

## 慢性肺疾病患儿外周血细胞因子的改变

罗英 唐丽君 黄为民

(南方医科大学附属南方医院新生儿科, 广东 广州 510515)

**[摘要]** 目的 观察早产儿慢性肺疾病外周血白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达,探讨免疫因素在慢性肺疾病中的可能作用。方法 26例住院满28 d的早产儿分为慢性肺疾病组(14例)和非慢性肺疾病组(对照组,12例),用液相芯片技术(Bio-plex 悬浮蛋白芯片系统)检测两组患儿外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 的表达水平。结果 慢性肺疾病组患儿外周血的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 与对照组差异均无统计学意义, $P > 0.05$ 。结论 外周血中的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 在慢性肺疾病的非急性期没有发生很大的改变,免疫因素可能不在慢性肺疾病的非急性期起作用。 [中国当代儿科杂志,2010,12(11):855-857]

**[关键词]** 白细胞介素;肿瘤坏死因子;慢性肺疾病;早产儿

**[中图分类号]** R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)11-0855-03

### Levels of cytokines in peripheral blood of premature infants with chronic lung disease

LUO Ying, TANG Li-Jun, HUANG Wei-Min. Department of Neonatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China (Huang W-M, Email: hwmnet@21cn.com)

**Abstract: Objective** This study examined the levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in peripheral blood of premature infants with chronic lung disease (CLD) in order to investigate the possible role of immunologic factors in CLD. **Methods** Twenty-six premature infants who had been admitted to the neonatal intensive care unit for 28 days were classified into CLD ( $n = 14$ ) and non-CLD (control,  $n = 12$ ) groups. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  concentrations in peripheral blood were measured by multiplex technique (Bio-plex). **Results** There were no significant differences in peripheral blood levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  between the two groups. **Conclusions** There are no significant changes in peripheral blood levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in premature infants with CLD on the non-acute phase. Immunologic factors might not play a key role in CLD on the phase.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (11):855-857]

**Key words:** Interleukin; Tumor necrosis factor; Chronic lung disease; Premature infant

炎症反应是早产儿慢性肺疾病(CLD)的主要发病机制<sup>[1-2]</sup>,细胞因子在这个过程中起着重要的作用。目前对细胞因子的研究以动物实验居多,临床研究很少,且临床研究的样本量一般较少,以研究肺部细胞因子的变化为主,患儿外周血细胞因子的研究很少。研究表明,支气管肺泡灌洗液(BALF)中早期白介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等持续高水平表达是早产儿CLD的重要特征<sup>[3-9]</sup>。这些细胞因子在患儿的外周血中是否也发生了类似的变化,并且持续到病程后期,国内外鲜见报道。有学者对CLD发病的整个过程的BALF和外周血的IL-6与IL-1 $\beta$ 做了研究,未得出统计学上的差异<sup>[10]</sup>。本研究对住院满28 d的CLD患儿和

非CLD患儿外周血的细胞因子进行测定,研究全身性免疫因素与CLD之间的关系,探讨其在CLD中的可能作用。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

1.1.1 收集2007年10月至2009年3月南方医科大学附属南方医院、南方医科大学附属珠江医院、广州市儿童医院、广州医学院附属第三人民医院、广东省妇幼保健院新生儿科26名早产儿为研究对象,胎龄为28~33周,体重为700~2 500 g,均住院满28 d。根据有无CLD将研究对象分为两组:CLD组14例;

[收稿日期]2010-03-07; [修回日期]2010-04-19

[基金项目]广东省自然科学基金(7005170),自由申请项目。

[作者简介]罗英,女,硕士研究生,医师。

[通信作者]黄为民,教授。

对照组 12 例。两组孕周及体重比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。先天性肺发育不良患儿被排除。

1.1.2 CLD 诊断标准 出生后 28 d 仍需氧疗,或矫正胎龄 36 周时仍需氧疗或机械通气者<sup>[11]</sup>。

### 1.2 试剂与仪器

PHA(美国, Sigma 公司), RPMI 1640 基础培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3), Bio-Plex™ human cytokine 17-plex panel(美国, Bio-Rad 公司), Bio-Plex cytokine reagent kit(美国, Bio-Rad 公司), 96 孔细胞培养板, SW-CJ-10 型超净工作台(苏州净化设备有限公司), 3111 型水套式 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Thermo Forma 公司), 微量高速离心机(美国 KENDRO), Bio-Plex 悬浮蛋白芯片系统(美国, Bio-Rad 公司)。

### 1.3 实验方法

在出生后 28 d 时无菌抽取外周静脉血 2 mL, 肝素钠抗凝。取 200 μL 加入 96 孔板, 再加入 10 μL PHA(10 ng/mL)混匀, 放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱里孵育 12 h, 离心(300 G, 5 min), 收集上清, -20℃ 保存待检。用 Bio-Plex 悬浮蛋白芯片系统检测细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α。将待测全血上清标本与 beads 混匀孵育 30 min, 再加入检测抗体孵育 30 min, 最后加入 Streptavidin-PE 染色后上机检测(详细步骤参见 Bio-Plex™ human cytokine 17-plex panel 说明书)。Bio-Plex 悬浮蛋白芯片系统检测细胞因子后系统自动生成详细的检测报告。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

