

·论著·

宫内发育受限新生儿中性粒细胞 活性氧代谢的研究

步军,孙建华,黄萍,敖黎明

(上海第二医科大学新华医院/上海儿童医学中心内科,上海 200127)

[摘要] 目的 本研究拟通过对宫内发育受限新生儿中性粒细胞受不同刺激后所产生的超氧阴离子水平进行检测,并与正常新生儿进行比较,以了解宫内发育受限对于新生儿中性粒细胞活性氧代谢水平的影响,为进一步研究宫内发育受限对于新生儿整体免疫功能的影响打下基础。方法 选择15例宫内发育受限新生儿脐静脉血,加以乙酸肉豆蔻佛波醇(PMA)和两种细菌(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)刺激,用超氧阴离子特异性探针氢化溴乙非啶染色,通过流式细胞仪技术以平均荧光强度测定法对中性粒细胞超氧阴离子产生水平进行检测,并取正常足月新生儿脐带血23例作为对照。结果 宫内发育受限新生儿中性粒细胞超氧阴离子产生水平(以平均荧光强度MFI为计量单位)在不同条件刺激下均与正常足月新生儿中性粒细胞有显著性差异(PMA:448 ±131 vs 314 ±89, $P < 0.01$;金黄色葡萄球菌:471 ±142 vs 362 ±79, $P < 0.01$;大肠杆菌:502 ±133 vs 396 ±94, $P < 0.01$);而其中性粒细胞细菌吞噬能力与正常足月儿相比无明显差异。结论 无明确诱因的宫内发育受限新生儿的中性粒细胞在宫内也可能被某些病理因素所激活,导致了细胞活性氧代谢水平的显著增高。

[中国当代儿科杂志,2004,6(6):485-488]

[关键词] 超氧阴离子;中性粒细胞;宫内发育受限;新生儿

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)06-0485-04

Activated oxygen metabolism of neutrophils in neonates with intrauterine growth restriction

Jun BU, Jian2Hua SUN, Ping HUANG, Li2Ming AO. Department of Internal Medicine, Shanghai Children's Medical Center, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China (Email: bujunshcn@hotmail.com)

Abstract : Objective This study examined the levels of the superoxide anion produced by neutrophils after different stimulations in neonates with isolated intrauterine growth restriction (IU GR) in order to clarify the effects of IU GR on activated oxygen metabolism of neutrophils in neonates. **Methods** Fifteen samples of cord venous blood from neonates with isolated IU GR (IU GR group) were stimulated with either phorbol myristate acetate (PMA) or bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), and then stained with hydroethedine, an indicator of superoxide. The samples were analyzed on granulocyte gate by flow cytometry. The mean fluorescence for superoxide anion production was acquired, and was compared with 23 samples from normal full-term neonates (Control group). **Results** The superoxide anion level (demonstrated by mean fluorescence intensity, MFI) of the IU GR group was significantly higher than that of the Control group after PMA stimulation (448 ±131 vs 314 ±89; $P < 0.01$). Significant differences were also found in the superoxide anion level between the IU GR and Control groups after either *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* stimulations (471 ±142 vs 362 ±79 and 502 ±133 vs 396 ±94; both $P < 0.01$). The ability of bacterial phagocytosis was the same for the two groups. **Conclusions** Neutrophils from neonates with isolated IU GR may be activated by some pathologic factors in uterus and yield an increased level of activated oxygen metabolism.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(6):485-488]

[收稿日期] 2004-03-15; [修回日期] 2004-06-18
[作者简介] 步军(1969-),男,大学,主治医师。主攻方向:新生儿急救、免疫。
[通讯作者] 步军,上海市浦东新区东方路1678号,邮编:200127。

Key words: Superoxide anion; Neutrophil; Intrauterine growth restriction; Neonate

