

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.033

◇临床医学◇

血浆脂氧素 A4 和基质金属蛋白酶 9 在早产儿支气管肺发育不良中的预测价值

齐孟孟, 徐艳, 叶黎离, 王军

作者单位: 徐州医科大学附属医院新生儿科, 江苏 徐州 221002

摘要:目的 探讨血浆中脂氧素 A4(LXA4)和基质金属蛋白酶9(MMP9)的动态变化及对早产儿支气管肺发育不良(BPD)的预测价值。方法 选择2018年1—7月入住徐州医科大学附属医院新生儿科32周以下的早产儿50例,根据BPD的诊断标准为BPD组(20例)和非BPD组(30例),采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测患儿第1、7、14天血浆中LXA4、MMP9的表达水平。结果 生后第1天 BPD组和非BPD组血浆LXA4表达水平 $[(330.4\pm 21.6)$ 比 (321.1 ± 35.9) pg/mL],差异无统计学意义($P > 0.05$);BPD组第7天LXA4水平为 (281.8 ± 7.0) pg/mL,第14天LXA4水平为 (188.4 ± 5.7) pg/mL,随着时间推移逐渐下降,各时间点均低于非BPD组,不同时间点之间两两比较均差异有统计学意义,非BPD组LXA4水平逐渐上升,于第7天达到峰值 (348.6 ± 4.4) pg/mL,后又逐渐下降至第14天的 (270.3 ± 5.4) pg/mL,不同时间点之间两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$);第1天BPD组和非BPD组血浆MMP9表达水平 (23.9 ± 3.9) ng/mL比 (25.3 ± 2.6) ng/mL,差异无统计学意义($P > 0.05$),BPD组血浆MMP9水平逐渐上升,且生后第7、14天 BPD组血浆MMP9水平 $[(32.6\pm 3.9)$ ng/mL、 (39.0 ± 2.1) ng/mL]均高于非BPD组 $[(28.8\pm 2.9)$ ng/mL、 (32.2 ± 3.4) ng/mL],不同时间点之间两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。依据BPD组和非BPD组LXA4浓度绘制ROC曲线下面积为0.670(95%可信区间为0.580~0.759),依据BPD组和非BPD组MMP9浓度绘制ROC曲线下面积为0.749(95%可信区间为0.667~0.830)。结论 生后7 d检测血浆LXA4和MMP9的表达水平对早产儿支气管肺发育不良有早期预测价值。

关键词:支气管肺发育不良; 脂氧素类; 基质金属蛋白酶9; 早期诊断; 婴儿,早产

Predictive value of plasma lipoprotein A4 and matrix metalloproteinase 9 for bronchopulmonary dysplasia in premature infants

QI Mengmeng, XU Yan, YE Lili, WANG Jun

Author Affiliation: Department of Neonatology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China

Abstract: Objective To explore the dynamic changes of plasma lipoprotein A4 (LXA4) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and their predictive value for bronchopulmonary dysplasia in premature infants. **Methods** A total of 50 premature infants under 32 weeks admitted to the Department of Neonatology of Xuzhou Medical University from January to July 2008 were selected, and divided into the BPD group (20 cases) and non-bpd group (30 cases) according to the diagnostic criteria of BPD. The expressions of LXA4 and MMP9 in plasma were detected by ELISA on day 1, 7 and 14. **Results** There was no significant difference in plasma LXA4 expression level between the BPD group and the non-BPD group at 1 d after birth $[(330.4\pm 21.6)$ vs. (321.1 ± 35.9) pg/mL, $P > 0.05$]. The LXA4 level in the BPD group was (281.8 ± 7.0) pg/mL on the 7th day and (188.4 ± 5.7) pg/mL on the 14th day, which decreased gradually as time went on, and was lower than that in the non-BPD group at all time points. The LXA4 level in the non-BPD group increased gradually, reaching a peak value (348.6 ± 4.4) pg/mL on the 7th day, and then gradually decreased to (270.3 ± 5.4) pg/mL on the 14th day. There was a statistically significant difference between the two groups at different time points ($P < 0.05$); On the first day, the plasma MMP9 level in the BPD group and non-BPD group was (23.9 ± 3.9) ng/mL vs. (25.3 ± 2.6) ng/mL, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The plasma MMP9 level in the BPD group gradually rised. And the plasma MMP9 levels $[(32.6\pm 3.9)$ ng/mL, (39.0 ± 2.1) ng/mL] in the BPD group at 7 and 14 days after birth were higher than those in the non-BPD group $[(28.8\pm 2.9)$ ng/mL, (32.2 ± 3.4) ng/mL], there was a statistically significant difference between the two groups at different time points ($P < 0.05$). The area under the ROC curve calculated according to the concentration of LXA4 in the BPD group and the non-BPD group was 0.670 (95% confidence interval 0.580 to 0.759). The area under the ROC curve calculated on the basis of MMP9 was 0.749 (95% confidence interval 0.667 to 0.830). **Conclusion** The detection of plasma LXA4 and MMP9 expression on