26 例早产儿中 CLD 14 人, 其中男 11 例, 女 3 例, 男:女为 3.7:1, 胎龄 28~32 周的 13 例, >32 周的 1 例; 出生体重 <1 000 g 2 例, 1 000 g~7 例, 1 500 g~5 例。对照组 12 例, 其中男 9 例, 女 3 例, 男:女为 3:1, 胎龄 28~32 周的 11 例, >32 周的 1 例; 出生体重 <1 000 g 1 例, 1 000 g~7 例, 1 500 g~4 例。两组基础治疗相同:控制感染、综合治疗(静脉营养支持、改善微循环、补充微量元素、维持电解质和酸碱平衡等)。

### 2.2 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 检测

本研究发现 CLD 组和对照组相比, 两组外周血 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平差异均无统计学意义,  $P > 0.05$ 。见表 1。

表 1 两组 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的检测结果  
(中位数, pg/mL)

组别	IL-6	IL-8	TNF-α	IL-1β
对照组	297	1 515	68	224
CLD 组	566	1 500	105	51
Z 值	-0.21	-0.26	-0.72	-1.23
P 值	0.84	0.8	0.47	0.22

## 3 讨论

早产儿 CLD 目前定义为出生后 28 d 仍需氧疗, 或矫正胎龄 36 周时仍需氧疗者。目前最常用的是矫正胎龄 36 周时仍需氧疗<sup>[11]</sup>。CLD 是一个多因素疾病, 母亲患绒毛膜羊膜炎、宫内感染、产前未接受糖皮质激素治疗、新生儿早期感染、氧疗、机械通气、早产、低出生体重、男性及遗传因素等均与 CLD 的发生有关<sup>[12]</sup>。其中, 炎症反应是 CLD 的主要发病机制。目前认为维持前炎症因子和抗炎因子的平衡是避免发生慢性肺疾病的关键<sup>[1-2]</sup>。

在高氧诱导的急性肺损伤中, 前炎症因子可以募集中性粒细胞至肺组织, 增加肺组织的渗透性, 诱发内皮细胞及上皮细胞的损伤, 与支气管肺发育不良(BPD)的发生密切相关。其中 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等细胞因子的作用倍受关注。许多研究表明, 母亲患有绒毛膜羊膜炎的早产儿出生时 BALF 中 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等细胞因子升高, 这些因子是预示早产儿肺产生不利结局的重要标志物<sup>[9,13-14]</sup>。Jónsson 等<sup>[9]</sup>发现 CLD 的早产儿在出生后 2~3 d, 甚至 1 d 时 BALF 中 IL-6、TNF-α 含量已明显增高。这些因子的升高与氧疗及机械通气持续的时间呈正相关。早期 IL-1β 升高预示早产儿对机械通气和氧疗的需求增加, IL-1β 与 IL-6 比值升高也是早产儿发展为 CLD 的风险因素<sup>[15]</sup>。还有研究表明, CLD 患儿 BALF 中前炎症因子 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等的水平明显升高, 于出生后 1 周内逐渐增加, 接近 2 周时达高峰, 并持续存在, 甚至达几周以上, 且最终发展为 BPD 的患儿高于非 BPD 患儿<sup>[16]</sup>。BALF 中早期 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等高水平并持续表达是早产儿 CLD 的重要特征<sup>[3-9]</sup>, 动态观察 BALF 中细胞因子水平可能有助于 CLD 的早期诊断及预后判定<sup>[17]</sup>。但有学者对 BALF 和血清中 IL-6 与 IL-1β 在出生后第 1 天、第 5~7 天、第 12~14 天、第 19~21 天及第 26~28 天的水平进行了研究, 结果显示只有在第 1 天 BALF 和血清中 IL-6 与 IL-1β 有显著相关性, 其他时间点 BALF 和血清中两因子

