doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.08.040

呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24 和炎症因子 mRNA 的表达水平及其预后价值

吴灵芝[1,2] 倪红兵[3] 汪晓莺[4] 王 琳[2] 陈 蓓[5]

（1 南通大学医学院 江苏 南通 226001；2 如皋市人民医院检验科 江苏 如皋 226500；
3 南通大学附属医院检验科 江苏 南通 226001；
4 南通大学医学院免疫教研室 江苏 南通 226001；5 苏州科技城医院检验科 江苏 苏州 215153）

摘要 目的：通过检查呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24 和 TNF-α、IL-6、和 IL-17A 炎症因子 mRNA 的表达，探讨其对呼吸窘迫综合症的诊断和预后价值。**方法：**选择 2015 年 1 月至 12 月在我院接受治疗的 32 例非感染型呼吸窘迫综合症患儿为研究组，选择同期的 30 例健康新生患儿为对照组，采集研究组治疗前后和对照组的外周血，分离单个核细胞，采用 RT-PCR 检测 CD24 和 TNF-α、IL-6、和 IL-17A 炎症因子 mRNA 的表达水平。**结果：**研究组治疗前 CD24mRNA 表达水平明显高于对照组，差异有统计学意义（P<0.01），而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义（P>0.05）。研究组治疗后 CD24mRNA 表达水平明显低于治疗前，差异有统计学意义（P<0.01），而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义（P>0.05）。**结论：**呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24mRNA 表达水平升高，可能是其诊断和预后的分子标记物。

关键词：呼吸窘迫综合症；CD24；炎症因子；分子标记物

中图分类号：R563.8 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2017)08-1554-04

mRNA Expression of CD24 and Inflammatory Factors in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Children with Respiratory Distress Syndrome and Its Prognostic Value

WU Ling-zhi[1,2], NI Hong-bing[3], WANG Xiao-ying[4], WANG Lin[2], CHEN Bei[5]

(1 Medical School of Nantong University, Nantong, Jiangsu, 226001, China; 2 Department of Laboratory Medicine, Rugao People's Hospital, Rugao, Jiangsu, 226500, China; 3 Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu, 226001, China; 4 Immunology Teaching and Research Section, Medical School of Nantong University, Nantong, Jiangsu, 226001, China; 5 Department of Laboratory Medicine, Suzhou Science and Technology Town Hospital, Suzhou, Jiangsu, 215153, China)

ABSTRACT Objective: Through detecting the mRNA expression of CD24 and TNF-α, IL-6, IL-17A in peripheral blood mononuclear cell of children with respiratory distress syndrome, to explore its diagnosis and prognostic value for respiratory distress syndrome. **Methods:** Selected 32 children with non-infectious respiratory distress syndrome as the study group who treated in our hospital from January to December 2015,and selected 30 health newborns as the control group in the same period, then collected the peripheral blood in study group before and after treatment and in control group respectively, isolated mononuclear cells, and detected the mRNA expression levels of CD24 and TNF-α, IL-6, IL-17A by RT-PCR method. **Results:** mRNA expression level of CD24 in study group before treatment was higher than control group, the difference was statistically significant (P<0.01), but there was no statistical difference on mRNA expression levels of TNF-α, IL-6, IL-17A in two groups (P>0.05). mRNA expression level of CD24 in study group after treatment was lower than before treatment (P<0.01), but there was no statistical difference on mRNA expression levels of TNF-α, IL-6, IL-17A (P>0.05). **Conclusion:** mRNA expression level of CD24 is increasing in peripheral blood mononuclear cell of children with respiratory distress syndrome, which may be the molecular markers for its diagnosis and prognosis.

