

论著·临床研究

中性粒细胞胞外网状陷阱及相关标志物对 儿童社区获得性肺炎诊断的价值

陈丹¹ 杨晓林² 沈照波¹ 孙晓敏¹ 郭青¹ 任彦红¹ 张广超¹

(1. 郑州大学附属儿童医院 / 河南省儿童医院 / 郑州儿童医院普内科, 河南 郑州 450000;
2. 黄河三门峡医院儿科, 河南 三门峡 472000)

【摘要】 **目的** 探讨血浆中性粒细胞胞外网状陷阱 (NETs) 及相关标志物在儿童社区获得性肺炎 (CAP) 诊断中的价值。**方法** 选择收治的 160 例 CAP 患儿为 CAP 组, 另选 50 例健康体检儿童为对照组。CAP 组根据病情严重程度分为轻度 CAP 亚组 ($n=137$) 和重度 CAP 亚组 ($n=23$); 根据病原体不同分为细菌性肺炎亚组 ($n=78$)、支原体肺炎亚组 ($n=35$) 和病毒性肺炎亚组 ($n=47$)。检测各组血浆 NETs 及相关标志物抗菌肽-37 (LL-37)、胞外游离 DNA (cfDNA)、DNA 酶 I (DNase I) 水平, 采用受试者工作特征曲线 (ROC) 分析各指标对 CAP 及其病情严重程度的诊断价值。**结果** 与对照组相比, CAP 组 NETs、LL-37、cfDNA 水平显著增加, DNase I 活性显著降低 ($P<0.05$)。与轻度 CAP 亚组相比, 重度 CAP 亚组 NETs、LL-37、cfDNA 水平显著增加, DNase I 活性显著降低 ($P<0.05$)。细菌性肺炎亚组、支原体肺炎亚组、病毒性肺炎亚组间 NETs、LL-37、cfDNA 水平及 DNase I 活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。CAP 组 NETs 与 WBC、中性粒细胞百分比、C-反应蛋白 (CRP)、降钙素原、肿瘤坏死因子- α 呈正相关 (分别 $r=0.166$ 、 0.168 、 0.275 、 0.181 、 0.173 , $P<0.05$); LL-37、cfDNA 与 WBC (分别 $r=0.186$ 、 0.338)、CRP (分别 $r=0.309$ 、 0.274) 呈正相关 ($P<0.05$), DNase I 活性与 CRP 呈负相关 ($r=-0.482$, $P<0.05$)。ROC 曲线分析显示, NETs、LL-37、cfDNA、DNase I 诊断 CAP 的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.844 、 0.648 、 0.727 、 0.913 ; 最佳截断值分别为 182.89 、 46.26 ng/mL、 233.13 ng/mL、 0.39 U/mL; 灵敏度分别为 88.12% 、 35.63% 、 54.37% 、 91.25% ; 特异度分别为 74.00% 、 92.00% 、 86.00% 、 76.00% 。鉴别 CAP 病情严重程度的 AUC 分别为 0.873 、 0.924 、 0.820 、 0.778 ; 最佳截断值分别为 257.7 、 49.11 ng/mL、 252.54 ng/mL、 0.29 U/mL; 灵敏度分别为 83.21% 、 86.96% 、 78.26% 、 95.65% ; 特异度分别为 78.26% 、 83.94% 、 76.64% 、 56.93% 。**结论** CAP 患儿血浆 NETs 及相关标志物水平对 CAP 诊断及病情严重程度具有一定预测价值。
[中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 868-875]

【关键词】 社区获得性肺炎; 中性粒细胞胞外网状陷阱; 诊断; 病情; 儿童

Significance of neutrophil extracellular trap and its markers in the early diagnosis of community-acquired pneumonia in children

CHEN Dan, YANG Xiao-Lin, SHEN Zhao-Bo, SUN Xiao-Min, GUO Qing, REN Yan-Hong, ZHANG Guang-Chao. Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University/Henan Children's Hospital/Zhengzhou Children's Hospital, General Internal Medicine, Zhengzhou 450000, China (Sun X-M, Email: sunney1minmin@163.com)

Abstract: Objective To study the significance of plasma neutrophil extracellular trap (NET) and its markers in the diagnosis of community-acquired pneumonia (CAP) in children. **Methods** A total of 160 children with CAP were enrolled as the CAP group, and 50 healthy children were enrolled the control group. According to disease severity, the CAP group was further divided into a mild CAP subgroup with 137 children and a severe CAP subgroup with 23 children. According to the pathogen, the CAP group was further divided into a bacterial pneumonia subgroup with 78 children, a Mycoplasma pneumonia subgroup with 35 children, and a viral pneumonia subgroup with 47 children. The levels of plasma NET and its markers [antibacterial peptide (LL-37), extracellular free DNA (cfDNA), and