7th days after birth has an early predictive value for bronchopulmonary dysplasia in premature infants.

Key words: Bronchopulmonary dysplasia; Lipoxins; Matrix metalloproteinase 9; Early diagnosis; Infant, premature

支气管肺发育不良(BPD)是世界早产儿最严重的并发症之一,大多数BPD发生在胎龄小于32周的婴儿,胎龄每小1周,BPD的发生率即增加2~3倍^[1],与正常早产儿相比,患有BPD的婴儿更易患呼吸系统及神经系统疾病,严重影响了生活质量,给家庭和社会造成了沉重的负担。然而目前对于BPD仍缺乏有效的治疗手段,更多的集中在预防BPD的发生上。近年来,越来越多的国内外学者热衷于寻找BPD的早期生物学标志物,以早期预测BPD的发生,其中LXA4和MMP9已被多项动物实验证明在肺损伤的发生和发展过程中发挥着重要的作用,但在早产儿BPD中的研究甚少,本研究通过检测BPD组和非BPD组早产儿生后2周不同时间点血浆LXA4和MMP9表达水平,探讨其在早产儿支气管肺发育不良中的变化及早期预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年1—7月入住徐州医科大学附属医院新生儿科的出生胎龄<32周且住院时间超过28 d的早产儿;排除严重的先天性畸形、先天性遗传代谢病,本研究征得患儿家长知情同意签字。符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 BPD的诊断标准 超过21%的氧气治疗时间至少28 d的新生儿[来源于新的国立卫生研究院(美国)]^[2]

1.3 标本的采集 收集患儿一般信息,包括胎龄、出生体质量、分娩方式、性别、上机时间;并于生后第1、7、14天分别采集外周血1.5 mL,放入EDTA抗凝管中,避免溶血,静置30 min,然后2 000 r/min离心15 min,分离血浆,放入-80 ℃冰箱中保存。

1.4 LXA4及MMP9的检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测两指标,试剂盒均购自上海江莱生物有限公司。将各种试剂移至室温(18~25 ℃)平衡20 min配制后备用,设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL;在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μL,然后再加待

测样品10 μL;每孔加入酶标试剂100 μL,空白孔除外。用封板膜封板后置37 ℃温育60 min,弃去孔内液体甩干,洗板5次;每孔先加入显色剂A50 μL,再加入显色剂B50 μL,轻轻震荡混匀,37 ℃避光显色15 min;每孔加终止液50 μL终止反应,在反应终止后15 min内用酶标仪在450 nm波长依序测量各孔光密度(OD值),然后计算样本浓度。

1.5 统计学方法 所有数据经SPSS 19.0统计学软件处理。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验。多时点观测资料采用两因素重复测量方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验,时间两两比较采用差值 t 检验。非正态分布计量资料以中位数(上、下四分位数)表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以例数(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 实验初期共纳入61例早产儿作为研究对象,其中死亡5例,放弃3例,严重先天性畸形2例,先天性遗传代谢病1例,其余的50例有20例发展为BPD,未发展为BPD的30例为非BPD组。

BPD组和非BPD组患儿胎龄、出生体质量及孕母分娩方式差异无统计学意义($P > 0.05$);吸氧时间、最高氧浓度及机械通气差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 血浆中LXA4表达水平变化 整体比较知:组间差异、时间差异及交互作用均差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两精细比较并结合主要数据分析:生后第1天BPD组和非BPD组血浆LXA4表达水平比较差异无统计学意义;随着时间推移,BPD组LXA4含量逐渐下降,非BPD组LXA4水平逐渐上升,于第7天达到峰值,后又逐渐下降;不同时间点两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$),患儿生后第7、14天BPD组的LXA4的水平低于非BPD组,时间越长LXA4水平越低,不同时间点两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 早产儿50例支气管肺发育不良组与非支气管肺发育不良组基本情况比较

