

- novel serum biomarkers for liver fibrosis staging in children with chronic viral hepatitis[J].Global pediatric health, 2020, 7(4): 233-237.
- [6] METWALLY K, ELSABAAWY M, ABDEL-SAMIEE M, et al. FIB-5 versus FIB-4 index for assessment of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B affected patients[J].Clin Exp Hepatol, 2020, 3(6):1345-1352.
- [7] 中华医学会肝病学分会 中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2015年版)[J].实用肝脏病杂志, 2016, 19(3): 389-400.
- [8] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中华肝脏病杂志, 2011, 19(1):13-24.
- [9] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J].中华消化外科杂志, 2017, 16(7):635-647.
- [10] JEONG J, SHIN JW, JUNG SW, et al.Clinical usefulness of non-invasive fibrosis indices for predicting hepatocellular carcinoma in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B following entecavir therapy.[J].Hepatol Res, 2021, 51(9): 923-932.
- [11] KIM MN, HWANG SG, RIM KS, et al.Validation of PAGE-B model in Asian chronic hepatitis B patients receiving entecavir or tenofovir[J].Liver Int, 2017, 37(12): 1788-1795.
- [12] 周新兰, 马鑫, 王雁冰, 等. APRI、FIB-4 和 GPR 对慢性乙型肝炎肝脏炎症程度的诊断价值[J].临床肝胆病杂志, 2021, 37(9): 2066-2070.
- [13] WANG HW, LAI HC, HU TH, et al.On-treatment changes in FIB-4 and 1-year FIB-4 values help identify patients with chronic hepatitis B receiving entecavir therapy who have the lowest risk of hepatocellular carcinoma[J].Cancers, 2020, 12(5): 131-137.
- [14] 汪梦, 刘李斌, 徐国荣, 等. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎患者 APRI、FIB4、RPR 指标的变化[J].中华医院感染学杂志, 2019, 29(24):3710-3714.
- [15] PAPATHEODORIDIS GV, SYPSA V, DALEKOS GN, et al.Hepatocellular carcinoma prediction beyond year 5 of oral therapy in a large cohort of Caucasian patients with chronic hepatitis B[J].J Hepatol, 2020, 72(6): 1088-1096.
- [16] 付裕. 探讨恩替卡韦联合安络化纤丸对进展期肝纤维化患者的肝硬度及 FIB-4 指数的影响[J]. 中外医疗, 2021, 40(6): 76-78.
- [17] YANG HI, YEH ML, WONG GL, et al.Real-world effectiveness from the Asia Pacific rim liver consortium for HBV risk score for the prediction of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients treated with oral antiviral therapy[J].J Infect Dis, 2020, 221(3):389-399.
- [18] UDOMPAP P, SUKONRUT K, SUVANNARERNG V, et al.Pro-spective comparison of transient elastography, point shear wave elastography, APRI and FIB-4 for staging liver fibrosis in chronic viral hepatitis[J].J Viral Hepat, 2020, 27(4):437-448.
- [19] 王燕芳, 赵杰, 周少英, 等. Forns 指数、FIB-4、APRI、GPR 对 HBV 感染合并非酒精性脂肪肝病肝纤维化的诊断效能分析[J].解放军医药杂志, 2021, 33(7):72-77.
- [20] 刘如玉, 路遥, 申戈, 等. HBeAg 阴性初治慢乙肝患者恩替卡韦 4 年抗病毒治疗 FIB-4 评分动态变化研究[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2020, 34(1):51-56.

(收稿日期:2021-12-20, 修回日期:2022-03-07)

引用本文: 蔺玉建, 徐玉静, 吴振兰. 子痫前期中性粒细胞胞外诱捕网的形成与血管内皮损伤的相关性研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(6): 1216-1219. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.06.036.

◇临床医学◇



子痫前期中性粒细胞胞外诱捕网的形成与血管内皮损伤的相关性研究

蔺玉建¹, 徐玉静², 吴振兰²

作者单位:¹潍坊医学院临床医学院, 山东 潍坊 261042;

²潍坊市人民医院产二科, 山东 潍坊 261000

通信作者: 吴振兰, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为妊娠期高血压疾病, Email: wuzhenlan.wf@163.com