Key words: Respiratory distress syndrome; CD24; Inflammatory factors; Molecular markers

Chinese Library Classification(CLC): R563.8 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)08-1554-04

前言

近年我国早产儿的出生率不断上升，由于早产儿呼吸系统和神经系统发育不成熟，肺部表面活性物质产生和分泌不足，易发生呼吸窘迫综合征，引起患儿肺泡萎陷和肺顺应性降低，直接影响患儿的生存质量，甚至致残和危及生命[1,2]。呼吸窘迫综合征出现宫内窘迫或窒息，发病急、病情变化快且死亡率高，

作者简介：吴灵芝（1986-），女，本科，检验师，从事医学检验方面的研究，E-mail: dodo625@126.com

(收稿日期：2016-07-15 接受日期：2016-08-10)

是早产儿死亡的主要原因,故早期诊断非常重要,但目前缺乏相关早期诊断生物标志物[3-5]。本研究通过采用 RT-PCR 检测 CD24 和 TNF-α、IL-6、和 IL-17A 炎症因子 mRNA 的表达水平,与健康儿的对比研究,筛选呼吸窘迫综合征的诊断及预后分子标志物,为临床早期诊断和预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2015 年 1 月至 12 月在我院接受治疗的 32 例非感染型呼吸窘迫综合症患儿为研究组,所有患儿均符合呼吸窘迫综合征的诊断标准[6],临床表现为呼吸困难,安静呼吸频率大于 60 次 /min,呼吸小于 30 次 /min,呼吸节律改变甚至呼吸暂停,并伴有呻吟声;紫绀,精神萎靡,肌张力低下;四肢端发凉,毛细血管充盈,心率小于 100 次 /min;呼吸衰竭,PaO_2 小于 50 mmHg,$PaCO_2$ 大于 70 mmHg。并排除剖宫、糖尿病母亲患儿,出生胎龄＜28 周或出生体重＜1.0 kg,合并青紫型心脏病、胎粪吸入综合征以及呼吸系统先天性畸形患儿。选择同期的 30 例健康新生患儿为对照组。两组患儿的性别、体重、胎龄、采血时间等一般资料比较,差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。见表 1。

表 1 两组一般资料比较

Table 1 Comparison of general information in two groups

Indexes	Control group(n=30)	Study group(n=32)
Male(%)	16(53.33%)	17(53.13%)
Female(%)	14(46.67%)	15(46.87%)
Birth weight(kg)	3.27± 1.12	3.29± 1.17
Gestational age(week)	36.12± 2.24	35.89± 2.31
Blood sampling time(h)	12.78± 3.14	12.31± 3.51

1.2 治疗方法

研究组患儿给予保暖,保持皮肤温度在 36.5℃,检测体温、心率、血压、呼吸、动脉血气,液体和营养供应,纠正酸中毒等常规治疗措施。并给予鼻塞式双水平无创正压通气治疗 20 例,患儿常规使用氨茶碱,初始剂量 5 mg/kg,12 h 后按剂量 2mg/kg 维持,2 次 /d,静脉注射;Stephanie Sophie 呼吸机呼吸支持治疗,初始吸气峰压 15 cmH_2O,呼气末压 6 cmH_2O,吸入氧浓度 0.3,呼吸频率 40 次 /min。鼻塞式持续正压通气治疗 12 例,患儿常规使用氨茶碱静脉注射;呼吸支持治疗,初始值呼气末正压 6 cmH_2O,吸入氧浓度 0.3。治疗周期为 10d。

1.3 观察指标

采集研究组患儿治疗前和对照组头皮静脉血液 1 mL,同时采集研究组患儿治疗 10 d 症状消失后头皮静脉取血液 1 mL,收集的血液置肝素抗凝管中,室温下 3000 r/min 离心 10 min,分离血清。-80℃冰箱保存。采用淋巴细胞分离液(南京建成生物科技公司)分离外周血单个核细胞后,加入 Trizol 试剂提取总 RNA,分光光度计 A260 /230 nm 和 A260 /280 nm 吸光值,计算提取的 RNA 的纯度。采用 cDNA 试剂盒(南京建成生物科技公司)逆转 RNA 为 cDNA,CD24、TNF-α、IL-6、IL-17A 及 β-actin 引物均由上海生工有限公司设计合成,引物序列见表 2。RT-PCR 反应体系 20 μL (10 mmol/L dNTP 预混液 1.6 μL,10× PCR 缓冲液 2.0 μL,10 μmol /L 引物各 0.4 μL,40 U rTaq DNA 聚合酶 (南京建成生物科技公司)0.2 μL,cDNA 模板 1.0 μL,重水 7.2 μL)。循环参数为 95℃ 预变性 5 min,95℃30 s,退火 30 s,温度见表 2,72℃30 s,共 40 个循环,72℃延伸 5 min,4℃保存。荧光信号采集温度为 82 ℃,采用 RT-PCR 仪自带软件分析熔解曲线,重复 3 次,计算基因相对含量。

