al. CysLT1 receptor is protective against oxidative stress in a model of irritant-induced asthma [J]. *J Immunol*, 2016, 197(1): 266-277

[17] Mirro R, Armstead W, Leffler C. Increased airway leukotriene levels in infants with severe bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Dis Child*, 1990, 144(2): 160-161

[18] Korhonen PH, Suursalmi PH, Kopeli T, et al. Inflammatory activity at school age in very low birth weight bronchopulmonary dysplasia survivors [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2015, 50(7): 683-690