

论著 · 临床研究

肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液和血清中肺表面活性蛋白的变化及意义

舒林华¹ 尚云晓¹ 蔡栩栩¹ 张晗¹ 李森¹
周倩兰¹ 宗志红² 孟晓娜² 李想¹ 刘芬¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科, 辽宁 沈阳 110004;
2. 中国医科大学生化与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 研究肺表面活性蛋白在小儿肺炎支原体肺炎(MPP)血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中的变化及意义。方法 根据肺 CT 结果将 47 例 MPP 患儿分为两组:单侧病变组($n=32$)和双侧病变组($n=15$)。采用 ELISA 法检测两组患儿 BALF 和血清中肺表面活性蛋白 A、B、C、D(SP-A、B、C、D)的含量。血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性采用 Spearman 秩相关分析。结果 两组患儿中,主病变侧或病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量显著高于次病变侧或健侧 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 含量($P<0.01$)。单侧病变组患儿血清中 SP-A、B、C 含量显著低于健侧 BALF 中含量($P<0.01$ 或 0.05),而血清中 SP-D 含量与健侧 BALF 中 SP-D 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。双侧病变组患儿血清中 SP-A、B、C、D 含量与次病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。Spearman 秩相关分析显示,双侧病变组患儿中血清 SP-D 含量与主病变侧 BALF 中 SP-D 含量呈密切正相关($P<0.01$)。结论 血清中 SP-D 可作为反映小儿社区获得性肺炎肺组织感染损伤严重程度的生化指标。
[中国当代儿科杂志,2012,14(12):928-932]

[关键词] 社区获得性肺炎;支气管肺泡灌洗液;肺表面活性蛋白;儿童
[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)12-0928-05

Changes to surfactant proteins in the bronchoalveolar lavage fluid and serum of children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia

SHU Lin-Hua, SHANG Yun-Xiao, CAI Xu-Xu, ZHANG Han, LI Miao, ZHOU Qian-Lan, ZONG Zhi-Hong, MENG Xiao-Na, LI Xiang, LIU Fen. Department of Pediatric Pulmonology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: shulinhua@126.com)

Abstract: Objective To study the changes to surfactant proteins in the serum and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) of children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) and their significance. **Methods** Self-control method was used in the study. Forty-seven MPP children were divided into single lung infected ($n=32$) and bilateral lung infected groups ($n=15$) according to lung CT results. Surfactant proteins SP-A, B, C and D were measured using ELISA in the serum and BALF in the two groups. The correlations between SP-A, B, C and D content in the serum and BALF were evaluated by Spearman correlation analysis. **Results** SP-A, B, C and D content in BALF from the majorly infected or infected lung were significantly higher than from the opposite lung and serum ($P<0.01$). SP-A, B and C content in serum was significantly lower than in BALF from the non-infected lung in the single-side infected lung group ($P<0.01$ or 0.05), but there was no significant difference between serum SP-D content and BALF SP-D content from the non-infected lung. There were no significant differences in SP-A, B, C and D content in serum and BALF from the minorly infected lung in the bilateral lung infected group. Serum SP-D content was positively correlated with BALF SP-D content from the majorly infected lung in the bilateral lung infected group ($P<0.01$). **Conclusions** Serum SP-D content may serve as a biomarker for evaluating the severity of pulmonary infection in children with community-acquired pneumonia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):928-932]

Key words: Community-acquired pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Pulmonary surfactant protein; Child

[收稿日期]2012-08-20;[修回日期]2012-10-31
[基金项目] 辽宁省自然科学基金(项目编号:201102265);沈阳市科技局课题(项目编号:F11-264-1-06)。
[作者简介]舒林华,博士,副教授。