组别	例数	胎龄/ (周, $\bar{x} \pm s$)	出生体质量/ (g, $\bar{x} \pm s$)	剖宫产/ 例(%)	吸氧时间/ (h, $\bar{x} \pm s$)	最高氧浓度/ (%, $\bar{x} \pm s$)	上机时间/ [h, $M(P_{25}, P_{75})$]
BPD组	20	30.0±1.01	1 317±278	12(60.00)	956.40±258.64	41.02±11.40	0(0, 252)
非BPD组	30	30.2±0.71	1 437±211	23(76.67)	531.20±174.40	32.60±8.34	0(0, 150)
$t(\chi^2)[Z]$ 值		0.823	1.734	(1.587)	6.955	3.017	[2.220]
P 值		0.414	0.089	0.208	0.000	0.004	0.026

表2 早产儿50例支气管肺发育不良组与非支气管肺发育不良组不同时间血浆LXA4水平比较/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第1天	第7天	第14天
BPD组	20	330.4±21.6	281.8±7.0 ^a	188.4±5.7 ^a
非BPD组	30	321.1±35.9	348.6±4.4 ^{ab}	270.3±5.4 ^{ab}
整体分析		(HF系数:0.5225)		
组间 F, P 值		247.875, 0.000		
时间 F, P 值		455.125, 0.000		
交互 F, P 值		97.468, 0.000		

注:整体分析为两因素重复测量方差分析,资料球形性校正采用HF系数法;时间精细比较为差值 t 检验,显著性标记a为和组内第1时间点比较 $P < 0.05$;组间精细比较为LSD- t 检验,显著性标记b为两组同时点相比 $P < 0.05$ 。LXA4为脂氧素A4, BPD为支气管肺发育不良

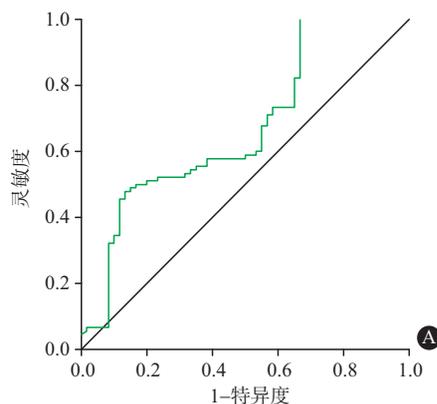
2.3 血浆中MMP9表达水平变化 亦经整体比较:组间差异、时间差异及交互作用均差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两精细比较并结合主要数据分析:生后第1天BPD组和非BPD组血浆MMP9表达水平比较差异无统计学意义。随着时间推移, BPD组血浆MMP9含量逐渐上升,且生后第7、14天BPD组血浆中MMP9表达水平均高于非BPD组,时间越长MMP9水平越高,不同时间点之间两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表3 早产儿50例支气管肺发育不良组与非支气管肺发育不良组不同时间血浆MMP9水平比较/(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第1天	第7天	第14天
BPD组	20	23.9±3.9	32.6±3.9 ^a	39.0±2.1 ^a
非BPD组	30	25.3±2.6	28.8±2.9 ^{ab}	32.2±3.4 ^{ab}
整体分析		(HF系数:0.9349)		
组间 F, P 值		29.744, 0.000		
时间 F, P 值		161.724, 0.000		
交互 F, P 值		22.296, 0.000		