[收稿日期] 2019-03-29; [接受日期] 2019-06-19

[作者简介] 陈丹, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 孙晓敏, 女, 主任医师。Email: sunney1minmin@163.com。

deoxyribonuclease I (DNase I)] were measured. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the value of each index in diagnosing CAP and assessing its severity. **Results** Compared with the control group, the CAP group had significant increases in the levels of NET, LL-37, and cfDNA and a significant reduction in the activity of DNase I ($P<0.05$). Compared with the mild CAP subgroup, the severe CAP subgroup had significantly higher levels of NET, LL-37 and cfDNA and a significantly lower activity of DNase I ($P<0.05$). There were no significant differences in the levels of NET, LL-37, and cfDNA and the activity of DNase I among the bacterial pneumonia, Mycoplasma pneumonia, and viral pneumonia subgroups ($P>0.05$). In the CAP group, plasma NET levels were positively correlated with white blood cell count (WBC), percentage of neutrophils, and serum levels of C-reactive protein (CRP), procalcitonin and tumor necrosis factor- α ($r=0.166, 0.168, 0.275, 0.181$ and 0.173 respectively, $P<0.05$); LL-37 and cfDNA levels were positively correlated with WBC ($r=0.186$ and 0.338 respectively, $P<0.05$) and CRP levels ($r=0.309$ and 0.274 respectively, $P<0.05$); the activity of DNase I was negatively correlated with CRP levels ($r=-0.482$, $P<0.05$). The ROC curve analysis showed that NET, LL-37, cfDNA, and DNase I had an area under the ROC curve (AUC) of 0.844, 0.648, 0.727, and 0.913 respectively in the diagnosis of CAP, with optimal cut-off values of 182.89, 46.26 ng/mL, 233.13 ng/mL, and 0.39 U/mL respectively, sensitivities of 88.12%, 35.63%, 54.37%, and 91.25% respectively, and specificities of 74.00%, 92.00%, 86.00%, and 76.00% respectively. In the assessment of the severity of CAP, NET, LL-37, cfDNA, and DNase I had an AUC of 0.873, 0.924, 0.820, and 0.778 respectively, with optimal cut-off values of 257.7, 49.11 ng/mL, 252.54 ng/mL, and 0.29 U/mL respectively, sensitivities of 83.21%, 86.96%, 78.26%, and 95.65% respectively, and specificities of 78.26%, 83.94%, 76.64%, and 56.93% respectively. **Conclusions** Plasma NET and its related markers have a certain value in diagnosing CAP and assessing its severity in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(9): 868-875]

Key words: Community-acquired pneumonia; Neutrophil extracellular trap; Diagnosis; Severity; Child

社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 作为儿童下呼吸道感染的常见病之一, 具有发展快、预后不一的特点, 严重时累及循环、消化、神经等系统, 甚至危及患儿生命^[1]。及早诊断并明确 CAP 的病情严重程度、识别高危患儿对于改善 CAP 的预后具有重要意义^[2]。近来研究发现, 中性粒细胞胞外网状陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 作为中性粒细胞杀菌的第二种机制, 在多种感染性疾病以及自身免疫性疾病 (如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮) 中发挥重要作用^[3-5]。抗菌肽-37 (antibacterial peptide-37, LL-37) 和胞外游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 是反映 NETs 水平的两个间接血清标志物, 能够间接反映体内 NETs 的形成情况^[6-7]。DNA 酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 作为降解胞外形成的 NETs 的重要酶, 能够直观反映 NETs 在体内的降解情况^[8]。目前有国外学者提出 NETs 与感染性疾病有关, 外周血中 NETs 水平与 CAP 患者病情严重程度有关^[9]。然而, 目前国内尚未见关于 NETs 与儿童呼吸道及肺部感染等相关疾病关系的研究报道。因此, 本研究拟通过对 CAP 患儿血浆中 NETs 进行检测, 探讨 NETs 及相关标志物与儿童 CAP 病情严重程度的关系, 以期对疾病的临床监测提供一定参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 2 月至 2018 年 2 月于郑州大学附属儿童医院就诊的 160 例 CAP 患儿为研究对象, 其中男 87 例, 女 73 例, 发病年龄 3.7 ± 1.2 岁。纳入标准: (1) 符合 2013 年儿童社区获得性肺炎管理指南^[10] 的诊断标准; (2) 存在肺炎症状及体征 (发热和呼吸系统症状); (3) 入院时患儿年龄大于 28 d, 小于 5 岁; (4) 父母或监护人知情同意。排除标准: (1) 入院前抗菌药物治疗 >48 h; (2) 伴潜在慢性呼吸系统疾病; (3) 哮喘、反复呼吸道感染病史; (4) 贫血、佝偻病、免疫功能低下者; (5) 有遗传代谢性疾病者。参照 2013 年儿童社区获得性肺炎管理指南^[10] 中重症肺炎的诊断标准 [存在以下任意一项: 拒食或脱水征; 意识障碍; 婴儿呼吸频率 (RR) >70 次/min、年长儿 RR >50 次/min; 紫绀; 呼吸困难; 多肺叶或 $\geq 2/3$ 的肺受累; 脉搏血氧饱和度 $\leq 92\%$; 肺外并发症等], 将 CAP 组分为轻度 CAP 亚组 137 例, 重度 CAP 亚组 23 例。根据病原体不同分为 3 个亚组: 细菌性肺炎亚组 78 例, 支原体肺炎亚组 35 例和病毒性肺炎亚组 47 例。