小儿社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 在儿童时期发病率和病死率极高^[1-2],常引起发热、咳嗽、呼吸困难等临床表现,炎症侵犯至肺实质时常伴有肺实变,严重者常伴有胸腔积液、脓胸、气胸、脓气胸、肺组织坏死性空洞等。常见的致病原微生物有细菌、病毒和支原体衣原体等。目前小儿 CAP 的临床化验检查只能反映宿主被感染后周身炎症状况,不能反映感染后肺组织的炎症和损伤程度,无法对病情及预后做出客观的评估。胸部影像学只能提供肺组织感染的部位、范围,但不能通过被感染肺组织组织密度的变化反映肺组织细胞损伤的程度和状况,因此,临床上亟需寻找能够反映肺组织被感染后损伤程度的生化指标,以评估肺组织感染后损伤严重程度,预测治疗后肺组织恢复状况,缩短疗程,降低和减少抗菌素的使用。

肺表面活性蛋白 A、B、C、D (pulmonary surfactant protein A, B, C, D, SP-A、B、C、D) 是由肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar epithelial cell type II, AEC-II) 和气道 Clara 细胞合成并分泌到肺泡腔中的胶原糖蛋白,在肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 的结构、功能和代谢方面起着关键作用^[3]。SP-A、D 在肺局部先天免疫方面起着重要作用^[4],可以抑制革兰阴性杆菌和支原体的生长^[4],并与各种病原微生物上的配体结合,促进肺泡巨噬细胞对病原微生物的清除^[5]。舒林华等^[6-7]的动物研究发现,内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 幼鼠肺组织 SP-A、D 水平在 AEC-II 损伤初期逐渐升高,在 AEC-II 损伤严重时显著下降,表明 SP-A、D 的变化反映了感染时肺组织 AEC-II 的损伤程度。临床研究显示在急性肺损伤患儿血浆中 SP-A、B、D 明显升高,而在支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 SP-D 显著上升^[8],表明血浆中肺表面活性蛋白与 BALF 中关系密切,反映了 AEC-II 的损伤程度,且 SP-D 在血清中与 BALF 中变化一致,比 SP-A、B 更具有特异性。Leth-Larsen 等^[9]报道 61 名成人疑似细菌感性 CAP 住院患者中,血清 SP-D 水平在入院第 1 天时明显低于正常对照组,入院第 5 天时显著上升,表明肺组织感染时血清中 SP-D 的变化具有显著意义。因急性呼吸窘迫患者血清中 SP-A、D 水平上升,血清中 SP-D 已经被确认为急性肺损伤患者有价值的生物指标,SP-A 也被认为是呼吸窘迫和肺泡损伤有效的指标^[10],作为呼吸系统感染性疾病和其他疾病诊断指标的血清中 SP-A、D 正日益受到重视。SP-B、C 在肺表面活性物质单分子层的形成等方面起着重要作

用,进一步的研究表明 SP-B、C 在肺泡的稳定^[11]、宿主防御等方面的免疫调节方面起着关键作用^[12]。迄今未见有关 SP-A、B、C、D 在 CAP 患儿 BALF 和血清中变化的研究报道。本研究拟通过研究 SP-A、B、C、D 在肺炎支原体肺炎 (Mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP) 患儿 BALF 和血清中的变化及其相关性,探讨 SP-A、B、C、D 与肺组织感染损伤的相关性,为评估肺组织感染损伤程度和评估预后寻找适合临床应用的参考指标。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组

选择中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科 2011 年 1 月至 2012 年 8 月确诊为 MPP (入选标准符合实用儿科学第七版肺炎诊断标准^[13-14]) 患儿 47 例,其中男 26 例,女 21 例;最小 8 个月,最大 14 岁,平均年龄 4.7 ± 1.3 岁。根据肺 CT 结果将 47 例患儿分为两组:单侧病变组和双侧病变组。其中单侧病变组为肺 CT 显示单侧肺实变面积大于同侧同层横断面积 $1/3$ 而对侧无实变及渗出的 MPP 患儿,共 32 例 (右肺 17 例,左肺 15 例;其中 13 例伴有胸腔积液);双侧病变组指双肺均有肺实变,其中主病变侧肺实变大于同侧同层横断面积 $1/3$,而对侧为次病变侧,肺实变面积小于同侧同层横断面积 $1/5$,共 15 例 (其中 2 例伴有胸腔积液),15 例中无左右肺实变同层面积相等或相近者。47 例 MPP 患儿排除细菌感染、病毒感染、肺结核、真菌感染、儿童哮喘及其他肺疾病。