表 2 基因引物序列

Table 2 Gene primer sequences

Gene	Sequences	Primer sequences(5'→3')	Product size(bp)	Annealing temperature(℃)
CD24	FJ226006.1	CATGTGAGAGGTTTGACTGAAGAA	208	55
		GAATCTCCATTCCACAAGAAAACT		
TNF-α	HQ201306.2	TCAGATCATCCCAGGCAG	85	56
		TCAGCTTGAAGCTGCCCC		
IL-6	JQ250825.1	CGACGGCATCGGTACATCCT	171	59
		GCTGCTTTCACGTGCCTCTTT		
IL-17A	NM002190.2	ACATGCCTTCACTCGATTTC	261	60
		TTAATCTCCAAGAGGGGCCT		
β-actin	X00351.1	TACCTTCAACTCCACGAAAC	256	58
		TGCTTGCTGATCCATACTCC		

1.4 数据分析

采用 SPSS19.0 进行统计数据分析，计数资料以 n（%）表示，应用 X^2 检验；计量资料以（$\bar{X}\pm$ S）表示，采用 t 检验比较组内和组间差异，P<0.05 为具有统计学意义的检验标准。

2 结果

2.1 两组 mRNA 表达水平比较

研究组治疗前 CD24 mRNA 表达水平明显高于对照组，差异有统计学意义（P<0.01），而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义（P>0.05）。见表 3。

表 3 两组 CD24 和炎症因子 mRNA 的表达

Table 3 Comparison of mRNA expression of CD24 and inflammatory factors

Groups	CD24/β-actin	TNF-α/β-actin	IL-6/β-actin	IL-17A/β-actin
Control group(n=30)	0.012± 0.008	0.00035± 0.00012	0.00011± 0.00005	0.027± 0.011
Study group(n=32)	0.024± 0.011	0.00031± 0.00013	0.00010± 0.00006	0.026± 0.012
t	4.935	1.260	0.715	0.342
P	0.000	0.106	0.239	0.367

2.2 研究组治疗前后 mRNA 表达水平比较

研究组治疗后 D24mRNA 表达水平明显低于治疗前，差异有统计学意义（P<0.01），而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义（P>0.05）。见表 4。

表 4 研究组治疗前后 CD24 和炎症因子 mRNA 的表达

Table 4 Comparison of mRNA expression of CD24 and inflammatory factors in study group before and after treatment

Time	CD24/β-actin	TNF-α/β-actin	IL-6/β-actin	IL-17A/β-actin
Before treatment(n=32)	0.024± 0.011	0.00031± 0.00013	0.00010± 0.00006	0.026± 0.012
After treatment(n=32)	0.014± 0.009	0.00033± 0.00014	0.00012± 0.00005	0.024± 0.013
t	3.582	0.592	1.449	0.639
P	0.000	0.278	0.076	0.262

3 讨论

呼吸窘迫综合征是由心源性以外多种因素导致的进行性呼吸衰竭，由于肺流量急剧减少肺内顺应性和通气及血流比例严重失调，多有呼吸困难、发绀、烦躁等临床表现，易气胸、肺气肿等混淆，临床较难确诊[7-9]。呼吸窘迫综合征症状发展迅速，会引起继发性的高通透性的肺水肿，甚至缺氧性呼吸衰竭，危机患者的生命，必须及时确诊治疗[10]。发病机制是系统性的炎症反应，以中性粒细胞的浸润、肺部炎性介质的释放、上皮细胞受损为特征，肺泡分泌的表面活性物质减少，引起肺萎陷，TNF-α、IL-6、IL-10 和 IL-17 等炎性介质在病理生理过程中发挥重要作用[11-13]。CD24 是度糖基化粘液素，属磷脂酰肌醇锚定蛋白，主要表达于单核或树突状细胞、淋巴细胞、上皮细胞、粒细胞等多种细胞，可通过胞内酪氨酸抑制性基序负向调控 NF-κ B 信号，阻断损伤相关模式分子，具有促炎作用[14,15]。早产儿呼吸窘迫患儿肺部发育不良，免疫系统发育不完善，容易继发感染，鉴别诊断非常重要。本研究通过 RT-PCR 检测呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24 和 TNF-α、IL-6、和 IL-17A 炎症因子 mRNA 的表达，探讨其对呼吸窘迫综合症的诊断和预后价值，筛选诊断及预后分子标志物，为临床早期诊断和预后判断提供参考。