另选择同期于本院体检的健康儿童 50 例作为

对照组,其中男26例,女24例,年龄 4.0 ± 0.9 岁。

1.2 研究方法

采集所有研究对象的一般资料及实验室检查,包括入院时体重、心率、RR,入院时血常规、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及病原学等。

1.3 血浆 NETs 及相关标志物水平测定

EDTA 抗凝管抽取所有研究对象入院时空腹静脉全血 10 mL。根据参考文献^[11],采用免疫荧光法定量检测外周血 NETs 水平。利用中性粒细胞分离液 (AXIS-SHIELD) 分离中性粒细胞,重悬于含 5% 胎牛血清的 1640 培养液中,并在预包了多聚赖氨酸的载玻片上培养 2 h。经磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤后固定于 4% 多聚甲醛溶液 20 min。PBS 洗涤后,加入 1% Triton X-100 冰浴 1 min。PBS 洗涤后,加入血清封闭液孵育 20 min,之后加入髓过氧化物酶 (MPO) 特异性抗体孵育 2 h,再加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 孵育 1 h。滴加含有 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 荧光淬灭封片液,盖上盖玻片,封片。于荧光酶标仪读取荧光值 (激发波长 485 nm, 发射波长 525 nm),以相对荧光强度表示 NETs 的形成量。采用 PicoGreen 试剂盒 (Thermo Fisher, P7589) 测定血浆 cfDNA 含量。采用 LL-37 ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, CSB-E14948h) 测定血浆中 LL-37 的浓度;采用辐射状酶扩散法测定血浆 DNase I 活性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行数据处理。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料以例和百分比 (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。采用 Pearson 法分析变量间的相关性。采用受试者工作特征曲线 (ROC) 分析 NETs 及相关标志物对 CAP 诊断及病情严重程度的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

CAP 组和对照组年龄与性别差异无统计学意

义 ($P > 0.05$),但 CAP 组 WBC、中性粒细胞百分比 (N%)、RBC、CRP、PCT、TNF- α 水平均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。轻度 CAP 亚组和重度 CAP 亚组间年龄、性别、RBC、PCT、TNF- α 差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但重度 CAP 亚组 WBC、N%、CRP 水平均高于轻度 CAP 亚组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。细菌性肺炎亚组、支原体肺炎亚组和病毒性肺炎亚组间年龄、性别、WBC、N%、RBC、CRP、PCT、TNF- α 差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1~3。

表 1 CAP 组和对照组一般资料及实验室指标比较

项目	对照组 (n=50)	CAP 组 (n=160)	χ^2/t 值	P 值
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	4.0 \pm 0.9	3.7 \pm 1.2	1.702	0.090
性别 (男/女, 例)	26/24	87/73	0.067	0.796
病原体感染[(例)%]				
细菌性	-	78(48.8)	-	-
支原体	-	35(21.9)	-	-
病毒性	-	47(29.4)	-	-
WBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	6.0 \pm 1.3	9.7 \pm 2.1	12.001	<0.001
N ($\bar{x} \pm s$, %)	46 \pm 9	52 \pm 11	3.300	0.001
RBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	3.2 \pm 0.7	5.8 \pm 1.1	15.438	<0.001
CRP ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	6.0 \pm 1.3	7.5 \pm 1.9	5.170	<0.001
PCT ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	0.069 \pm 0.012	0.079 \pm 0.011	5.489	<0.001
TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $\mu g/L$)	6.1 \pm 1.2	14.0 \pm 1.5	33.655	<0.001

