doi：10.7499/j.issn.1008-8830.2210150

论著·临床研究

中性粒细胞胞外诱捕网在新生儿急性呼吸窘迫综合征中的表达及意义

相虹　吴泽明　陈海　朱海金　常明

（江苏大学附属医院儿科，江苏镇江　212001）

［摘要］**目的**　动态观察中性粒细胞胞外诱捕网（neutrophil extracellular traps，NETs）的标记物游离 DNA（cell free-DNA，cf-DNA）在新生儿急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）中的变化，并评估其与 ARDS 病情严重程度及早期诊断的关系。**方法**　前瞻性纳入 2021 年 1 月—2022 年 6 月入住江苏大学附属医院诊断为 ARDS 的新生儿作为研究组（ARDS 组），根据氧指数（oxygen index，OI）分为轻度 ARDS 组（4≤OI<8）、中度 ARDS 组（8≤OI<16）及重度 ARDS 组（OI≥16）。对照组选自同期在该院新生儿科观察的黄疸新生儿，均无引起新生儿黄疸的病理性因素。ARDS 组在入院后第 1、3、7 天采集外周血标本，对照组在入院时采集外周血标本。采用荧光酶标仪检测血清 cf-DNA 水平；采用酶联免疫吸附法检测血清白细胞介素 6（interleukin 6，IL-6）和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）水平。采用 Pearson 相关分析法评估血清 cf-DNA 水平与血清 IL-6 和 TNF-α 水平的相关性。**结果**　ARDS 组共纳入 50 例患儿，其中轻度 ARDS 15 例，中度 ARDS 25 例，重度 ARDS 10 例；对照组纳入 25 例新生儿。与对照组相比，不同病情程度的 ARDS 各组血清 cf-DNA、IL-6、TNF-α 水平显著增加（$P<0.05$）。与轻度 ARDS 组相比，中度及重度 ARDS 组血清 cf-DNA、IL-6、TNF-α 水平显著增加（$P<0.05$），重度 ARDS 组增加更为明显（$P<0.05$）。与入院后第 1 天相比，ARDS 各组血清 cf-DNA、IL-6、TNF-α 水平在入院后第 3 天显著增加，而第 7 天显著下降（$P<0.05$）。Pearson 相关分析显示，在 50 例 ARDS 新生儿中，血清 cf-DNA 水平与血清 IL-6 及 TNF-α 水平均呈正相关（$P<0.05$）。**结论**　ARDS 新生儿存在 NETs 过量表达，动态监测 cf-DNA 水平在评估新生儿 ARDS 病情严重程度及早期诊断中有一定临床价值。

［中国当代儿科杂志，2023，25（4）：357-361］

［关键词］急性呼吸窘迫综合征；中性粒细胞胞外诱捕网；游离 DNA；新生儿

Levels of neutrophil extracellular traps in neonates with acute respiratory distress syndrome

XIANG Hong, WU Ze-Ming, CHEN Hai, ZHU Hai-Jin, CHANG Ming. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China (Chang M, Email: changming8@163.com)

Abstract: Objective　To study the changes in cell free-DNA (cf-DNA), a marker of neutrophil extracellular traps (NETs), in neonates with acute respiratory distress syndrome (ARDS), and to evaluate its relationship with the severity and early diagnosis of ARDS. **Methods**　The neonates diagnosed with ARDS in the Affiliated Hospital of Jiangsu University from January 2021 to June 2022 were enrolled in the prospective study. The neonates were divided into mild, moderate, and severe ARDS groups based on the oxygen index (OI) (4≤OI<8, 8≤OI<16, and OI≥16, respectively). The control group was selected from jaundice neonates who were observed in the neonatal department of the hospital during the same period, and they had no pathological factors causing neonatal jaundice. Peripheral blood samples were collected on day 1, day 3, and day 7 after admission for the ARDS group, and on the day of admission for the control group. Serum cf-DNA levels were measured using a fluorescence enzyme-linked immunosorbent assay. Serum interleukin-6 (IL-6) and