本研究发现，研究组患儿治疗前 CD24mRNA 表达水平明显高于对照组，差异有统计学意义，而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义。说明呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24mRNA 表达水平升高，而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平无变化。研究结果与感染型呼吸窘迫综合症患儿的 IL-6、和 IL-17A 表达水平升高不一致，可能是因为血清 TNF-α、IL-6 表达水平受氧损伤影响，吸氧后血浆 TNF-α、IL-6 上升，低氧可抑抑制炎症因子表达，治疗后患儿 TNF-α、IL-6、和 IL-17A 炎症因子表达与持续给氧有关[16-18]。同时本研究发现，研究组患儿治疗后 CD24mRNA 表达水平明显低于治疗前，差异有统计学意义，而 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达水平比较，差异无统计学意义。说明呼吸窘迫综合症患儿经治疗后外周血单个核细胞中 CD24mRNA 表达水平降低，但不影响 TNF-α、IL-6、和 IL-17A mRNA 表达。CD24 抑制机体损伤引起炎症，与机体抵抗肺部损伤导致 CD24 过高表达有关，炎症因子表达较低可能与患儿机体免疫系统不成熟相关[19,20]。

综上所述，呼吸窘迫综合症患儿外周血单个核细胞中 CD24mRNA 表达水平升高，可能是其诊断和预后的分子标记物。由于本研究患儿较少，治疗分组较简单，没有进一步分析不同治疗方法对 CD24mRNA 表达水平的影响，受患儿免疫系统和固有免疫应答发育不全影响较大，本研究结论需要进一步深入的研究证实。

参 考 文 献(References)

[1] Wang J, Liu X, Zhu T, et al. Analysis of neonatal respiratory distress syndrome among different gestational segments [J].Int J Clin Exp Med, 2015, 15, 8(9): 16273-16279

[2] Laban M, Mansour GM, Elsafty MS, et al. Prediction of neonatal respiratory distress syndrome in term pregnancies by assessment of fetal lung volume and pulmonary artery resistance index [J].Int J Gynaecol Obstet, 2015,128(3): 246-250

[3] Guan Y, Li S, Luo G, et al. The role of doppler waveforms in the fetal main pulmonary artery in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome[J]. J Clin Ultrasound, 2015, 43(6): 375-383

[4] Kan Q, Ding S, Yang Y, et al. Expression profile of plasma microRNAs in premature infants with respiratory distress syndrome [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2858-2864

[5] Moety GA, Gaafar HM, El Rifai NM. Can fetal pulmonary artery Doppler indices predict neonatal respiratory distress syndrome?[J]. J Perinatol, 2015, 35(12): 1015-1019

[6] Sakonidou S, Dhaliwal J. The management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants (European Consensus Guidelines--2013 update)[J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2015, 100(5): 257-259

[7] Satar M, Taşkın E, Özlü F, et al. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensin-converting enzyme activity in transient tachypnea of neonate and respiratory distress syndrome [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(9): 1712-1715

[8] Quasney MW, Ló pez-Fernández YM, Santschi M, et al. The outcomes of children with pediatric acute respiratory distress syndrome: proceedings from the Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference [J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16 (5 Suppl 1):S118-S131

[9] Parkash A, Haider N, Khoso ZA, et al. Frequency,causes and outcome of neonates with respiratory distress admitted to Neonatal Intensive Care Unit, National Institute of Child Health,Karachi [J]. J Pak Med Assoc, 2015, 65(7): 771-775