摘要: **目的** 研究子痫前期(PE)病人血清中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)来源, 并分析与血管内皮损伤的相关性。**方法** 选取2020年9月至2021年9月潍坊市人民医院收治的30例PE病人作为PE组, 30例正常分娩的健康产妇作为Nor-P组, 同期于该院进行孕前检查的健康未孕妇女30例作为对照组。比较三组的血白细胞及中性粒细胞数量、髓过氧化物酶、NETs、内皮损伤指标含量的差异。采用Pearson检验评估NETs与内皮损伤的相关性。**结果** PE组白细胞数量(12.01 ± 0.88) $\times 10^9/L$ 、中性粒细胞数量(10.22 ± 0.99) $\times 10^9/L$ 及髓过氧化物酶(15.39 ± 0.84) $\mu g/L$ 、NETs(124.68 ± 3.63) ng/L 、血管性血友病因子(vWF)(122.79 ± 4.05) $\mu g/L$ 水平高于对照组和Nor-P组($P < 0.05$)。Pearson相关性分析发现, PE病人血清NETs水平与中性粒细胞数量呈正相关($r = 0.63, P < 0.05$), 同时NETs水平与vWF水平呈正相关($r = 0.83, P < 0.05$)。**结论** PE病人血清中的NETs水平异常升高, 与中性粒细胞数量升高有关, 具体水平可反应血管内皮损伤程度。

关键词: 子痫前期; 中性粒细胞胞外诱捕网; 血管内皮损伤; 过氧化物酶; 血管性血友病因子(vWF)

Correlation between the formation of the extracellular trap network of preeclamptic neutrophils and vascular endothelial injury

LIN Yujian¹, XU Yujing², WU Zhenlan²

Author Affiliations:¹Department of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261042, China;²Department of Obstetrics 2, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261000, China

Abstract: **Objective** To investigate the source of neutrophil extracellular trap networks (NETs) in the serum of patients with preeclampsia (PE) and to analyze their correlation with vascular endothelial injury. **Methods** A total of 30 patients with PE admitted to Weifang People's Hospital from September 2020 to September 2021 were selected as the PE group, 30 healthy women with normal delivery were selected as the Nor-P group, and 30 healthy nonpregnant women who underwent prepregnancy examination at the hospital during the same time were selected as the control group. The differences in blood leukocyte and neutrophil counts, myeloperoxidase, NETs and endothelial injury index levels were compared among the three groups. The Pearson test was used to assess the correlation between NETs and endothelial injury. **Results** The levels of leukocyte count (12.01 ± 0.88) $\times 10^9/L$, neutrophil count (10.22 ± 0.99) $\times 10^9/L$, and myeloperoxidase (15.39 ± 0.84) $\mu g/L$, NETs (124.68 ± 3.63) ng/L and von Willebrand factor (vWF) (122.79 ± 4.05) $\mu g/L$ in the PE group were higher than those in the control and Nor-P groups ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation between serum NET levels and neutrophil count in PE patients ($r = 0.63$, $P < 0.05$), as well as a positive correlation between NET levels and vWF levels ($r = 0.83$, $P < 0.05$). **Conclusion** Abnormally elevated levels of NETs in the serum of PE patients are associated with elevated neutrophil counts, and the specific levels may reflect the degree of vascular endothelial injury.

Key words: Preeclampsia; Neutrophil extracellular trap network; Vascular endothelial injury; Peroxidase; Von willebrand factor (vWF)

子痫前期(PE)是与妊娠相关的一种高血压疾病,我国产妇PE发病率约为10%,且有逐年上升的趋势,是临床中常见的导致孕产妇和围产儿发病率和病死率升高的原因之一^[1-2]。目前为止,PE的发病机制尚未完全阐明,缺乏有效的预测方法和预防手段,寻找可以准确评估病情的标志物,对疾病发生机制的阐明、发现新的治疗靶点具有重要意义。中性粒细胞是人体循环中最普遍的白细胞,在固有免疫中发挥重要作用,随着Brinkmann等^[3]首次发现中性粒细胞在佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA)或白细胞介素-8的刺激下死亡释放出一种网状结构,将之命名为中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)后,近年来关于NETs的研究越来越多,已有研究证实系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肺炎链球菌肺炎、动脉粥样硬化及血栓形成等均与NETs密切相关^[4],同时发现在PE病人的血液及胎盘绒毛间隙内存在大量NETs^[5],由此推断NETs参与PE的发生。广泛血管内皮损伤是PE重要的病理变化,本研究探讨PE病人血清NETs水平与血管内皮损伤的相关性,旨在发现新的与PE病情相关的标志物,为治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2020年9月至2021年9月间在潍坊市人民医院产检并分娩的产妇,在首次被诊断为PE时纳入PE组(共30例),选择同期20~28周于该院产检并结束分娩的健康产妇30例作为Nor-P组,