注: [N] 中性粒细胞; [CRP] C-反应蛋白; [PCT] 降钙素原; [TNF- α] 肿瘤坏死因子- α 。

表 2 轻度 CAP 亚组与重度 CAP 亚组一般资料和实验室指标比较

项目	轻度 CAP 亚组 (n=137)	重度 CAP 亚组 (n=23)	χ^2/t 值	P 值
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	3.7 \pm 1.2	3.3 \pm 1.0	1.575	1.117
性别 (男/女, 例)	74/63	13/10	0.050	0.823
WBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	9.6 \pm 2.1	10.5 \pm 1.8	2.052	0.042
N ($\bar{x} \pm s$, %)	51 \pm 10	57 \pm 13	2.485	0.014
RBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	5.8 \pm 1.1	6.1 \pm 1.4	1.365	0.174
CRP ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	7.1 \pm 1.6	9.9 \pm 2.0	7.546	<0.001
PCT ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	0.080 \pm 0.011	0.077 \pm 0.011	1.210	0.228
TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $\mu g/L$)	13.9 \pm 1.4	14.2 \pm 1.9	0.877	0.382

注: [N] 中性粒细胞; [CRP] C-反应蛋白; [PCT] 降钙素原; [TNF- α] 肿瘤坏死因子- α 。

表 3 细菌性肺炎亚组、支原体肺炎亚组和病毒性肺炎亚组的一般资料和实验室指标比较

项目	细菌性肺炎亚组 (n=78)	支原体肺炎亚组 (n=35)	病毒性肺炎亚组 (n=47)	χ^2/F 值	P 值
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	3.7 ± 1.2	3.8 ± 1.2	3.6 ± 1.2	0.336	0.751
性别 (男/女, 例)	38/40	20/15	29/18	2.131	0.344
WBC ($\bar{x} \pm s$, × 10 ⁹ /L)	9.7 ± 2.2	9.5 ± 2.1	9.5 ± 2.2	0.213	0.808
N ($\bar{x} \pm s$, %)	54 ± 11	51 ± 12	49 ± 11	2.735	0.068
RBC ($\bar{x} \pm s$, × 10 ⁹ /L)	5.9 ± 1.2	5.7 ± 1.2	5.7 ± 1.2	0.790	0.456
CRP ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	7.6 ± 2.0	7.1 ± 1.8	7.2 ± 1.8	1.004	0.369
PCT ($\bar{x} \pm s$, mg/L)	0.080 ± 0.011	0.079 ± 0.009	0.079 ± 0.013	0.135	0.874
TNF- α ($\bar{x} \pm s$, μ g/L)	13.8 ± 1.5	13.8 ± 2.1	14.0 ± 2.0	0.201	0.818

注: [N] 中性粒细胞; [CRP]C-反应蛋白; [PCT]降钙素原; [TNF- α]肿瘤坏死因子- α 。

2.2 外周血 NETs 及相关标志物比较及相关性分析

与对照组相比, CAP 组 NETs、LL-37、cfDNA 水平显著增加, DNase I 活性显著降低 ($P < 0.05$); 重度 CAP 亚组 NETs、LL-37、cfDNA 水平显著高于轻度 CAP 亚组, DNase I 活性显著低于轻度 CAP 亚组 ($P < 0.05$)。见表 4~5, 图 1。

细菌性肺炎亚组、支原体肺炎亚组、病毒性肺炎亚组间 NETs、LL-37、cfDNA 水平及 DNase I 活性的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 6。

NETs 与 LL-37、cfDNA 呈正相关 (分别 $r = 0.502$ 、 0.497 , $P < 0.05$), 而与 DNase I 活性呈负相关 ($r = -0.458$, $P < 0.05$), 见图 2~4。