[10] Shen W, Du J, Wang B, et al. Analysis of nitric oxide synthase gene polymorphisms in neonatal respiratory distress syndrome among the Chinese Han population[J]. Ital J Pediatr, 2014, 40(1): 27

[11] Alkan S, Ozer EA, Ilhan O, et al. Surfactant treatment for neonatal respiratory disorders other than respiratory distress syndrome [J].J Matern Fetal Neonatal Med, 2015, 28(2): 131-133

[12] Kim SM, Park JS, Norwitz ER, et al. Acceleration time-to-ejection time ratio in fetal pulmonary artery predicts the development of neonatal respiratory distress syndrome: a prospective cohort study[J]. Am J Perinatol, 2013, 30(10): 805-812

[13] Ferrando C, Aguilar G, Piqueras L, et al. Sevoflurane,but not propofol, reduces the lung inflammatory response and improves oxygenation in an acute respiratory distress syndrome model: a randomised laboratory study[J]. Eur J Anaesthesiol, 2013, 30(8): 455-463

[14] Tanizawda K, Handa T, Naga S, et al. CD24 gene exon 2 dimorphism does not affect disease susceptibility in Japanese sarcoidosis patients [J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2010, 27(1): 64-69

[15] Ghuwalewala S, Ghatak D,Das P, et al. CD44 (high)CD24 (low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. Stem Cell Res, 2016, 16(2): 405-417

[16] Barreira ER, Munoz GO, Cavalheiro PO, et al. Epidemiology and outcomes of acute respiratory distress syndrome in children according to the Berlin definition: a multicenter prospective study [J]. Crit Care Med, 2015, 43(5): 947-953

[17] Sapru A, Flori H, Quasney MW, et al. Pathobiology of acute respiratory distress syndrome [J]. Pediatr Crit Care Med, 2015, 16(5 Suppl 1): S6-S22

[18] Rotta AT, Piva JP, Andreolio C, et al. Progress and perspectives in pediatric acute respiratory distress syndrome [J]. Rev Bras Ter Intensiva, 2015, 27(3): 266-273

[19] Kor DJ, Warner DO, Carter RE, et al. Extravascular lung water and pulmonary vascular permeability index as markers predictive of postoperative acute respiratory distress syndrome: a prospective cohort investigation[J]. Crit Care Med, 2015, 43(3): 665-673

[20] Walter JM, Wilson J, Ware LB. Biomarkers in acute respiratory distress syndrome: from pathobiology to improving patient care[J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(5): 573-586

(上接第 1536 页)

[14] Grotle M, Hagen KB. A supervised exercise program may not add any benefit over advice for patients recovering fromankle fracture? [synopsis][J]. J Physiother, 2016, 62(2): 114

[15] Smeets B, Nijs S, Nderlita M, et al. Health Care Usage and Related Costs in Fibular Plating for AO Type 44-B Ankle Fractures in a Belgian University Hospital: An Exploratory Analysis[J].J Foot Ankle Surg, 2016, 55(3): 535-341

[16] Regan DK, Gould S, Manoli A, et al. Outcomes Over a Decade After Surgery for Unstable Ankle Fracture: Functional Recovery Seen 1 Year Postoperatively Does Not Decay With Time [J]. J Orthop Trauma, 2016, 30(7): e236-241

[17] Gorbachova T, Wang PS, Hu B, et al. Plantar talar head contusions and osteochondral fractures: associated findings on ankle MRI and proposed mechanism of injury [J]. Skeletal Radiol, 2016, 45 (6): 795-803

[18] Beckenkamp PR, Lin CW, Engelen L, et al. Reduced Physical Activity in People Following Ankle Fractures: A Longitudinal Study [J]. J Orthop Sports Phys Ther, 2016, 46(4): 235-242

[19] Tomé -Bermejo F, Santacruz Aré valo A, Ruiz Micó N. Open reduction and internal fixation of displaced ankle fractures in patients older than 65 years of age. Analysis of results at five-year follow-up [J]. Rev Esp Cir Ortop Traumatol, 2016, 60(2): 99-105

[20] Gill PJ, Klassen T. Revisiting Radiograph-Negative Ankle Injuries in Children: Is It a Fracture or a Sprain[J]. JAMA Pediatr, 2016, 170(1): e154147