无相关性<sup>[10]</sup>。故这些细胞因子持续表达的时间及其在外周血中的改变如何尚有争议,且外周血的研究鲜见报道。

本研究检测了住院满28 d的早产儿外周血IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ 的水平,结果显示,CLD组和对照组患儿在28 d时外周血IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ 的差别无统计学意义,可能与以下6个因素有关。①检测时间点:单个时间点检测,细胞因子变化受影响因素较多,波动范围很大,动态监测可能会有新的发现;②病程的长短:本试验研究生后28 d,而很多的研究为生后1、3或5 d等<sup>[18]</sup>;③研究对象:有的为呼吸窘迫综合征<sup>[10]</sup>,有的为不同的通气方式或通气浓度等<sup>[18]</sup>;④样本量:多中心、大样本的研究获得的数据更有说服力。由于该疾病的临床标本来源少,进行更大样本量的研究有一定的困难。如果增加样本量,并在疾病的早期监测细胞因子的变化,可能有助于更好地研究CLD的发病机制;⑤标本来源:本研究采集早产儿外周血为样本,国外少见报道;⑥检测手段:不同的实验技术可能敏感性不同,细胞因子对任何条件变化都非常敏感,故可能导致不同的结果。有学者提出应该找到一些可以预测CLD发生的标志物进而防止其发生和发展<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,全身性免疫因素可能不在CLD的非急性期起作用。在已经患有CLD的早产儿中监测外周血细胞因子的变化其临床意义还需进一步研究。本研究的局限性在于未能对CLD发病早期外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ 的水平进行检测,以动态监测这些因子在CLD发生发展中的变化。早期外周血中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8及TNF- $\alpha$ 是否在CLD患儿中发生了根本性的改变,其变化如何需要进一步探讨。

### [参 考 文 献]

[1] Bose CL, Dammann CE, Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008, 93(6): F455-F461.

[2] Merritt TA, Deming DD, Boynton BR. The 'new' bronchopulmonary dysplasia: challenges and commentary[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(6):345-357.

[3] Cayabyab RG, Jones CA, Kwong KY, Hendershott C, Lecart C, Mino P, et al. Interleukin-1beta in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome[J]. Matern Fetal Neonatal Med, 2003, 14(3): 205-211.

[4] Kunzmann S, Speer CP, Jobe AH, Kramer BW. Antenatal inflammation induced TGF-beta1 but suppressed CTGF in preterm lungs[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1):

223-231.

[5] Truog WE, Ballard PL, Norberg M, Golombek S, Savani RC, Merrill JD, et al. Inflammatory markers and mediators in tracheal fluid of premature infants treated with inhaled nitric oxide[J]. Pediatrics, 2007, 119(4): 670-678.

[6] De Dooy J, Ieven M, Stevens W, De Clerck L, Mahieu L. High levels of CXCL8 in tracheal aspirate samples taken at birth are associated with adverse respiratory outcome only in preterm infants younger than 28 weeks gestation[J]. Pediatr Pulmonol, 2007, 42(3): 193-203.

[7] Vento G, Matassa PG, Ameglio F, Capoluongo E, Zecca E, Torotorolo L, et al. HFOV in premature neonates: effects on pulmonary mechanics and epithelial lining fluid cytokines. A randomized controlled trial[J]. Intensive Care Med, 2005, 31(3): 463-470.

[8] Von der Hardt K, Kandler MA, Fink L, Schoof E, Dötsch J, Brandenstein O, et al. High frequency oscillatory ventilation suppresses inflammatory response in lung tissue and microdissected alveolar macrophages in surfactant depleted piglets[J]. Pediatr Res, 2004, 55(2): 339-346.

[9] Jönsson B, Tullus K, Brauner A, Lu Y, Noack G. Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1997, 77(3): 198-201.

[10] Kazzi SN, Romero R, McLaughlin K, Ager J, Janisse J. Serial changes in levels of IL-6 and IL-1beta in premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia[J]. Pediatr Pulmonol, 2001, 31(3): 220-226.

[11] Van Marter LJ. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(6): 358-366.

[12] Deakins KM. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Respir Care, 2009, 54(9): 1252-1262.

[13] Patterson AM, Taciak V, Lovchik J, Fox RE, Campbell AB, Viscardi RM. Ureaplasma urealyticum respiratory tract colonization is associated with an increase in interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha relative to interleukin 6 in tracheal aspirates of preterm infants[J]. Pediatr Infect Dis J, 1998, 17(4): 321-328.

[14] An H, Nishimaki S, Ohyama M, Haruki A, Naruto T, Kobayashi N, et al. Interleukin-6, interleukin-8, and soluble tumor necrosis factor receptor- I in the cord blood as predictors of chronic lung disease in premature infants[J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 191(5): 1649-1654.

[15] Mahieu LM, De Dooy JJ, Ieven MM, Bridts CH, Stevens WJ. Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and decreased levels of interleukin-12 p70 in tracheal aspirates, within 2 hrs after birth, are associated with mortality among ventilated preterm infants[J]. Pediatr Crit Care Med, 2005, 6(6): 682-689.

[16] Tullus K, Noack GW, Burman LG, Nilsson R, Wretling B, Brauner A. Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia [J]. Eur J Pediatr, 1996, 155(2): 112-116.

[17] 富建华. 细胞因子在早产儿慢性肺疾病发生中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(5):488-491.

[18] Capoluongo E, Vento G, Santonocito C, Matassa PG, Vaccarella C, Giardina B, et al. Comparison of serum levels of seven cytokines in premature newborns undergoing different ventilatory procedures: high frequency oscillatory ventilation or synchronized intermittent mandatory ventilation[J]. Eur Cytokine Netw, 2005, 16(3): 199-205.

[19] Thompson A, Bhandari V. Pulmonary biomarkers of bronchopulmonary dysplasia[J]. Biomark Insights, 2008, 3: 361-373.

(本文编辑:黄 榕)