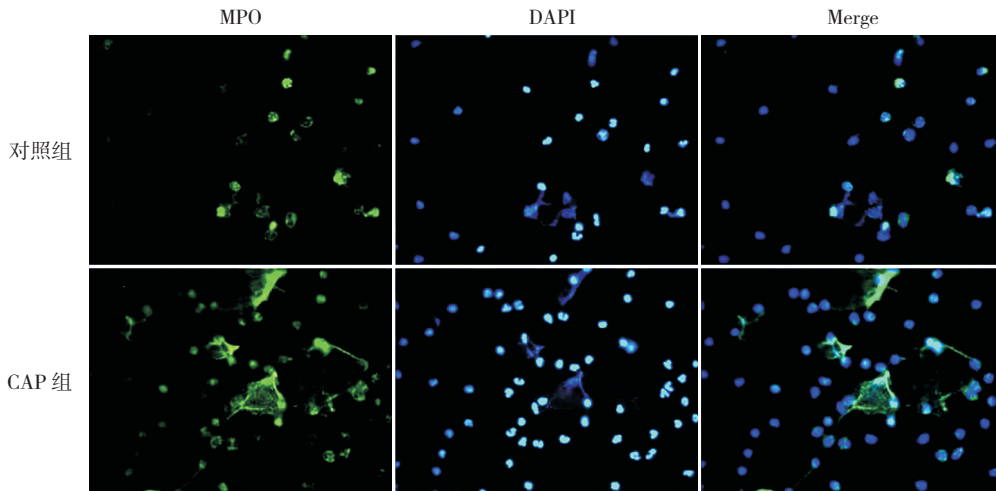


图 1 免疫荧光法定量检测外周血中 NETs 水平 (200 ×) 使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 蓝色) 进行 DNA 染色, 以髓过氧化物酶 (MPO, 绿色) 进行 NETs 染色。DAPI 和 MPO 共染后, 通过免疫荧光显微镜评估 NETs 的相对荧光强度。

表 4 对照组与 CAP 组 NETs 及相关标志物水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NETs 荧光强度	LL-37 (ng/mL)	cfDNA (ng/mL)	DNase I (U/mL)
对照组	50	168 ± 42	35 ± 10	202 ± 31	0.45 ± 0.11
CAP 组	160	230 ± 48	42 ± 13	236 ± 46	0.29 ± 0.09
t 值		8.146	3.372	4.878	10.385
P 值		<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注: [NETs] 中性粒细胞胞外网架陷阱; [LL-37] 抗菌肽-37; [cfDNA] 胞外游离 DNA; [DNase I] DNA 酶 I。

表 5 轻度 CAP 亚组与重度 CAP 亚组 NETs 及相关标志物水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NETs 荧光强度	LL-37 (ng/mL)	cfDNA (ng/mL)	DNase I (U/mL)
轻度 CAP 亚组	137	219 ± 38	39 ± 11	228 ± 40	0.30 ± 0.09
重度 CAP 亚组	23	295 ± 51	61 ± 10	286 ± 52	0.22 ± 0.05
t 值		8.393	8.959	6.218	4.149
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [NETs] 中性粒细胞胞外网架陷阱; [LL-37] 抗菌肽-37; [cfDNA] 胞外游离 DNA; [DNase I] DNA 酶 I。

表 6 不同病原体亚组 NETs 及相关标志物水平比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NETs 荧光强度	LL-37 (ng/mL)	cfDNA (ng/mL)	DNase I (U/mL)
细菌性肺炎亚组	78	230 ± 50	43 ± 14	238 ± 492	0.28 ± 0.06
支原体肺炎亚组	35	231 ± 41	43 ± 14	243 ± 45	0.29 ± 0.06
病毒性肺炎亚组	47	229 ± 39	39 ± 11	227 ± 42	0.28 ± 0.05
F 值		0.020	1.492	1.307	0.417
P 值		0.980	0.228	0.274	0.660

注: [NETs] 中性粒细胞胞外网状陷阱; [LL-37] 抗菌肽 -37; [cfDNA] 胞外游离 DNA; [DNase I] DNA 酶 I。

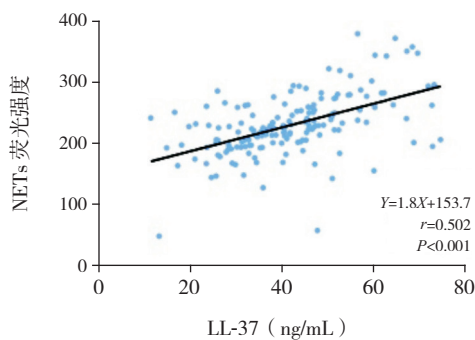


图 2 CAP 组外周血 NETs 与 LL-37 水平相关分析图

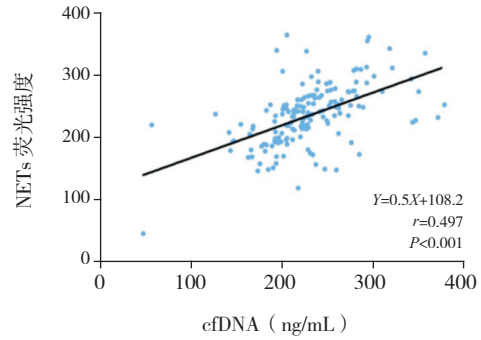


图 3 CAP 组外周血 NETs 与 cfDNA 水平相关分析图

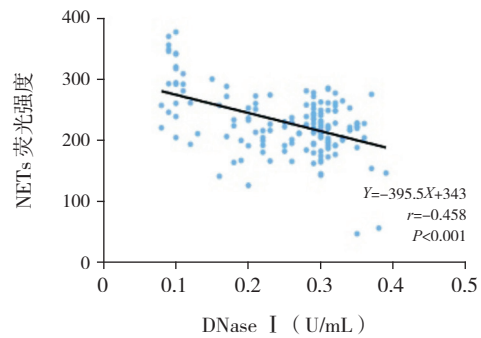


图 4 CAP 组外周血 NETs 与 DNase I 活性相关分析图

2.3 NETs 及相关标志物与 CAP 临床指标相关性分析

CAP 组 NETs 与 WBC、N%、CRP、PCT、

TNF- α 呈正相关 ($P<0.05$); LL-37、cfDNA 与 WBC、CRP 呈正相关 ($P<0.05$); DNase I 活性与 CRP 呈负相关 ($P<0.05$)。见表 7。