同期于该院进行孕前检查的健康未孕妇女30例作为对照组。三组间研究对象年龄分别为(31.20 ± 3.76)岁、(31.50 ± 3.81)岁、(31.53 ± 4.14)岁,三组年龄差异无统计学意义($F = 0.07$, $P = 0.936$),PE组和Nor-P组孕周分别为(25.28 ± 2.04)周、(25.76 ± 2.40)周,两组研究对象孕周差异无统计学意义($t = 0.83$, $P = 0.410$)。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,研究对象均签署知情同意书。

1.2 诊断标准 参考《妇产科学》^[6]中对PE的诊断标准:妊娠20周后出现收缩压 ≥ 140 mmHg和(或)舒张压 ≥ 90 mmHg,伴有尿蛋白 ≥ 0.3 g/24 h,或随机蛋白尿(+),或无蛋白尿但合并下列任何一项者:肺水肿、肝功能损害、肾功能损害、血小板减少、新发的中枢神经系统异常或视觉障碍。

1.3 纳入及排除标准 纳入标准:①符合PE的诊断标准;②既往无慢性原发性高血压史及PE病史;③自然妊娠且单胎妊娠;④孕期无特殊用药及保胎史。排除标准:①合并妊娠期糖尿病、妊娠期心脏病、妊娠期肝内胆汁淤积症、妊娠期急性脂肪肝;②合并甲状腺功能亢进、慢性肾炎、嗜铬细胞瘤等内科疾病;③合并感染性疾病或恶性肿瘤。

1.4 检测方法 PE组产妇在初次诊断时留取空腹外周静脉血标本,对照组及Nor-P组产妇在入组时留取空腹外周静脉血标本。采用酶联免疫吸附法检测NETs特异性标志物瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3),血管内皮损伤标志物血管性血友病因子

及髓过氧化物酶(MPO)水平。人瓜氨酸组蛋白H3试剂盒、人血管性血友病因子试剂盒、人髓过氧化物酶试剂盒均由艾比玛特医药科技(上海)有限公司提供。所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 观察指标 比较三组研究对象外周血白细胞数量、中性粒细胞数量、NETs水平、血管性血友病因子(vWF)水平、MPO水平的差异,利用Pearson检验分析PE产妇血清NETs水平与中性粒细胞及内皮损伤的相关性。

1.6 统计学方法 采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析,计量数据应用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或独立样本 t 检验,组间多重比较用LSD检验,相关性分析采用Pearson检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血白细胞数量、中性粒细胞数量、血清MPO含量比较 PE组白细胞及中性粒细胞数量、血清MPO含量明显高于对照组和Nor-P组。三组妇女血白细胞、中性粒细胞数量,血清MPO含量的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 三组妇女外周血白细胞、中性粒细胞、髓过氧化物酶(MPO)水平比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	白细胞计数/ ($\times 10^9/L$)	中性粒细胞 计数/($\times 10^9/L$)	MPO/($\mu g/L$)
对照组	30	7.89 $\pm$ 0.85	6.49 $\pm$ 0.80	12.17 $\pm$ 0.84
Nor-P组	30	8.82 $\pm$ 0.81 ^①	7.91 $\pm$ 0.66 ^①	13.19 $\pm$ 0.64 ^①
PE组	30	12.01 $\pm$ 0.88 ^{①②}	10.22 $\pm$ 0.99 ^{①②}	15.39 $\pm$ 0.84 ^{①②}
F值		195.08	156.78	132.61
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.001$ 。②与Nor-P组比较, $P < 0.001$ 。

2.2 血浆中内皮损伤标志物含量比较 PE组血清NETs含量高于对照组和Nor-P组($P < 0.05$),Nor-P组与对照组血清NETs的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。PE组血浆vWF含量高于对照组和Nor-P组,Nor-P组血浆vWF含量高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

表2 三组妇女血浆中内皮损伤标志物含量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	NETs/(ng/L)	vWF/($\mu g/L$)
对照组	30	28.99 $\pm$ 3.40	108.09 $\pm$ 3.07
Nor-P组	30	29.33 $\pm$ 3.28 ^①	111.35 $\pm$ 2.81 ^②
PE组	30	124.68 $\pm$ 3.63 ^{②③}	122.79 $\pm$ 4.05 ^{②③}
F值		7 707.24	158.94
P值		<0.001	<0.001

