

· 临床研究 ·

## 早产儿中性粒细胞活性氧代谢的研究

步军<sup>1,2</sup>, 孙建华<sup>2</sup>

(1. 温州医学院, 浙江 温州 325027; 2. 上海儿童医学中心新生儿科, 上海 200127)

**[摘要]** 目的 该研究通过对于不同胎龄新生儿中性粒细胞活性氧代谢水平的检测研究,以了解新生儿中性粒细胞功能发育成熟的过程,并探讨早产儿对于细菌高易感性的部分原因。方法 选择早产儿35例,分为胎龄32周以下和33~36周两组,并选择足月新生儿23例作为对照组。在新生儿出生后取脐静脉血进行体外实验,分别以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌刺激诱导呼吸爆发后用超氧阴离子特异性探针氢化溴乙非锭进行细胞内染色,通过流式细胞仪检测中性粒细胞超氧阴离子阳性细胞比率和产生水平;同时对两组不同胎龄早产儿细菌感染实际发生情况进行比较。结果 胎龄32周以下早产儿超氧阴离子阳性中性粒细胞比率与胎龄32周以上早产儿和足月新生儿相比差异有显著性,呈明显低下状态[金黄色葡萄球菌:(79.4±8.6)% vs (89±6.1)% vs (91.3±3.8)%,  $F=18.05, P<0.01$ ;大肠杆菌:(78.2±7.8)% vs (89.3±5.3)% vs (92±4.1)%,  $F=28.3, P<0.01$ ];而且阳性率和早产儿胎龄大小密切相关( $y=2.66x, P<0.01$ );但3组不同胎龄的新生儿活性氧代谢阳性细胞超氧阴离子产生水平之间的差异无显著性。临床观察发现小胎龄早产儿组全身性细菌感染实际发生率高于大胎龄组早产儿。结论 新生儿中性粒细胞细菌诱导活性氧代谢的总体能力直接和新生儿成熟度相关,在胎龄小于32周早产儿中处于明显低下状态,并随着胎龄的增加逐渐成熟。早产儿中性粒细胞活性氧代谢水平的总体低下是导致早产儿细菌感染高易感性的重要原因之一。

[中国当代儿科杂志,2007,9(4):355-357]

**[关键词]** 超氧阴离子;中性粒细胞;早产儿

**[中图分类号]** R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0355-03

### Decreased active oxygen metabolism in neutrophils of preterm infants

BU Jun, SUN Jian-Hua. Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Email: bujunshen@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To investigate the influence of neonatal maturity on active oxygen metabolism in neutrophils and possible causes of a high susceptibility to bacterial infection in preterm infants. **Methods** Thirty-five preterm infants born at a gestation age of 26-32 weeks ( $\leq 32$  weeks group,  $n=15$ ) and at 33-36 weeks ( $> 32$  weeks group,  $n=20$ ) and 23 full-term infants (control group) were enrolled in this study. The samples of whole cord blood from the two preterm groups and the control group were stimulated *in vitro* with live bacteria, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) and stained with hydroethidine, an indicator of superoxide. The percentage of neutrophils which produced superoxide and the mean fluorescence intensity for superoxide production were measured by flow cytometry. The incidence of bacterial infection during hospital stay was compared between the two preterm groups. **Results** Under *S. aureus* or *E. coli* stimulation, the percentage of neutrophils which produced superoxide in the  $\leq 32$  weeks group was significantly lower than that of the  $> 32$  weeks group and the control group ( $P<0.01$ ). The percentage of neutrophils which produced superoxide was closely related to gestational age in preterm infants ( $y=2.66x, P<0.01$ ). There were no significant differences in the blood level of superoxide production in neutrophils among the three groups. The incidence of bacterial infection during hospital stay in the  $\leq 32$  weeks group (40%) was significantly higher than that the  $> 32$  weeks group (10%) ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The capability of active oxygen metabolism in neutrophils was significantly related to the gestational age in preterm infants. The decreased capability of active oxygen metabolism might be contributed to a higher susceptibility to bacterial infection in preterm infants. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (4):355-357]

**Key words:** Superoxide; Neutrophil; Preterm infant

随着新生儿医学的发展,近十余年来早产儿的存活率有了很大的提高,但是在早产儿中严重细菌

感染性疾病如败血症和脑膜炎的发生率仍然居高不下,而且胎龄越小发生率越高,是造成早产儿死亡和

[收稿日期]2006-12-10;[修回日期]2007-02-03

[作者简介]步军,男,硕士研究生,副主任医师。主攻方向:新生儿急救、免疫。

[通讯作者]孙建华,教授,上海儿童医学中心新生儿科,邮编:200127。

致残的重要原因,因此在现代早产儿系统管理中防治感染已成为重要的组成部分。

我们以往的研究<sup>[1]</sup>已发现,新生儿中性粒细胞活性氧代谢具有与成人不同的特点,可能导致新生儿抗感染免疫机能的部分缺陷。由于早产是新生儿感染性疾病的主要高危因素之一,因此有必要对新生儿中性粒细胞活性氧代谢机能的发育过程和影响因素进行研究,本研究应用流式细胞仪技术,模拟体内杀菌过程,以新生儿易感的两种代表性细菌——金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为刺激物,在全血条件下测定早产儿中性粒细胞通过细菌吞噬诱导超氧阴离子的产生能力,以期对于早产儿中性粒细胞活性氧代谢的特点有一个初步的认识,为全面了解早产儿非特异性免疫特点和提高早产儿感染防治水平打下基础。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