注:同表2注。MMP9为基质金属蛋白酶9, BPD为支气管肺发育不良

2.4 血浆中LXA4和MMP9表达水平对早产儿BPD发生的预测价值 依据BPD组和非BPD组

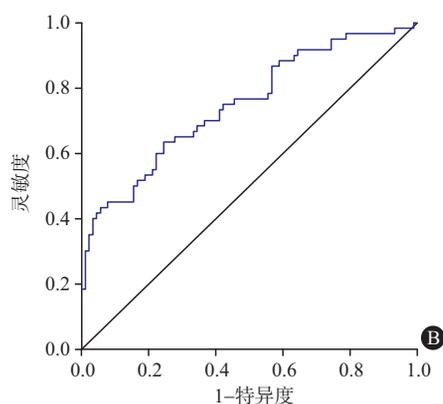


LXA4浓度绘制ROC曲线下面积AUC为0.670(95%可信区间为0.580~0.759),最佳诊断界值为328.454 pg/mL,其特异度为0.867,灵敏度为0.514;依据BPD组和非BPD组MMP9浓度绘制ROC曲线下面积AUC为0.749(95%可信区间为0.667~0.830),最佳诊断界值为31.643 ng/mL,其特异度为0.856,灵敏度0.633;见图1。

3 讨论

BPD是一种婴儿期的慢性肺病,它的发病机制是多因素的,已有的相关研究^[3]表明,早产儿肺发育不成熟、吸入氧浓度过高、过长时间接触氧气及机械通气,抗氧化能力缺陷以及蛋白酶抑制剂缺乏是BPD发生的独立危险因素,炎症是BPD多因素起源的共同特征,本研究中患儿在吸入氧浓度、用氧及机械通气时间上差异有统计学意义,与已有的研究^[4]相一致,尽管在过去几十年中新生儿医学取得了许多进展,如引入更好的机械通气策略以及使用表面活性剂和产前类固醇激素,但BPD的发病率并未下降,因此早期预测BPD的发生,并给予相应的预防和治疗对BPD的进展及预后有重要的意义。

脂氧合酶(LXs)是花生四烯酸的重要代谢产物,能广泛抑制多种炎性细胞的分泌和炎症相关基因的表达,称为炎症反应的“刹车信号”,其强大的抗炎作用涉及机体的呼吸、消化、泌尿和自身免疫等多个系统^[5-6]。朱天琦与杨建平^[7]通过测定细胞活力证实LXA4可以通过促进人II型肺泡上皮细胞的损伤修复和增殖减轻急性肺损伤;李淑君等^[8]通过高氧诱导构建的BPD动物模型表明LXA4可能通过抑制TGF- β 1信号通路的转导实现对高氧损伤小鼠肺上皮细胞的保护;Kumar等^[9]发现暴露于高氧环境中的小鼠体内的LXA4表达水平降低,推测LXA4对高氧所致肺损伤有重要的保护意义。本研究中BPD组LXA4的表达水平较非BPD组明显降低,与动物及细胞模型实验结果相一致,且本研究

**图1** 两组指标预测早产儿BPD的ROC曲线:A为LXA4的ROC生存曲线,B为MMP9的ROC生存曲线

发现随着时间延长, BPD组 LXA4 的表达水平越来越低, 考虑可能是由于病儿出生后长时间暴露高氧环境及机械通气引起肺部反复感染, 而肺部感染又引起一系列炎症反应, 使炎症细胞募集并激活造成肺组织和结构损伤, 肺损伤又使机械通气、气管插管及供氧时间延长, 形成恶性循环, 引起抗炎因子如 LXA4 越来越低, 这与 Krishnamoorthy 等^[10]发现的 LXA4 受体的表达水平随着炎症持续时间的延长而降低相一致; 本研究中 BPD 组 LXA4 表达水平在第 7 天明显下降, 而非 BPD 组 LXA4 的表达水平在第 7 天达到最高峰, 可能与其在母体获得的不饱和脂肪酸或肠道喂养有关, 在炎症反应期间形成, 然后起作用以解决炎症反应^[11], 因此生后 7 d 检测 LXA4 表达水平对早产儿支气管肺发育不良的早期预测有重要意义, 对于可能发展为 BPD 的早产儿, 早期应用 LXA4 类似物能预防 BPD 的发生。