［收稿日期］2022-10-31；［接受日期］2023-03-02

［基金项目］江苏省妇幼健康科研项目（F202067）；镇江市重点社会发展项目（SH2018050）。

［作者简介］相虹，女，硕士，副主任医师。

［通信作者］常明，男，主任医师，副教授。Email：changming8@163.com。

tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. A Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlation of serum cf-DNA levels with serum IL-6 and TNF-α levels. **Results** A total of 50 neonates were enrolled in the ARDS group, including 15 neonates with mild ARDS, 25 with moderate ARDS, and 10 with severe ARDS. Twenty-five neonates were enrolled in the control group. Compared with the control group, the serum levels of cf-DNA, IL-6, and TNF-α in all ARDS groups were significantly increased (P<0.05). Compared with the mild ARDS group, the serum levels of cf-DNA, IL-6, and TNF-α in the moderate and severe ARDS groups were significantly increased (P<0.05), and the increase was more significant in the severe ARDS group (P<0.05). The serum levels of cf-DNA, IL-6, and TNF-α in all ARDS groups were significantly increased on day 3 after admission and significantly decreased on day 7 after admission compared with those on day 1 after admission (P<0.05). The Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation between serum cf-DNA levels and IL-6 levels as well as TNF-α levels in 50 neonates with ARDS (P<0.05). **Conclusions** There is an excessive expression of NETs in neonates with ARDS, and dynamic monitoring of serum cf-DNA levels has certain clinical value in evaluating the severity and early diagnosis of ARDS in neonates. **[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(4): 357-361]**

Key words: Acute respiratory distress syndrome; Neutrophil extracellular trap; Cell free-DNA; Neonate

急性肺损伤（acute lung injury，ALI）和急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）是急性低氧性呼吸衰竭综合征，患者病死率高，预后差。ARDS 发病机制复杂，目前认为大量中性粒细胞聚集、活化及凋亡引起肺部炎症反应导致肺损伤是 ARDS 发生的病理基础。临床研究和实验研究均发现，在肺损伤期间激活的中性粒细胞形成中性粒细胞胞外诱捕网（neutrophil extracellular traps，NETs）以捕获病原体，然而过度增加的 NETs 会引起严重的炎症反应，对肺组织造成损害；NETs 抑制剂治疗可抑制 NETs 的生成而改善肺损伤[1-2]。因此认为 NETs 在肺损伤急性期中性粒细胞和巨噬细胞之间的相互作用中起着重要作用。新生儿作为人生的一个特殊阶段，引起 ARDS 的病因与儿童及成人也有所差异，肺内因素（肺炎、胎粪吸入综合征等）和肺外因素（败血症、围生期窒息等）是引起新生儿 ARDS 的重要原因，其自身较差的环境适应能力、未发育完善的器官及不成熟的免疫功能更是难以阻止病情恶化，因此早期诊断及判断病情严重程度，控制病情发展，有利于降低新生儿 ARDS 的病死率。本研究拟探讨 ARDS 新生儿是否存在 NETs 的过量表达，动态观察其标记物游离 DNA（cell free-DNA，cf-DNA）的变化在新生儿 ARDS 病情严重程度及早期诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

前瞻性选取 2021 年 1 月—2022 年 6 月在江苏大学附属医院新生儿重症监护病房住院、需呼吸机治疗的 ARDS 新生儿作为研究对象。ARDS 的诊断符合 2017 年蒙特勒诊断标准[3]：（1）明确或可疑临床损伤后出现了急性呼吸窘迫，氧合障碍伴随残气量下降，需要正压通气以利于肺复张；（2）排除新生儿呼吸窘迫综合征、新生儿短暂呼吸增快，以及先天性肺畸形；（3）肺部影像学检查示双侧弥漫性不规则的透光度下降、渗出或白肺，这些改变不能被其他原因完全解释；（4）先天性心脏病无法解释的肺水肿；（5）氧合障碍：轻度 ARDS 为 4≤氧指数（oxygen index，OI）<8，中度 ARDS 为 8≤OI<16，重度 ARDS 为 OI≥16，其中 OI=（吸入氧浓度 × 平均气道压 × 100）/动脉血氧分压。因病情恶化、自动出院及治疗未满 7 d 者排除在外。对照组选自同期在该院新生儿科观察的黄疸新生儿，均无引起新生儿黄疸的感染、溶血、遗传及代谢性疾病等病理性因素。本研究经江苏大学附属医院伦理委员会审核批准（SWYXLL20191119-14），家属签署知情同意书。