表 7 NETs 及相关标志物与 CAP 组临床指标相关性分析

指标	NETs		LL-37		cfDNA		DNase I	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
年龄	0.118	0.138	0.009	0.905	0.017	0.816	-0.095	0.112
WBC	0.166	0.036	0.186	0.018	0.338	<0.001	-0.875	0.383
N%	0.168	0.034	0.026	0.747	0.034	0.647	-0.116	0.245
RBC	0.152	0.976	0.070	0.381	0.078	0.279	-0.118	0.237
CRP	0.275	<0.001	0.309	<0.001	0.274	<0.001	-0.482	<0.001
PCT	0.181	0.022	0.083	0.277	0.037	0.609	0.035	0.727
TNF- α	0.173	0.002	0.099	0.237	0.112	0.166	0.186	0.065

注: [N%] 中性粒细胞百分比; [CRP] C-反应蛋白; [PCT] 降钙素原; [TNF- α] 肿瘤坏死因子 - α ; [NETs] 中性粒细胞胞外网状陷阱; [LL-37] 抗菌肽 -37; [cfDNA] 胞外游离 DNA; [DNase I] DNA 酶 I。

2.4 NETs 及相关标志物在 CAP 诊断及病情严重程度中的预测价值

NETs、LL-37、cfDNA、DNase I 诊断 CAP 的曲线下面积 (AUC) 分别为 0.844、0.648、0.727、0.913 (图 5、表 8); 最佳截断值分别为 182.89、

46.26 ng/mL、233.13 ng/mL、0.39 U/mL; 灵敏度分别为 88.12%、35.63%、54.37%、91.25%; 特异度分别为 74.00%、92.00%、86.00%、76.00%。鉴别重度 CAP 的 AUC 分别为 0.873、0.924、0.820、0.778 (图 6、表 8); 最佳截断值分别为 257.7、

49.11 ng/mL、252.54 ng/mL、0.29 U/mL；灵敏度分别为 83.21%、86.96%、78.26%、95.65%；特异度分别为 78.26%、83.94%、76.64%、56.93%。

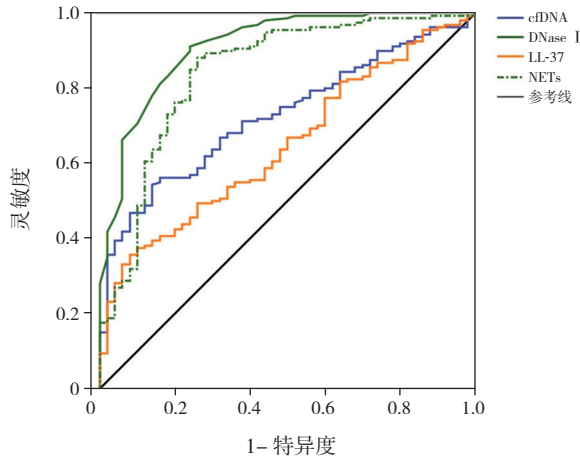


图5 NETs及相关标志物对CAP诊断价值的ROC分析图 [NETs]中性粒细胞胞外网状陷阱；[LL-37]抗菌肽-37；[cfDNA]胞外游离DNA；[DNase I]DNA酶I。

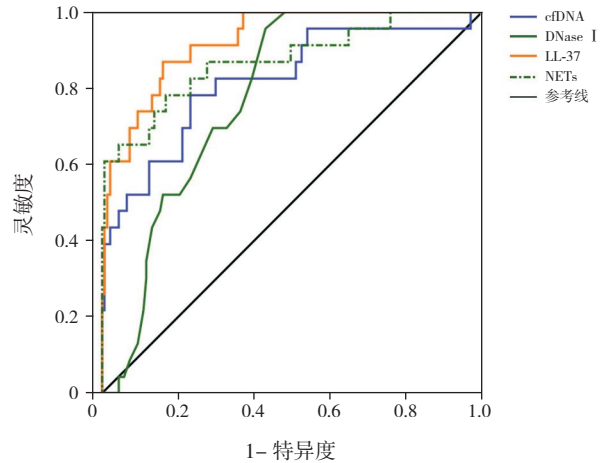


图6 NETs及相关标志物对CAP严重程度预测价值的ROC分析图 [NETs]中性粒细胞胞外网状陷阱；[LL-37]抗菌肽-37；[cfDNA]胞外游离DNA；[DNase I]DNA酶I。