宫内发育受限 (intrauterine growth restriction, IU GR) 新生儿又称小于胎龄儿或小样儿, 在正常出生儿中占有一定的比例。近年来对于宫内发育受限病因学的研究表明免疫因素在其发生中起着重要的作用, 如母体中性粒细胞的激活和免疫损伤作用受到了广泛的重视。研究发现发生胎儿 IU GR 的孕妇中性粒细胞常处于被激活状态, 其表面黏附分子表达水平和细胞的凋亡较正常妊娠者有着明显改变, 活性氧代谢水平也有显著升高^[1,2]。但是针对 IU GR 对于胎儿和新生儿免疫系统影响的研究相对较少, 对于新生儿中性粒细胞功能的影响则未见于国内外文献报道。本研究采用流式细胞仪技术对于无明确诱因的 IU GR 新生儿的脐带血中性粒细胞超氧阴离子产生水平进行检测, 并与正常新生儿进行比较, 以期对这部分新生儿非特异性免疫的重要组成部分——中性粒细胞部分功能的改变有所了解, 为进一步研究胎儿 IU GR 对于新生儿整体免疫功能的影响以及免疫系统在 IU GR 新生儿脏器功能损害中作用的研究打下基础。

1 资料和方法

1.1 研究对象

2001年6月至2003年5月我院产科分娩的 IU GR 新生儿 15 例, 平均胎龄 38.5 ± 1.0 周, 平均出生体重 1995 ± 290 g, 均低于同胎龄出生体重儿标准第三个百分位。均为正常阴道顺产, Apgar 评分 8 分, 无窒息抢救史, 新生儿无明显畸形, 胎盘和脐带无明显外观异常, 母孕期无明显疾病及妊娠合并症史。同期我院产科分娩的正常足月儿 23 例, 平均胎龄 39.6 ± 0.8 周, 平均出生体重 3050 ± 320 g, 均为正常阴道顺产, 孕母无妊娠合并症, 新生儿无窒息抢救史。

当新生儿出生胎盘娩出后即刻以无菌注射器自胎盘取脐静脉血 5 ml, 以肝素 10 IU/ml 抗凝, 放置于室温, 6 h 内进行检测。

1.2 试剂

氫化溴乙非啶 (Hydroethidine, HE) 购自美国 Sigma 公司, 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 调整浓度至 2 mM 后避光储存于 -80°C , 使用前自然解冻后用缓冲磷酸盐 (PBS) 稀释浓度至 $2 \mu\text{M}$ 备用。乙酸肉豆蔻佛波醇 (phorbol myristate acetate, PMA) 购自美国 Sigma 公司, 用纯乙醇溶解后储存于 -24°C , 使

用前用蒸馏水稀释 40 倍备用, 最终作用浓度为 $4 \times 10^{-7}\text{M}$ 。金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*, 209P JC21) 和大肠杆菌 (*E. coli*, NIH J C22) 菌株接种于普通琼脂平板, 在 37 培养箱中培养过夜, 实验前用 PBS 洗两遍, 重悬后再用分光光度计 (岛津, UV2 2500PC) 调整细菌浓度至 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 备用。异硫氰基荧光素 (FITC) 标识的大肠杆菌死菌体购自美国 Molecular Probes 公司, 按产品说明书要求完全溶解于无菌 PBS, 调整细菌浓度至 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 后储存于 4 备用。