1.2 标本采集

ARDS 组在入院后第 1、3、7 天采集外周静脉血 1.5 mL，对照组在入院时采集外周静脉血 1.5 mL。标本收集后立即使用离心机以 3 000 r/min 离心 10 min，移液器取上清血浆至 EP 管中，保存于−80℃冰箱。

1.3 指标检测

（1）cf-DNA 检测：室温解冻血浆样本，采用 PicoGreen 荧光染料法，用荧光酶标仪测定荧光值并绘制标准曲线，按照标准曲线计算 cf-DNA 水平。

（2）白细胞介素 6（interleukin 6，IL-6）及肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）水平检测：室温解冻血浆样本，按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书步骤经加样、孵育、洗涤、显色、终止等步骤，用酶标仪在 450 nm 波长测量各

孔的吸光度。

1.4 统计学分析

运用SPSS 26.0软件对数据进行分析，符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组间比较采用成组 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验；3组间多个时间点的比较采用单因素重复测量方差分析。计数资料以例数和百分率（%）表示，组间比较采用 χ^2 检验。采用Pearson相关分析法评估变量间的相关性。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

ARDS组共有50例患儿入选，其中轻度ARDS 15例，中度ARDS 25例，重度ARDS 10例；入院日龄1~7 d；胎龄（37.9 ± 1.5）周；出生体重（3 116 ± 403）g；男32例，女18例；原发疾病中，肺炎8例，胎粪吸入综合征12例，窒息20例，败血症10例。对照组25例中，男15例，女10例；胎龄（38.1 ± 1.2周）；出生体重（3 226 ± 388）g。ARDS组和对照组胎龄、出生体重及性别构成的比较差异无统计学意义（P>0.05），见表1。

表1 ARDS组和对照组一般资料的比较

组别	例数	胎龄 ($\bar{x} \pm s$, 周)	出生体重 ($\bar{x} \pm s$, g)	男性 [例(%)]
对照组	25	38.1 ± 1.2	3 226 ± 388	15(60)
ARDS组	50	37.9 ± 1.5	3 116 ± 403	32(64)
t/χ^2值		0.919	1.283	0.114
P值		0.092	0.083	0.451

2.2 不同组别cf-DNA、IL-6、TNF-α水平的比较

与对照组相比，入院后第1天ARDS各组血清cf-DNA、IL-6、TNF-α水平均明显升高，差异均有统计学意义（P<0.05）；与轻度ARDS组相比，中度及重度ARDS组血清cf-DNA、IL-6、TNF-α水平均升高，重度ARDS组升高更为明显，差异均有统计学意义（P<0.05）。见表2。

2.3 不同时间点cf-DNA、IL-6、TNF-α水平的比较

与入院后第1天相比，ARDS各组血清cf-DNA、IL-6、TNF-α水平在入院后第3天明显升高，在入院后第7天明显下降，但仍高于对照组，差异均有统计学意义（P<0.05），见表3。

表2 各组cf-DNA、IL-6、TNF-α水平的比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	cf-DNA (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
对照组	25	93 ± 17	24 ± 6	27 ± 4
轻度ARDS组	15	127 ± 28[a]	37 ± 6[a]	42 ± 4[a]
中度ARDS组	25	149 ± 34[a,b]	41 ± 5[a,b]	47 ± 5[a,b]
重度ARDS组	10	187 ± 32[a,b,c]	48 ± 7[a,b,c]	53 ± 8[a,b,c]
F值		10.48	6.46	6.14
P值		0.002	0.028	0.029