2002年6月至2005年12月,选择收治本院新生儿科早产儿35例,根据胎龄分为两组,胎龄26~32周早产儿15例,出生体重850~1640g;胎龄33~36周早产儿20例,出生体重1515~2740g。另取正常足月儿23例为对照组,平均胎龄 $39.6 \pm 0.8$ 周,平均出生体重为 $3050 \pm 320$ g。入选新生儿均无严重畸形,无严重宫内窘迫和产时重度窒息史,无明显宫内感染史。其中剖宫产23例,经阴道顺产35例。新生儿出生胎盘娩出后即以无菌注射器自胎盘取脐静脉血5mL,以肝素10IU/mL抗凝,放置于室温,6h内进行检测。

### 1.2 试剂

氢化溴乙非锭(Hydroethidine)购自美国Sigma公司,用二甲亚砜(DMSO)溶解,调整浓度至2mM后储存于-80℃,使用前自然解冻后用缓冲磷酸盐溶液(PBS)稀释浓度至2μM备用。

金黄色葡萄球菌(*S. aureus*,菌株209P JC-1)和大肠杆菌(*E. coli*,菌株NIHJ JC-2)分别接种于普通琼脂平板,在37℃培养箱中培养过夜,实验前用缓冲磷酸盐溶液(PBS)洗两遍后分别用分光光度计(岛津,UV-2500PC)调整细菌浓度至 $2 \times 10^9$ /mL备用。

### 1.3 测定方法

全血中性粒细胞活性氧代谢流式细胞仪测定法<sup>[1]</sup>:在肝素化新生儿脐静脉血标本100μL中分别加入1μL稀释氢化溴乙非锭溶液,按比例将金黄色葡萄球菌或大肠杆菌混悬液分别加入试管中彻底混

匀,置37℃水浴槽振荡反应后加入稀释溶血液(FACS Lysing Solution, BD公司)2mL,置于室温以溶解红细胞,同时中止细菌和细胞间作用和固定白细胞,最后用缓冲磷酸盐溶液(PBS)洗涤细胞后通过流式细胞仪进行检测,所得数据通过CELLQuest软件分析。中性粒细胞中超氧阴离子阳性细胞比率为与阴性对照管比较所得,以百分数表示;中性粒细胞超氧阴离子产生水平以阳性细胞平均荧光强度(MFI)表示。

另外,对于35例早产儿住院期间的细菌感染情况进行汇总,分为全身感染和局部感染两类。全身感染即败血症,以中华儿科学会制订的《新生儿败血症诊疗方案》为诊断标准,包括中枢神经系统感染;局部感染包括下呼吸道、消化道、泌尿道细菌性感染。每例早产儿统计是否发生过全身和局部细菌性感染,而无论感染发生的次数。

### 1.4 统计学方法

所有实验所得数据,超氧阴离子阳性细胞比率以百分数均值±标准差表示;超氧阴离子产生水平以MFI均值±标准差表示。数据汇总后采用SPSS11.5软件包中的one way ANOVA和 $q$ 检验进行多组间数据差异性分析;采用paired sample T test进行两组间配对数据差异性分析;采用Linear Regression进行一元线性回归分析。

两组早产儿感染情况以发生例数和百分率表示,采用卡方检验中Fisher确切检验法进行差异性分析。

## 2 结果

无论刺激细菌为金黄色葡萄球菌或大肠杆菌,中性粒细胞中超氧阴离子阳性细胞比率在3组不同胎龄新生儿之间的差异均有显著性。其中胎龄<32周早产儿组超氧阴离子阳性细胞比率与胎龄33~36周早产儿组和足月新生儿组相比差异有显著性;而胎龄33~36周早产儿组和足月新生儿组之间的差异无显著性。见表1。两种不同细菌诱导下中性粒细胞超氧阴离子产生水平在3个不同胎龄新生儿组之间的差异均无显著性。诱导中性粒细胞活性氧代谢的两种不同细菌(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)之间在各胎龄新生儿组中的超氧阴离子产生细胞阳性率和产生水平上的差异均无统计学意义。在胎龄小于32周早产儿组中,早产儿胎龄和超氧阴离子阳性中性粒细胞平均比率之间密切相关,呈一元线性回归关系( $y = 2.66x, P < 0.01$ )。对于两组早产儿住院期间实际细菌感染的发生情况进行比较后