1.3 测定方法

中性粒细胞超氧阴离子产生水平和吞噬能力测定法由 Perticarari 氏所创方法^[3]改良而来。实验血标本采集后均作中性粒细胞计数。具体实验步骤简述如下: 每份标本取 500 μl 肝素化脐静脉血分别置于 5 个 1.5 ml 无菌 Eppendorf 试管中, 每管 100 μl , 之后将 1 μl 已稀释的 HE 溶液分别加入各试管, 混匀后置于冰上。再在各试管中分别加入已稀释的乙酸肉豆蔻佛波醇 (PMA) 溶液和细菌细胞数比例为 40:1 的金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌活菌或 FITC 荧光标识的大肠杆菌死菌混悬液彻底混匀, 置 37 水浴槽振荡反应 60 min, 最后加入稀释专用溶血液 1 ml 混匀后置室温 15 min 以固定白细胞, 中止细菌与细胞间作用以及溶解红细胞, 用 PBS 洗细胞两遍后重悬细胞于 1 ml PBS 中混匀, 即刻用流式细胞仪 FACScan (Becton Dickinson) 检测。在流式细胞仪上中性粒细胞 (多形核白细胞) 群由前向散射光 (FSC) 和侧向散射光 (SSC) 区分。由 HE 的氧化产物 - 溴化二氢乙苯啡啶 (ethidium bromide) 所发出的红色荧光被 FL2 通道所收集, 由 FITC 所发出的绿色荧光由 FL1 通道所收集。每支试管记录分析共 10 000 个被选细胞, 所得数据通过 CELLQuest 软件分析。中性粒细胞超氧阴离子产生水平或细菌吞噬能力分别由 FL2 或 FL1 通道所获得平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 代表。

1.4 统计学处理

所有实验所得的数据, 包括中性粒细胞超氧阴离子产生水平和细菌吞噬能力, 均以从流式细胞仪的 CELLQuest 软件统计所得 MFI 值作为计量单位, 以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 软件包中独立样本 *t* 检验 (Independent 2 Samples *t* Test) 进行两组间差异性分析。

2 结果

2.1 两组新生儿脐血中性粒细胞计数比较

IUGR 新生儿组脐带血中性粒细胞计数为 $(12.78 \pm 2.03) \times 10^9/L$, 正常新生儿组脐带血中性粒细胞计数为 $(13.70 \pm 2.19) \times 10^9/L$, IUGR 新生儿组细胞数略低于正常组, 但两组之间差异无统计学意义 ($t = 1.33, P > 0.05$)。

2.2 两组新生儿脐血中性粒细胞在不同条件刺激下超氧阴离子产生水平比较

用蛋白激酶 C 激活剂 PMA 刺激后 IUGR 新生儿中性粒细胞超氧阴离子的产生水平与正常新生儿细胞相比存在显著差异性。(MFI: 448 ± 131 vs $314 \pm 89, t = 3.77, P < 0.01$)。在金黄色葡萄球菌和大肠杆菌活菌刺激下 IUGR 新生儿组中性粒细胞超氧阴离子产生水平与正常新生儿对照组相比同样差异具有显著性。但同一实验组中不同刺激菌种之间的差异在两组中均无统计学意义 ($t = 1.36, P > 0.05; t = 0.63, P > 0.05$)。(见表 1)

表 1 不同细菌刺激下新生儿中性粒细胞超氧阴离子产生水平的比较

Table 1 Levels of superoxide anion produced by neutrophils in neonates following bacteria stimulations

	($\bar{x} \pm s, MFI$)		
	例数	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
正常对照组	23	362 ± 79	396 ± 94
IUGR 组	15	471 ± 142	502 ± 133
t 值		3.03	2.88
P 值		<0.01	<0.01

2.3 两组新生儿脐血中性粒细胞细菌吞噬能力比较

大肠杆菌吞噬实验显示 IUGR 新生儿中性粒细胞细菌吞噬能力与正常足月儿相比, 两组之间差异无统计学意义。(MFI: 2467 ± 310 vs $2260 \pm 269, t = 1.30, P > 0.05$)

3 讨论

IUGR 新生儿又称小于胎龄儿, 已知病因包括孕母疾患和妊娠合并症, 胎儿感染和畸形, 多胎妊娠等, 但约有 40% 发生于正常妊娠。其病理生理特点较之正常适于胎龄儿有着显著的改变, 而一些变化

对于这些新生儿的远期预后有着重大的影响^[4]。

本研究应用流式细胞仪技术, 在全血条件下测定无明确诱因的 IUGR 新生儿脐带血中性粒细胞超氧阴离子的产生水平, 以探讨宫内发育异常新生儿中性粒细胞活性氧代谢的变化。