细胞外基质的沉积和重塑是肺泡形成过程中的关键步骤, ECM 重构与 MMP9 基因、TIMP 1 基因表达增加和 MMP 12 基因表达降低有关。有实验表明, 40% 氧气的长时间应用增加了 MMP9 和弹性蛋白酶活性, 导致弹性蛋白降解增加和肺泡出现肺气肿, 类似于 BPD 的结果。Lim 等^[12]实验表明在高氧暴露后成年大鼠的 II 型肺泡上皮细胞中 MMP9 表达水平增高; Lee 等^[13]研究发现在发展为 BPD 的早产儿肺泡灌洗液或气管抽吸物中 MMP9 表达水平升高; 本研究中 BPD 组 MMP9 的表达水平较非 BPD 组明显升高, 与动物实验及既往临床试验结果相符, 表明 MMP9 在 BPD 的形成过程中发挥了重要的作用; 且本研究发现生后 7d 内 BPD 组 MMP9 的表达水平明显升高, 非 BPD 组 MMP9 的表达水平升高不明显, 随着时间延长, BPD 组 MMP9 的表达水平会越来越高, 考虑可能是由于感染、机械通气、吸入高氧等炎症反应的初期, 引起炎性细胞肺内聚集, 活化的炎症细胞释放大量的氧自由基, 导致弹性蛋白酶如 MMP9 增高; 而在肺纤维化启动阶段, 内皮细胞、上皮细胞受损, 导致炎性细胞聚集, 释放促纤维化细胞因子、生长因子, 促使 MMPs 的合成与活化水平更高, 从而参与肺基质和基底膜的破坏^[14], 导致 BPD 发生, 因此生后 7 d 检测 MMP9 的表达水平对 BPD 发生的早期预测有重要的价值。

综上所述, LXA4 和 MMP9 在 BPD 早期预测中有重要的意义, 根据 ROC 曲线可知, 当早产儿血浆中 LXA4 表达水平 ≤ 328.454 pg/mL, MMP9 表达水平 ≥ 31.643 ng/mL 时发展为 BPD 的可能性大, 但灵敏度

和特异度还不够高, 可能与样本量少、检测仪器有限等有关, 仍需要大量的临床研究进一步观察两者联合检测对 BPD 的诊断价值, 以及 LXA4 和 MMP9 与不同程度 BPD 之间的相关性以及与 BPD 预后之间的关系。

参考文献

- [1] 陈超, 袁琳. 早产儿支气管肺发育不良的病因及危险因素[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(1): 5-7.
- [2] JOBE AH, BANCALARI E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.
- [3] WANG J, DONG W. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia[J]. Gene, 2018, 678(15): 177-183.
- [4] 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.
- [5] 张沛, 彭洪军, 夏正坤. 脂氧素在炎症信号通路中的作用研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32(10): 797-800.
- [6] JIANG X, LI Z, JIANG S, et al. Lipoxin A4 exerts protective effects against experimental acute liver failure by inhibiting the NF- κ B pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 37(3): 773-780.
- [7] 朱天琦, 杨建平. 脂氧素 A4 对人 II 型肺泡上皮细胞损伤修复、增殖和凋亡的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(8): 988-992.
- [8] 李淑君, 吴升华, 李冰洁, 等. 脂氧素 A4 对高氧损伤小鼠肺上皮细胞的保护机制研究[J]. 中华新生儿科杂志(中英文), 2017, 32(6): 468-472.
- [9] KUMAR VH, LAKSHMINRUSIMHA S, KISHKUMO S, et al. Neonatal hyperoxia increases airway reactivity and inflammation in adult mice[J]. Pediatr Pulmonol, 2016, 51(11): 1131-1141.
- [10] KRISHNAMOORTHY N, ABDULNOUR RE, WALKER KH, et al. Specialized Proresolving Mediators in Innate and Adaptive Immune Responses in Airway Diseases[J]. Physiol Rev, 2018, 98(3): 1335-1370.
- [11] WU J, DING DH, LI QQ, et al. Lipoxin A4 Regulates Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglial Activation and Differentiation via the Notch Signaling Pathway[J]. Front Cell Neurosci, 2019(4): 13-19.
- [12] LIM R, MULJADI R, KOULAEVA E, et al. Activin A contributes to the development of hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice[J]. Pediatr Res, 2015, 77(6): 749-756.
- [13] LEE C, AN J, KIM JH, et al. Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth may be associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants[J]. Korean J Pediatr, 2015, 58(11): 415-420.
- [14] TAYYAB SHAHZAD, SARAH RADAJEWSKI, CHO - MING CHAO, et al. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development[J]. Mol Cell Pediatr, 2016, 3(1): 23.

(收稿日期: 2018-12-25, 修回日期: 2019-02-21)