1.2 标本采集

1.2.1 肺炎支原体抗体测定 入院第 1 天行血常规、C 反应蛋白 (CRP)、肺炎支原体抗体 IgM (MP-IgM)、肺炎支原体抗体 (MP-Ab) 及肺 CT 检查。采用明胶颗粒载体间接凝集试验,动态血清检测 MP 特异性抗体 (日本富士 SERODIA-MYCO II 试剂盒)。首份血清 MP-Ab 滴度 $> 1:160$ 时,2 周后取第 2 份血清检测 MP-Ab;首份 MP 血清 MP-Ab 滴度 $< 1:160$ 时,每 5~7 d 或距首次采血 4 周后采血检测 MP-Ab 滴度。47 例患儿双份血清 MP-Ab 滴度升高 $\geq$ 原滴度 4 倍或 $\leq$ 原滴度的 $1/4$,且 MP-IgM 阳性。

1.2.2 血清和 BALF 标本采集及标本制备 47 例 MPP 患儿入院后 1~7 d 内根据《儿科支气管镜术指南 (2009 年版)》^[15] 全麻下行支气管肺泡灌洗术,灌洗术经患儿家长知情同意和中国医科大学附属盛京医院伦理委员会批准。术前采血 2 mL,4℃ 条件下以转速 3000 rpm,离心 10 min^[16],取上清于 -80°C 储存

待检。灌洗时将 37℃ 生理盐水每次 1 mL/kg 分别注入同一患儿健侧(或相对轻侧)肺段和患侧(或相对重侧)肺段,用 100 mm Hg 的负压立即将灌洗液抽回,共灌洗 3~4 次,回收率≥40%,每个患儿取双侧肺 BALF^[5-6],标本制备同血清。术中除 1 例见支气管狭窄外,其余未见痰栓、息肉等阻塞支气管。

1.2.3 血清及 BALF 中 SP-A、B、C、D 检测 血清及 BALF 中 SP-A、B、C、D 的检测使用美国 Santa Cruz Bio 公司 SP-A、B、C、D 试剂盒。操作步骤如下:将标准品稀释后加样,标准品孔加入标准品 50 μL,待测品孔加入 40 μL 样品,再加入抗体各 10 μL。加入链霉亲和素 50 μL,振荡混匀,37℃ 水浴 1 h。每孔加满稀释 20 倍的洗涤液,加显色剂显色,用酶标仪以 450 nm 波长依序测量各孔的 OD 值。蛋白定量:取 141 支一次性试管,分别向管内加入 2.5 mL 碱性铜液,20 μL 样品,混匀,室温放置 20 min,分别向管内加入 250 μL 酚试剂,充分混匀,室温放置 30 min,以未加样品的第一号管作为空白对照,在 650 nm 处进行比色测定,记录光密度值。

1.3 统计学分析

所得的参数值用统计学软件包 SPSS 17.0 处理。因数据为非正态分布,采用中位数和四分位数间距[*M(IQR)*]对数据进行统计描述;组间比较采用 Friedman 秩和检验,两两比较采用配对 Wilcoxon 符号秩检验,采用 Bonferroni 法调整检验水准;相关性分析采用 Spearman 秩相关系数。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 的变化

2.1.1 单侧病变组患儿病变侧 BALF、健侧 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 含量的变化 本组患儿病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量显著高于健侧 BALF 和血清中含量,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。血清中 SP-A、B、C 含量显著低于健侧 BALF 中含量,差异有统计学意义(*P* < 0.01 或 0.05);而血清中 SP-D 含量与健侧 BALF 中 SP-D 含量差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

2.1.2 双侧病变组患儿主病变侧 BALF、次病变侧 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 含量的变化 本组患儿主病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量显著高于次病变侧 BALF 和血清中含量,差异有统计学意义

(*P* < 0.01)。血清中 SP-A、B、C、D 含量与次病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

表 1 32 例单侧病变患儿 BALF 与血清中 SP-A、B、C、D 含量的比较 [ng/mL;*M(IQR)*]