本研究结果显示, IUGR 新生儿脐带血中性粒细胞数量与正常足月儿基本相同, 但是无论其刺激途径是通过 PMA 直接激活蛋白激酶 C, 或通过细菌吞噬作用激活 NADPH 氧化酶, 最后呼吸爆发所产生的超氧阴离子水平均明显高于正常足月新生儿; 其次, 与正常足月新生儿一样, IUGR 新生儿中性粒细胞由细菌吞噬所诱导产生的超氧阴离子水平在不同吞噬菌种之间差异无显著性; 最后, 发现 IUGR 新生儿中性粒细胞的细菌吞噬能力与正常足月新生儿相同, 证明除细菌吞噬以外, 中性粒细胞活性氧代谢还受其他因素影响。

中性粒细胞在人体的非特异性免疫中起着重要的作用, 特别在机体的杀菌机制中起着关键性的作用。而中性粒细胞通过呼吸爆发产生超氧阴离子等活性氧自由基是其杀菌的重要机制之一^[5]。另一方面, 当产生的活性氧自由基溢出细胞外则可能损伤机体组织, 造成脏器功能损害。已有研究表明新生儿中性粒细胞活性氧代谢不同于成人^[6], 其中活性氧自由基的产生受体液因素影响很大^[7]。本研究发现, 无明确诱因而发生的 IUGR 新生儿中性粒细胞处于激活状态, 受刺激后细胞活性氧代谢水平明显升高。活性氧代谢产物在一些新生儿疾病如支气管肺发育不良和围产期脑损伤的发病机制中起了重要的作用^[8,9]。而新生儿体内的一些抗氧化酶活性较成人明显低下, 则是易造成组织免疫损伤的另一个重要原因。因此需要作进一步研究以探讨 IUGR 新生儿中性粒细胞的激活状态和在这些新生儿经常发生的脏器功能损害如脑损伤之间的关系。

[参 考 文 献]

- [1] von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction [J]. Am J Obstet Gynecol, 1999, 181(2): 408-414.
- [2] Sabatier F, Bretelle F, D'Ercole C, Boublil L, Sampol J, Dignat-George F. Neutrophil activation in preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction [J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(6): 1558-1563.
- [3] Perticarari S, Presani G, Banfi E. A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood [J]. J Immunol Methods, 1994, 170(1): 117-124.
- [4] 赵学军, 吴圣楣. 小于胎龄儿的特点和护理 [A]. 见: 金汉珍,

黄德珉,官希吉 1 实用新生儿学 [M]1 第3版 1 北京:人民卫生出版社,2002, 209 - 217.

[5] Forehand JR, Johnston RB Jr. Chronic granulomatous disease: newly defined molecular abnormalities explain disease variability and normal phagocyte physiology [J]. *Curr Opin Pediatr*, 1994, 6(6): 668 - 675.

[6] Komatsu H, Tsukimori K, Hata K, Satoh S, Nakano H. The characterization of superoxide production of human neonatal neutrophil [J]. *Early Hum Dev*, 2001, 65(1): 11 - 19.

[7] Fujiwara T, Kobayashi T, Takaya J, Taniuchi S, Kobayashi Y. Plasma effects on phagocytic activity and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear leukocytes in neonates [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, 85(1): 67 - 72.

[8] Davis JM. Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease [J]. *Acta Paediatr Suppl*, 2002, 91(437): 23 - 25.

[9] Buoncore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn [J]. *Biol Neonate*, 2001, 79(3 - 4): 180 - 186.