表8 NETs、LL-37、cfDNA及DNase I对CAP诊断及病情严重程度的预测价值

组别	指标	AUC	约登指数	最佳截断值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	P 值
CAP 组	NETs	0.844	0.621	182.89	88.12	74.00	90.97	65.45	<0.001
	LL-37	0.648	0.276	46.26 ng/mL	35.63	92.00	91.94	30.41	<0.001
	cfDNA	0.727	0.404	233.13 ng/mL	54.37	86.00	91.67	36.84	<0.001
	DNase I	0.913	0.673	0.39 U/mL	91.25	76.00	92.31	70.37	<0.001
重度 CAP 亚组	NETs	0.873	0.615	257.7	83.21	78.26	42.86	95.76	<0.001
	LL-37	0.924	0.709	49.11 ng/mL	86.96	83.94	46.51	97.44	<0.001
	cfDNA	0.820	0.549	252.54 ng/mL	78.26	76.64	35.29	95.41	<0.001
	DNase I	0.778	0.526	0.29 U/mL	95.65	56.93	6.73	71.43	<0.001

注: [NETs]中性粒细胞胞外网状陷阱; [LL-37]抗菌肽-37; [cfDNA]胞外游离DNA; [DNase I]DNA酶I; [AUC]曲线下面积。

3 讨论

CAP是儿科最常见的疾病之一，流行病学调查结果显示，CAP已成为发展中国家儿童死亡的第二大原因，死亡人数占儿童总死亡人数的1/5^[12]。目前临床上对儿童CAP的早期明确诊断存在一定难度，探索与CAP相关的新血清学标志物，对于儿童CAP发病及病情严重程度的及早诊断与治疗具有重要临床意义。

中性粒细胞作为固有免疫系统中重要的效应细胞，能够在炎症发生时抵御外来微生物对人体的入侵，在连接先天性免疫与获得性免疫中发挥

关键作用。经典的中性粒细胞杀伤机制主要通过释放氧自由基和各种蛋白酶，研究表明，中性粒细胞能够在胞外形成由核酸物质和颗粒蛋白组成的网状结构，即NETs，捕杀病原体，发挥抗细胞免疫效应，是中性粒细胞杀菌并阻止病原微生物在机体内扩散的新方式^[13]。中性粒细胞作为气道中重要的细胞类型，其经典杀伤功能在呼吸道感染的发生发展中起重要作用，但NETs在其中的具体作用机制目前尚未明确。近来研究发现，NETs与多种自身免疫性疾病和炎症性肺疾病有关^[14]。中性粒细胞被病原微生物激活后，通过释放由双链DNA、组蛋白、蛋白酶类和抗菌肽形成的NETs

来识别、捕获并捕杀金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌等多种革兰阳性菌、革兰阴性菌以及病毒等^[15-16]。但由于组成 NETs 的组蛋白、弹力蛋白酶、MPO、LL-37 等胞内和核内成分对机体免疫系统而言是潜在的自身抗原，也可造成肺组织损伤^[17-18]，尤其是细胞外的组蛋白可直接损伤肺泡内皮细胞和上皮细胞^[19]。此外，NETs 中的补体成分 C1q 可进一步募集中性粒细胞至炎症病灶^[20]，促使更多的 NETs 形成，从而形成炎症和损伤的恶性循环。因此，NETs 也可能起到致病作用。已有研究证实，NETs 在类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等疾病中过度形成，与自身抗体形成有关^[9]。本研究发现，CAP 组外周血 NETs 水平较对照组明显增多，且重度 CAP 亚组外周血 NETs 水平显著高于轻度 CAP 亚组。LL-37 是中性粒细胞的特异性抗原肽，其血清水平能够反映体内 NETs 的形成程度^[6]。机体内残留的 NETs 是血浆 cfDNA 的主要来源之一，cfDNA 亦能间接反映机体内 NETs 的形成情况^[7]。为分析人体内 NETs 的形成情况，本研究通过进一步检测 NETs 的两个间接血清标志物 LL-37 和 cfDNA 水平发现，CAP 组血浆 LL-37 和 cfDNA 水平显著高于对照组，且重度 CAP 亚组中的水平显著高于轻度 CAP 亚组。同时，血浆 NETs 荧光强度与 LL-37 及 cfDNA 水平均呈正相关。证实 CAP 患儿体内 NETs 形成增多，且机体 NETs 水平与 CAP 患儿病情严重程度有关。CRP、PCT 等指标是反映 CAP 患儿机体炎症情况的重要指标^[21]，本研究也证实 CAP 组 CRP、WBC、PCT 水平显著高于对照组，且血浆 NETs 水平与 CRP、WBC、N%、PCT、TNF- α 均呈正相关。因此推测，CAP 患儿血清 NETs 水平的增高除与病原微生物感染有关外，也可能与 CAP 患儿体内炎性细胞因子的表达增加有关。及时清除 NETs 对预防疾病发生进展至关重要。有研究证实，DNase I 可以降解胞外形成的 NETs^[8]。因此本研究进一步测定血浆中 DNase I 的活性以分析 CAP 患儿体内 NETs 不能有效降解的原因。结果发现，CAP 组血浆 DNase I 活性显著低于对照组，提示 DNase I 活性在 CAP 患儿呈明显降低，且重度 CAP 患儿中降低更显著。因此推测，血浆 DNase I 的活性不足可能是导致血浆 NETs 不能有效降解的原因。