注：a示与对照组比较，P<0.05；b示与轻度ARDS组比较，P<0.05；c示与中度ARDS组比较，P<0.05。［ARDS］急性呼吸窘迫综合征；［cf-DNA］游离DNA；［IL-6］白细胞介素6；［TNF-α］肿瘤坏死因子-α。

表3 ARDS各组不同时间点cf-DNA、IL-6、TNF-α水平的比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	cf-DNA (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
对照组	25	93 ± 17	24 ± 6	27 ± 4
轻度ARDS组	15			
入院后第1天		127 ± 28	37 ± 6	42 ± 4
入院后第3天		138 ± 32[a]	45 ± 66[a]	50 ± 3[a]
入院后第7天		118 ± 22[a,b,c]	33 ± 4[a,b,c]	37 ± 3[a,b,c]
F值		5.76	5.28	4.87
P值		0.018	0.020	0.023
中度ARDS组	25			
入院后第1天		149 ± 34	41 ± 5	47 ± 5
入院后第3天		175 ± 29[a]	50 ± 7[a]	56 ± 4[a]
入院后第7天		131 ± 25[a,b,c]	38 ± 6[a,b,c]	41 ± 5[a,b,c]
F值		6.82	5.56	5.13
P值		0.015	0.019	0.021
重度ARDS组	10			
入院后第1天		187 ± 32	48 ± 7	53 ± 8
入院后第3天		205 ± 22[a]	56 ± 4[a]	61 ± 6[a]
入院后第7天		164 ± 21[a,b,c]	42 ± 4[a,b,c]	47 ± 3[a,b,c]
F值		7.35	6.38	5.49
P值		0.013	0.016	0.019

注：a示与入院后第1天比较，P<0.05；b示与入院后第3天比较，P<0.05；c示与对照组比较，P<0.05。［ARDS］急性呼吸窘迫综合征；［cf-DNA］游离DNA；［IL-6］白细胞介素6；［TNF-α］肿瘤坏死因子-α。

2.4 cf-DNA与IL-6和TNF-α的相关性

Pearson相关分析显示，在50例ARDS患儿中，血清cf-DNA水平与血清IL-6和TNF-α水平均呈显著正相关（P<0.001），见图1。

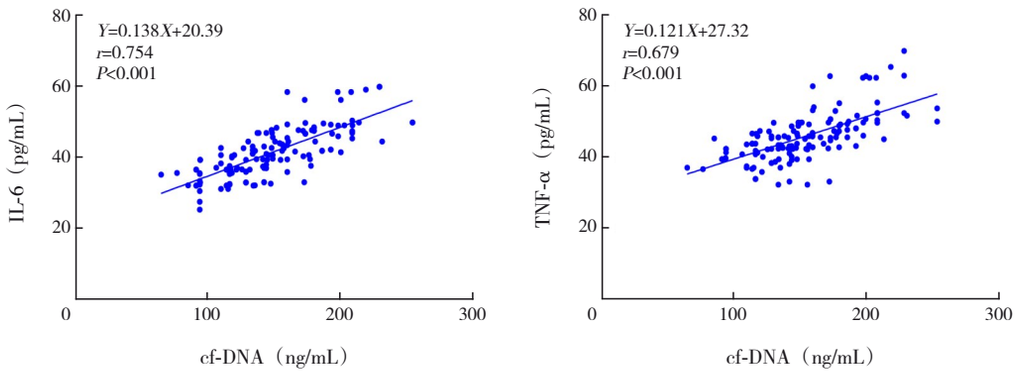

图 1　cf-DNA 与 IL-6 和 TNF-α 的相关性　左图示血清 cf-DNA 水平与血清 IL-6 水平呈正相关；右图示血清 cf-DNA 水平与血清 TNF-α 水平呈正相关。［cf-DNA］游离 DNA；［IL-6］白细胞介素 6；［TNF-α］肿瘤坏死因子-α。