注:NET为中性粒细胞胞外诱捕网,vWF为血管性血友病因子。

①与对照组比较, $P = 0.706$ 。②与对照组比较, $P < 0.001$ 。③与Nor-P组比较, $P < 0.001$ 。

2.3 相关性分析

2.3.1 PE产妇血清NETs含量与中性粒细胞的相关性分析 经Pearson检验发现,PE产妇血清中NETs的含量与白细胞数量、中性粒细胞数量、血清MPO含量均呈正相关($P < 0.05$)。见表3。

表3 子痫前期产妇血清中NETs与中性粒细胞的相关关系

指标	NETs	
	r值	P值
白细胞计数	0.61	<0.001
中性粒细胞计数	0.63	<0.001
MPO	0.74	<0.001

注:NETs为中性粒细胞胞外诱捕网,MPO为髓过氧化物酶。

2.3.2 PE产妇内皮损伤程度与血清NETs含量的相关性分析 经Pearson检验发现,PE产妇内皮损伤标志物vWF含量与血清NETs含量呈正相关($r = 0.83$, $P < 0.001$)。

3 讨论

NETs是由活化的中性粒细胞经历一种特殊的死亡形式(NETosis)后释放的细胞外的网状结构,主要由DNA骨架及结合在上的组蛋白和丝氨酸蛋白酶构成^[7]。多个研究证实,NETs在某些感染性疾病、免疫性疾病中起到负面作用,如Tan等^[8]指出血清NETs可以作为脓毒血症病人病情严重程度和器官损伤程度的生化指标。近期有研究发现,PE病人胎盘绒毛间隙中检测到大量NETs的存在,而胎盘血管闭塞、功能不全可能与此相关^[9]。本研究发现:未孕妇女和健康产妇血清NETs水平无明显差异,而PE产妇血清NETs水平明显高于未孕妇女和健康产妇,由此推断高水平的NETs参与PE的发生。同时发现健康产妇血液中白细胞及中性粒细胞轻微升高,PE的产妇升高明显。Pearson相关性分析发现,PE产妇血清NETs水平与白细胞、中性粒细胞数量呈正相关,说明NETs的产生与白细胞,特别是中性粒细胞有关。MPO占中性粒细胞总蛋白的5%,占颗粒蛋白25%^[10],在中性粒细胞被激活时释放到吞噬小体或细胞外,通过其介导的氧化应激反应来抵御微生物,MPO在中性粒细胞的胞质中浓度很高并且承载着重要的杀菌作用,被认为是中性粒细胞的主要标志物^[11]。为了进一步确定我们的观点,实验检测了三组妇女外周血中MPO的含量,结果提示PE病人血清MPO水平明显高于未孕妇女和健康产妇,相关性分析提示PE病人血清NETs水平与MPO水平呈正相关,由此进一步确定PE产妇血清NETs的升高来自于中性粒细胞,但NETs是否是由中性粒细胞产生,需进一步实验验证。

目前认为子宫螺旋小动脉重铸障碍,导致母胎界面氧化应激及炎症介质的释放,引起全身广泛血管内皮细胞受损、功能障碍是PE发病的中心环节^[12-13]。vWF是由巨核细胞和血管内皮细胞合成,具有黏附功能的多聚糖蛋白,主要储存在血小板的 α 颗粒和内皮细胞的Weibel-Palade小体中^[14],内皮细胞损伤后能够释放大量的vWF,是血浆中vWF的主要来源^[15]。王聚瑾等^[16]指出,vWF是在血管内皮损伤后调节血栓形成的重要因子,是动脉粥样硬化的始动因子,能作为血管内皮损伤的标志物。同样Philippe等^[17]也指出,vWF可作为COVID-19病人血管内皮损伤的标志物。Güngör等^[18]则指出,vWF在PE中能较准确地反应血管内皮损伤的程度。因此本研究通过检测血浆vWF含量来衡量血管内皮损伤程度,结果显示健康产妇、PE产妇血浆vWF含量高于未孕妇女,PE产妇血浆中vWF含量明显增高,可见PE病人体内存在广泛的血管内皮损伤。