本研究进一步分析血清 NETs 及相关标志物

对重度 CAP 患儿的诊断价值发现，NETs 及相关标志物对鉴别儿童 CAP 病情严重程度有较高敏感度与特异度，在指导 CAP 治疗时具有一定参考意义。尽管 NETs 可杀伤病原微生物，但病原微生物感染也可引起 CAP 患儿体内促炎因子增多，从而造成异常 NETs 的形成。这些过度形成的 NETs 能够刺激浆细胞样细胞释放 I 型干扰素，并进一步扰乱细胞因子网络^[22]，从而导致恶性循环。CAP 患儿体内过度形成的 NETs 不能被 DNase I 及时降解，残留的 NETs 可能会进一步破坏机体内环境稳态，导致病情进一步恶化。因此，体内 NETs 调节异常可能是儿童 CAP 发病的一个潜在因素，而 DNase I 可能成为新的治疗靶点。

综上所述，CAP 患儿体内 NETs 形成能力显著增强，且降解 NETs 的能力显著降低，体内 NETs 的调节异常可能是 CAP 发病的潜在因素之一。血浆 NETs 及相关标志物水平对 CAP 及其病情严重程度具有一定诊断价值。然而，本研究未对 NETs 及相关标志物进行动态监测，且样本量较小，可能导致结果存在偏倚，在今后的工作中，会增加 NETs 的检测时间点和病例数、结合病理实验等做更为详尽的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 赵德育, 陈慧中, 杨倩媛, 等. 临床征象对识别儿童社区获得性肺炎支原体肺炎价值的系统综述[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 104-110.
- [2] 崔立静, 孙恬敏, 王丽飞, 等. 肺炎患者病情严重程度及预后的评估[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(13): 1018-1022.
- [3] 宋向楠, 刘彦虹. 中性粒细胞胞外诱捕网与相关疾病的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(1): 57-60.
- [4] Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the bedside: neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases[J]. J Leukoc Biol, 2016, 99(2): 265-278.
- [5] Grayson PC, Kaplan MJ. At the bench: neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases[J]. J Leukoc Biol, 2016, 99(2): 253-264.
- [6] Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, et al. Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial[J]. Eur Respir J, 2018, 51(4): pii: 1701389.
- [7] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535.
- [8] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting

- neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 623-625.
- [9] 倪金凤, 高长俊, 郝冬荣, 等. 血清炎症因子在评估儿童社区获得性肺炎病情严重程度中的临床价值[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(4): 69-72.
- [10] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013修订)(上)[J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(10): 745-752.
- [11] Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, et al. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy[J]. *J Cyst Fibros*, 2012, 11(2): 84-92.
- [12] Gonzalez DJ, Corriden R, Akong-Moore K, et al. N-terminal ArgD peptides from the classical *Staphylococcus aureus* Agr system have cytotoxic and proinflammatory activities[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(11): 1457-1462.
- [13] Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2): 169-180.
- [14] Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48111.
- [15] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2661-2671.
- [16] Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 1.
- [17] Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease[J]. *J Immunol*, 2012, 188(7): 3522-3531.
- [18] Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(178): 178ra40.
- [19] Bosch X. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 758-760.
- [20] Margraf S, Lögters T, Reipen J, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis[J]. *Shock*, 2008, 30(4): 352-358.
- [21] 王凤娇, 田海容, 陈天昱. 血清CRP、WBC及PCT检测在小儿肺炎诊断中的临床应用[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(24): 3015-3016.
- [22] Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(73): 73ra20.

(本文编辑: 王颖)