3　讨论

NETs 于 2004 年被发现，它是中性粒细胞在受到病原体感染刺激后释放的一种以 DNA 为框架的附着丰富颗粒蛋白和肽类物质的网状纤维，可捕获、杀灭入侵的微生物，具有防御和保护作用[4]。然而 NETs 是一把双刃剑，过量产生的 NETs 不仅会直接造成组织损伤，还会招募促炎细胞或蛋白质，促进炎症因子的释放并进一步放大炎症反应[4]。NETs 过度释放对肺部产生有害影响，能够直接诱导上皮和内皮细胞死亡，导致肺损伤[5-6]。有研究发现，新型冠状病毒感染可导致中性粒细胞聚集及 NETs 的形成，NETs 的过量产生与 ALI/ARDS 的发展有关[7]。

NETs 是由活化的中性粒细胞释放的染色质，cf-DNA 是 NETs 的主要成分，能够反映患者中性粒细胞高反应性，并受到炎性反应强度的影响。有研究显示，感染致脓毒血症患者中性粒细胞功能下降，血浆 cf-DNA 水平升高[8]；肺炎患者血浆 cf-DNA 水平明显升高，治疗后其水平逐渐下降[9-10]；cf-DNA 水平的升高与许多疾病的不良结局相关[11-13]。本团队前期研究发现，与对照组相比，ALI 大鼠支气管肺泡灌洗液中 cf-DNA 水平明显增加，肺组织出现明显的炎症反应，而 DNA 酶干预后的 cf-DNA 水平有下降趋势，肺组织炎症程度减轻，证明新生大鼠肺损伤中存在 NETs，清除 NETs 有助于减轻肺损伤[14]。本研究对 ARDS 新生儿外周血进行 cf-DNA 检测，结果显示不同病情程度的 ARDS 各组血清 cf-DNA 水平均明显高于对照组，与上述实验研究结果[14]相一致。另外，中度 ARDS 组及重度 ARDS 组 cf-DNA 水平均高于轻度 ARDS 组，且重度 ARDS 组 cf-DNA 水平最高。这提示，随着病情程度的加重，过量产生的 NETs 加剧机体炎症反应，加重肺损伤程度。因此，本研究显示，cf-DNA/NETs 参与了新生儿 ARDS 的发生与发展，与 ARDS 的病情严重程度密切相关。

细胞因子是 ARDS 发生与发展最直接的影响因素。其中 IL-6 和 TNF-α 作为早期炎症反应及诱导炎症级联反应的关键炎症因子，它激活中性粒细胞，介导大量急性期蛋白分泌，损伤血管内皮，导致毛细血管通透性增加，形成肺水肿，从而诱发 ARDS，同时可减少抗氧化剂的产生，导致氧自由基清除减少，加重肺损伤，导致疾病恶化和进展。有研究发现，ARDS 大鼠血浆和支气管肺泡灌洗液中的 IL-6 和 TNF-α 水平显著升高，出现严重的炎症反应[15]。本团队前期研究发现，新生大鼠 ALI 的肺组织中 IL-6 和 TNF-α 水平高于对照组，且治疗后 IL-6 和 TNF-α 水平低于治疗前，提示细胞因子 IL-6 和 TNF-α 参与了新生大鼠肺损伤的发生与发展[14]。本研究显示 ARDS 各组血清 IL-6 和 TNF-α 水平均高于对照组，与 cf-DNA 变化相一致，与动物实验研究结果[14]吻合。本研究显示，与轻度 ARDS 组相比，中度 ARDS 组及重度 ARDS 组血清 IL-6 和 TNF-α 水平明显升高，重度 ARDS 组升高更为明显；与入院后第 1 天相比，入院后第 3 天血清 cf-DNA、IL-6、TNF-α 水平最高，与临床 ARDS 在病程第 3 天病情最严重相吻合，提示高水平的 cf-DNA、IL-6、TNF-α 等细胞毒性作用造成肺组织损伤，加速 ARDS 的进展。在入院后第 7 天，随着治疗后病情好转，血清 cf-DNA、IL-6、TNF-α 水平也随之下降，但仍高于对照组，考虑肺损伤仍未完全恢复。相关分析显示血清 cf-DNA 水平与血清 IL-6、TNF-α 水平呈显著正相关，考虑 NETs 与细胞因子相互作用，共同促进炎症反应，影响 ARDS 的进展。因