组别	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D
病变侧 BALF	243(90,468)	193(85,507)	301(157,549)	187(43,333)
健侧 BALF	104(37,257) ^a	81(37,216) ^a	94(36,263) ^a	56(25,131) ^a
血清	35(25,69) ^{a,b}	39(21,70) ^{a,b}	47(22,80) ^{a,c}	33(9,149) ^a

a;与病变侧 BALF 组比较,*P* < 0.01;b;与健侧 BALF 组比较,*P* < 0.01;c:与健侧 BALF 组比较,*P* < 0.05

表 2 15 例双侧病变患儿 BALF 与血清中 SP-A、B、C、D 含量的比较 [ng/mL;*M(IQR)*]

组别	SP-A	SP-B	SP-C	SP-D
主病变侧 BALF	141(78,197)	119(64,190)	151(60,201)	63(54,121)
次病变侧 BALF	43(24,75) ^a	38(20,76) ^a	35(24,86) ^a	25(12,49) ^a
血清	34(24,59) ^a	43(25,59) ^a	60(28,109) ^a	28(14,101) ^a

a;与主病变侧 BALF 组比较,*P* < 0.01

2.2 两组患儿血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性

2.2.1 单侧病变患儿血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性 Spearman 秩相关分析显示,血清 SP-A、B、C、D 含量与病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量无显著相关性(*P* > 0.05);血清 SP-B 含量与健侧 BALF 中 SP-B 含量呈负相关(*P* < 0.05),血清 SP-A、C、D 含量与健侧 BALF 中 SP-A、C、D 含量均无显著相关性(*P* > 0.05)。见表 3。

表 3 32 例单侧病变患儿血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性

指标	相关系数	<i>P</i> 值
SP-A		
血清与病变侧 BALF	-0.001	0.995
血清与健侧 BALF	-0.038	0.837
SP-B		
血清与病变侧 BALF	-0.245	0.176
血清与健侧 BALF	-0.369	0.038
SP-C		
血清与病变侧 BALF	-0.212	0.244
血清与健侧 BALF	-0.196	0.291
SP-D		
血清与病变侧 BALF	0.166	0.363
血清与健侧 BALF	-0.023	0.899

2.2.2 双侧病变患儿血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性 Spearman 秩相关分析显示,血清中 SP-D 含量与主病变侧 BALF 中 SP-D 含量呈密切正相关(*P* < 0.01)。见表 4。

表 4 15 例双侧病变患儿血清与 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性

指标	相关系数	P 值
SP-A		
血清与主病变侧 BALF	0.324	0.280
血清与次病变侧 BALF	0.134	0.648
SP-B		
血清与主病变侧 BALF	0.319	0.289
血清与次病变侧 BALF	0.284	0.326
SP-C		
血清与主病变侧 BALF	0.275	0.364
血清与次病变侧 BALF	0.280	0.354
SP-D		
血清与主病变侧 BALF	0.731	0.005
血清与次病变侧 BALF	0.396	0.181

3 讨论

小儿 CAP 是儿童时期最常见的感染性疾病之一, MPP 是小儿 CAP 中一种常见的类型, 近年发病率较高, 流行较广。目前临床上无准确、有效反映肺组织感染后损伤、修复程度和对预后进行客观评估的生化指标。小儿呼吸道的先天免疫系统是抵御病原微生物侵袭的第一道防线, 当受体识别致病微生物时立即激活宿主局部炎症反应, 调节过度炎症反应对组织造成的损伤。肺表面活性物质 (PS) 是由 AEC-Ⅱ 合成和分泌的脂质和蛋白质复合物, 主要由 90% 的磷脂和 10% 的 SP-A、B、C、D 组成^[17]。SP-A、D 具有中和病毒、清除细菌、真菌、凋亡和坏死细胞, 下调免疫反应, 消除炎症等作用^[10]。PS 在磷脂中二棕榈酰卵磷脂和 SP-B、C 的参与下具有降低肺泡气液界面肺表面张力的重要作用^[17]。最近的研究显示磷脂酰甘油和磷脂酰肌醇参与了炎症反应的调节^[17]。幼鼠和儿童 AEC-Ⅱ 被肺炎链球菌感染后细胞超微结构的变化^[18]与儿童肺组织正常 AEC-Ⅱ 的凋亡^[19]明显不同, 在感染早期细胞质内线粒体和板层小体数量明显增加, 表明 SP-A、B、C、D 在急性损伤和上皮细胞被激活时合成和分泌增加^[10], 并释放至肺泡腔内, 使 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量增加。肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae, MP) 对宿主细胞的损伤可能是通过粘附宿主细胞后融合进入宿主细胞所致^[20]。Ledford 等^[21]报道 SP-A 可以维持 MP 感染鼠气道和宿主的防御系统的稳定状态。Pi-boonpocanun 等^[22]报道 SP-A 以高亲和力与 MP 结合^[4], 通过不饱和的磷脂酰甘油识别 MP 减弱其生长。SP-D 也可以通过配体与 MP 结合^[4]。这表明 SP-A、D 参与肺组织被 MP 感染过程, 可以通过检测