胎盘在炎症和氧化应激的刺激下,胎盘合体滋养层细胞释放大量的微粒,微粒通过表达高迁移率族蛋白1使外周中性粒细胞在胎盘绒毛间隙募集、活化^[19],而活化的中性粒细胞经NETosis过程产生NETs调节胎盘蛋白13参与子宫螺旋动脉重铸及血管内皮损伤^[20]。Ma等^[21]研究指出,NETs的主要蛋白成分可以通过直接破坏细胞间的黏附连接并重组肌动蛋白细胞骨架,引起血管屏障功能障碍和血管微渗漏。本研究中发现PE产妇血清中NETs水平与血浆中vWF水平都明显增高,且呈正相关,证实NETs可以引起PE产妇的血管内皮损伤,其含量的高低可以反映病情的严重程度。

综上所述,PE病人血清中NETs的水平升高与母体内皮损伤程度密切相关,可能是导致PE发生发展的原因之一。NETs作为治疗靶点,可能成为治疗PE的新方式,但该论点需后续进一步验证。

参考文献

- [1] OPICHKA MA, RAPPELT MW, GUTTERMAN DD, et al. Vascular dysfunction in preeclampsia[J]. *Cells*, 2021, 10(11):3055.
- [2] 庄彩霞,刘俊涛,高劲松. 中国人群子痫前期发病率和临床危险因素分析[J]. *生殖医学杂志*, 2019, 28(4):336-341.
- [3] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5663):1532-1535.
- [4] BRINKMANN V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade[J]. *Innate Immunity*, 2018, 10(5/6):414-421.
- [5] GUPTA AK, HASLER P, HOLZGREVE W, et al. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia.[J]. *Human Immunology*, 2005, 66(11):1146-1154.
- [6] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社, 2018:83-84.
- [7] MUTUA V, GERSHWIN LJ. A Review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential Anti-NETs therapeutics [J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2021, 61(2):194-211.
- [8] TAN C, AZIZ M, WANG P. The vitals of NETs[J]. *Leukoc Biol*, 2021, 110(4):797-808.
- [9] STOIKOU M, GRIMOLIZZI F, GIAGLIS S, et al. Gestational diabetes mellitus is associated with altered neutrophil activity [J]. *Front Immunol*, 2017, 14(8):702.
- [10] ARATANI Y. Myeloperoxidase; its role for host defense, inflammation, and neutrophil function [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2018, 640:47-52.
- [11] SEGAL AW. How neutrophils kill microbes [J]. *Annual Review of Immunology*, 2005, 23(23):197-223.
- [12] GALLEY HF, WEBSTER NR. Physiology of the endothelium [J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2004, 93(1):105-113.
- [13] 薛峰,颜源,何攀. 血浆sCD40L、sICAM-1及血管内皮损伤相关细胞因子与子痫前期严重程度的相关性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(3):464-467.
- [14] TOBIN W, KINSELLA J, KAVANAGH G, et al. Profile of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor propeptide in an overall TIA and ischaemic stroke population and amongst subtypes [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2017, 375(15):404-410.
- [15] SORVILLO N, MIZURINI DM, COXON C, et al. Plasma peptidylarginine deiminase IV promotes VWF-platelet string formation and accelerates thrombosis after vessel injury [J]. *Circulation Research*, 2019, 125(5):507-519.
- [16] 王聚瑾,况佳,杨叶怡,等. 血浆血管性血友病因子抗原、D-二聚体、纤维蛋白原/纤维蛋白降解产物检测在急性脑梗死中的诊断价值[J]. *中国当代医药*, 2022, 29(2):133-136.
- [17] PHILIPPE A, CHOCRON R, GENDRON N, et al. Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(3):505-517.
- [18] GÜNGÖR ZB, EKMEKÇİ H, TÜTEN A, et al. Is there any relationship between adipocytokines and angiogenesis factors to address endothelial dysfunction and platelet aggregation in untreated patients with preeclampsia? [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 296(3):495-502.
- [19] WANG Y, DU F, HAWAZ A, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes trigger neutrophil recruitment via high-mobility group protein 1 (HMGB1)-toll-like receptors (TLR2)/TLR4 signalling [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(17):3350-3363.
- [20] VOKALOVA L, BREDA SV, YE XL, et al. Excessive neutrophil activity in gestational diabetes mellitus: could it contribute to the development of preeclampsia? [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 21(9):542.
- [21] MA YG, YANG XY, CHATTERJEE V, et al. Role of neutrophil extracellular traps and vesicles in regulating vascular endothelial permeability [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1037.

(收稿日期:2022-03-01,修回日期:2022-04-06)