(本文编辑:钟乐)

病例报告

婴儿传染性单核细胞增多症并发溶血尿毒综合征 1 例报告

赵丽,张秋河,王淑玉,郑一博,杜志芳

(石家庄白求恩国际和平医院儿科,河北 石家庄 050082)

[中图分类号] R512.7 [文献标识码] E

患儿,男,11月。因咳嗽、发热 10 d,面色进行性苍黄 2 d 入院。患儿于 10 d 前无明显诱因开始出现发热、咳嗽、呈阵发性,无痰,伴喘息,体温波动在 39 ~ 40 之间,家长予以服“罗红霉素、阿齐霉素”等药物 5 d,症状无缓解,在当地医院查血常规:WBC $29.9 \times 10^9/L$,N 0.38,L 0.34,M 0.9,幼粒 0.1,异淋 0.18。诊断“传染性单核细胞增多症”,静脉应用喜炎平 2 ml,青霉素 240 万 U 共 5 d,仍不见明显好转,入院前 1 d 面色出现进行性苍黄,精神差,尿色呈深黄色,门诊以“传染性单核细胞增多症”收住院。

体检:T 38.4, P 130 次/min,呼吸急促,精神差,贫血貌,皮肤及巩膜重度黄染,面部及双下肢轻度浮肿,浅表淋巴结未触及,轻度鼻扇,口唇苍白,咽部微充血;双侧扁桃体不大,右中下肺叩诊实音。心率 130 次/min,律齐,心音有力,各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。腹部饱满,未触及包块,肝肋下 2.5 cm,脾左肋下 3 cm,质中,布氏征、克氏征和巴氏征阴性。

实验室检查:肝功能:ALT 93 mmol/L;TBIL 354.8 $\mu\text{mol/L}$;肾功能:肌酐 222 $\mu\text{mol/L}$ 尿素氮 35.9 mmol/L;CO₂ CP 11.5 mol/L,血常规:WBC $13.0 \times 10^9/L$,N 0.79,M 0.2,L 0.18,RBC $1.98 \times 10^{12}/L$,HGB 46 g/L,网织红 $32 \times 10^9/L$,PLT $30 \times 10^9/L$ 。

尿常规:蛋白(++++) ,潜血(+++) ,胆红素(+++),白细胞(+)。血清嗜异性凝集试验:1/56,冷凝集试验 1/4 以下。胸部 X 线示右下肺见大片高密度阴影。X 线诊

断:右中下肺大叶性肺炎。胸部 CT 检查:右中、下大叶性肺炎;左舌叶感染;右胸腔积液。

临床诊断: 传染性单核细胞增多症。 溶血尿毒综合征。患儿入院后面色苍黄进行性加重,精神差,少尿,全身浮肿加重,第 1 天 24 h 排尿 200 ml,为酱油样,第 2 天患儿病情进一步加重,呈昏迷状,全天无尿,针刺部位出血不止。先后给予青霉素、罗氏芬、大剂量丙种球蛋白、多巴胺、酚妥拉明、速尿、利尿合剂、新鲜冰冻血小板、人血白蛋白、洗涤红细胞等综合治疗,病情无好转,于入院第 56 小时死亡。

讨论:传染性单核细胞增多症是一种单核巨噬细胞系统急性增生性传染病。多见年长儿和少年,既往报道 6 岁以下幼儿常表现为轻症,甚至隐性感染。本病例虽无颈部淋巴结肿大,咽峡炎及皮疹等传染性单核细胞增多症的一些典型症状,但患儿持续发热 10 d,肝脾肿大,同时肺部受累,出现肺炎,胸膜炎,经抗细菌、病毒及支原体治疗无效,外周血象支持传染性单核细胞增多症的诊断。本病例在病程 1 周后出现进行性面色苍黄、浮肿、皮肤及巩膜重度黄染,红细胞及血红蛋白明显降低、网织红细胞增高、血小板减少、肾功能衰竭等特征,符合溶血性尿毒综合征表现。因不能进行透析治疗,抢救失败。本病例提示:婴儿传染性单核细胞增多症临床症状不典型,但其并发症多严重;婴儿传染性单核细胞增多症在病程早期宜短期应用肾上腺皮质激素,可减轻症状,减少并发症的发生。出现并发溶血尿毒综合征应尽早采用激素、抗凝、透析治疗等抢救否则预后险恶。

(本文编辑:吉耕中)

[收稿日期] 2004 - 03 - 01; [修回日期] 2004 - 07 - 01
[作者简介] 赵丽(1954 -),女,大学,主任医师。主攻方向:儿童血液病。