MPP 患儿血清中 SP-A、B、C、D 含量评估肺组织感染损伤的程度及修复状况。宿主被感染时, 肺泡上皮细胞和周围毛细血管受到不同程度的损伤, 肺泡毛细血管通透性增加。被 MP 感染的 AEC-Ⅱ 合成和释放的 SP-A、B、C、D 从肺泡腔渗漏到通透性增强的肺泡毛细血管中并随血流入血^[8], 导致在体循环血液中 SP-A、B、C、D 水平上升。AEC-Ⅱ 在严重损伤时裂解坏死, 进一步释放 SP-A、B、C、D 进入肺泡腔, 致使感染严重的病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 的水平明显升高。本研究中, 病变侧或主病变侧被感染肺组织 BALF 中 SP-A、B、C、D 的含量明显高于健侧或次病变侧 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 的含量, 表明与上述机制相符, 说明肺组织被 MP 感染时造成 ACE-Ⅱ 和肺泡毛细血管损伤, 致使被感染肺组织肺泡腔中 SP-A、B、C、D 明显高于未被感染肺组织, 并随毛细血管通透性增强而入血, 使血清中 SP-A、B、C、D 水平增高。

为明确肺组织被感染程度对 BALF 和血清中 SP-A、B、C、D 的影响, 将单侧病变组、双侧病变组血清中 SP-A、B、C、D 与健侧和次病变侧 BALF 相比, 在单侧病变组, 即健侧肺组织未被感染时, 血清中 SP-A、B、C 水平明显低于健侧 BALF 水平, 差异显著, 表明 ACE-Ⅱ 释放至肺泡腔内的 SP-A、B、C 含量较少, 且渗漏至肺泡毛细血管内的含量极少, 导致血液中含量较低。在双侧病变组 (包括主病变侧和次病变侧), 即使次病变侧感染程度较轻, 来源于双肺的血清中 SP-A、B、C、D 水平也显著升高, 接近次病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 水平, 但明显低于主病变侧 BALF 中 SP-A、B、C、D 水平。由此可见血清中 SP-A、B、C、D 水平与肺组织感染损伤程度有关, 随着肺组织被感染程度的加重与感染的扩展, 血清中 SP-A、B、C、D 水平呈上升趋势。

通过研究血清中 SP-A、B、C、D 含量与被感染肺组织 BALF 中 SP-A、B、C、D 含量的相关性, 发现在单侧肺组织被感染时血清中 SP-A、C、D 含量与被感染的病变侧肺组织 BALF 中 SP-A、C、D 含量和未被感染的健侧肺组织 BALF 中 SP-A、C、D 含量均无相关性; 血清中 SP-B 含量与病变侧 BALF 中 SP-B 含量无相关性, 与健侧 BALF 中 SP-B 含量呈负相关性。提示在感染早期或炎症损伤初期, 血清中 SP-A、C、D 与肺组织 BALF 中 SP-A、C、D 无密切相关性, 这可能与肺组织感染损伤的阶段和程度有关。血清中 SP-B 与未被感染肺组织 BALF 中 SP-B 呈负相关可能受本次研究标本数量所限, 需在进一步的深入研究中证实。

• 932 •