此，动态监测血清 cf-DNA 的变化可达到和 IL-6、TNF-α 反映 ARDS 病情变化及严重程度一样的效果，临床医师可根据需要检测三者之一的变化，具有相似的临床意义。

综上所述，本研究发现 ARDS 新生儿存在过量 NETs 表达，动态监测血清 cf-DNA 水平对判断 ARDS 病情严重程度有一定临床价值，可作为评估 ARDS 病情及早期诊断的生物标志物。本研究后期需加大样本量，增加随访时间，进一步探讨 NETs 在新生儿 ARDS 中的作用机制。

［参　考　文　献］

[1] Song C, Li H, Li Y, et al. NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization[J]. Exp Cell Res, 2019, 382(2): 111486. PMID: 31255598. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.06.031.

[2] Pedrazza L, Cunha AA, Luft C, et al. Mesenchymal stem cells improves survival in LPS-induced acute lung injury acting through inhibition of NETs formation[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3552-3564. PMID: 28112391. DOI: 10.1002/jcp.25816.

[3] De Luca D, van Kaam AH, Tingay DG, et al. The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity[J]. Lancet Respir Med, 2017, 5(8): 657-666. PMID: 28687343. DOI: 10.1016/S2213-2600(17)30214-X.

[4] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535. PMID: 15001782. DOI: 10.1126/science.1092385.

[5] Scozzi D, Liao F, Krupnick AS, et al. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury[J]. Front Immunol, 2022, 13: 953195. PMID: 35967320. PMCID: PMC9374003. DOI: 10.3389/fimmu.2022.953195.

[6] Lv D, Xu Y, Cheng H, et al. A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries[J]. Exp Cell Res, 2020, 394(2): 112101. PMID: 32474064. PMCID: PMC7256615. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112101.

[7] Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-Hussaniy HA, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) and Covid-19: a new frontiers for therapeutic modality[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 104: 108516. PMID: 35032828. PMCID: PMC8733219. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108516.

[8] Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, et al. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: a prospective observational cohort study[J]. Ann Surg, 2017, 265(6): 1241-1249. PMID: 27232244. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001807.

[9] 陈丹, 杨晓林, 沈照波, 等. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(9): 868-875. PMID: 31506144. PMCID: PMC7390244. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.09.005.

[10] Mikacenic C, Moore R, Dmyterko V, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia[J]. Crit Care, 2018, 22(1): 358. PMID: 30587204. PMCID: PMC6307268. DOI: 10.1186/s13054-018-2290-8.

[11] d'Alessandro M, Conticini E, Bergantini L, et al. Neutrophil extracellular traps in ANCA-associated vasculitis and interstitial lung disease: a scoping review[J]. Life (Basel), 2022, 12(2): 317. PMID: 35207604. PMCID: PMC8877891. DOI: 10.3390/life12020317.

[12] Chen F, Liu Y, Shi Y, et al. The emerging role of neutrophilic extracellular traps in intestinal disease[J]. Gut Pathog, 2022, 14(1): 27. PMID: 35733158. PMCID: PMC9214684. DOI: 10.1186/s13099-022-00497-x.

[13] Pastor B, Abraham JD, Pisareva E, et al. Association of neutrophil extracellular traps with the production of circulating DNA in patients with colorectal cancer[J]. iScience, 2022, 25(2): 103826. PMID: 35198886. PMCID: PMC8844218. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103826.

[14] 徐苏晴, 常明, 宓兰兰, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在新生大鼠急性肺损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(5): 913-917. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2020.05.021.

[15] Qin M, Qiu Z. Changes in TNF-α, IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 383-387. PMID: 30651808. PMCID: PMC6307422. DOI: 10.3892/etm.2018.6926.

（本文编辑：邓芳明）