发现,胎龄 <32 周早产儿组的全身感染和局部感染发生率均高于大胎龄早产儿组,但是仅全身感染发生率的差异存在统计学意义。见表 2。

表 1 不同胎龄新生儿中性粒细胞活性氧代谢水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

年龄 (周)	细胞阳性率(%)		超氧阴离子产生强度(MFI)	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
≤32	79.4 ± 8.6	78.2 ± 7.8	413 ± 94	401 ± 105
33 ~ 36	89 ± 6.1	89.3 ± 5.3	388 ± 88	360 ± 91
≥37	91.3 ± 3.8	92 ± 4.1	362 ± 79	397 ± 94
F	18.05	28.3	1.63	1
P	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

表 2 不同胎龄早产儿感染发生率比较  
感染例数/总例数 (%)

年龄(周)	全身感染	局部感染
≤32	6/15(40) <sup>a</sup>	10/15(67)
33 ~ 36	2/20(10)	8/20(40)

a 与 33 ~ 36 周组比较 P < 0.05

### 3 讨论

中性粒细胞是人体防御的主要组成部分,在机体的感染和炎症反应中起着重要的作用。与正常成人相比较,新生儿,特别是早产儿,其中性粒细胞在粘附、变形、趋化等诸多方面功能均不成熟,而细菌吞噬功能基本达到成人水平<sup>[2]</sup>;而作为中性粒细胞杀菌主要机制之一的活性氧代谢水平可能与吞噬细菌的种类和数量有关<sup>[1]</sup>,同时新生儿在围生期的诸多病理性应激状态也可能影响新生儿中性粒细胞活性氧代谢水平。

近年 Strunk 等<sup>[3]</sup>通过超声引导脐静脉穿刺,应用流式细胞仪技术对于 21 ~ 32 周胎儿的非特异性免疫功能进行了一系列的研究,发现胎儿中性粒细胞的粘附因子表达、细胞吞噬活性与足月新生儿和成人相比明显低下;虽然甲酰基甲硫氨酸亮氨酸苯丙氨酸(fMLP)诱导活性氧代谢水平和足月新生儿相似,但由大肠杆菌吞噬诱导产生的活性氧自由基水平仍低于足月儿,而且与胎儿的成熟度密切相关。这与本研究所得的结果相一致,证明了从胎儿期至新生儿期中性粒细胞活性氧代谢功能的发育成熟是一个连续的过程,并与中性粒细胞其他功能的发育成熟同步。

我们已有的研究<sup>[1]</sup>表明,新生儿体液因子的缺陷或不足是导致中性粒细胞呼吸爆发所致活性氧代谢受到抑制的重要原因。早产儿中性粒细胞细菌吞噬作用由于 IgG 等体液调理素的不足受到影响,这

可能是引起早产儿中性粒细胞活性氧代谢功能低下的因素之一。另外,国外近年的研究<sup>[4]</sup>显示早产儿吞噬细胞炎症性细胞因子如肿瘤坏死因子-α 和白介素-6 的产生水平显著不足,并且与早产儿胎龄大小密切相关。本研究发现的早产儿中性粒细胞活性氧代谢功能和胎龄的相关性可能也与这些体液性因子有关。

对于研究对象的临床观察提示,早产儿非特异性天然免疫功能低下可能是导致细菌感染不易局限化的主要原因。另外,小胎龄组早产儿合并症和医疗干预多也是细菌性感染发生率高的重要原因。

在研究中我们还发现,虽然胎龄小于 32 周早产儿中性粒细胞中由细菌吞噬诱导所致超氧阴离子产生阳性细胞比率明显低于足月新生儿,但是其阳性细胞超氧阴离子产生水平与早产儿胎龄并不相关。在部分低胎龄早产儿中,虽然超氧阴离子阳性细胞比率明显低下,但是其阳性细胞的超氧阴离子产生水平却明显高于足月儿平均水平。提示除胎龄因素以外,还有其他因素对早产儿中性粒细胞呼吸爆发及活性氧代谢起着重要的作用,这与我们对宫内发育受限的足月小样儿中性粒细胞活性氧代谢的研究结果相一致<sup>[5]</sup>。

综合近年来国内外的研究,我们认为早产儿中性粒细胞活性氧代谢在机体整体水平和局部脏器水平可能存在不一致,同时早产儿机体抗氧化能力存在缺陷,导致了早产儿中性粒细胞活性氧代谢调节机制的不完善。因此有必要进一步的研究以明确早产儿中性粒细胞活性氧代谢特点在早产儿整体抗感染免疫、局部脏器功能损害和最终预后影响中的作用。

### [参 考 文 献]

- [1] 步军,孙建华,黄萍,敖黎明. 新生儿中性粒细胞活性氧代谢水平的研究[J]. 中华围产医学杂志,2005,8(3):183-186.
- [2] Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants [J]. Br J Haematol, 2000, 110(1):18-28.
- [3] Strunk T, Temming P, Gembruch U, Reiss I, Bucsky P, Schultz C. Differential maturation of the innate immune response in human fetuses [J]. Pediatr Res, 2004, 56(2):219-226.
- [4] Förster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, et al. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging [J]. Pediatr Res, 2005, 58(1):121-124.
- [5] 步军,孙建华,黄萍,敖黎明. 宫内发育受限新生儿中性粒细胞活性氧代谢的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(6):485-488.

(本文编辑:吉耕中)