

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000415

循环纤维细胞在早产儿支气管肺发育不良中的检测及意义

李 春, 邓 春

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨 CD34、I 型胶原(collagen I, COL I)、CXCR4 在支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的表达及临床意义。**方法:**利用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 61 例早产儿生后 1、3、5、7、28 d 外周血中 CD34、COL I、CXCR4 的表达, 并比较 CD34、COL I、CXCR4 在 BPD 组及非 BPD 组间表达的差异。**结果:**BPD 组患儿较非 BPD 组患儿 CXCR4 在生后第 1 天有明显增高[(61.4 ± 13.37)%]。随着日龄的增大, BPD 患儿 COL I 水平在第 28 天达到高峰[3.42(2.87, 4.98)%], 而 CD34、CXCR4 水平降至最低[(0.67 ± 0.25)%; (31.9 ± 13.48)%]。重复测量设计方差分析显示, 日龄的增大及 CD34、COL I、CXCR4 水平的变化对 BPD 的发生存在交互作用($F=77.66, P=0.000$)。ROC 曲线分析显示, COL I 的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.867, 高于 CD34、CXCR4, 且当 COL I 值为 1.3% 时, 敏感度为 69.7%, 特异度为 86%。不同时间点 BPD 各组测量值比较均有统计学意义($P=0.000$)。**结论:**循环纤维细胞的 COL I 水平高表达及 CD34、CXCR4 水平持续降低与 BPD 的发生密切相关。

【关键词】早产儿; 循环纤维细胞; 支气管肺发育不良**【中图分类号】**R722.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-05-27

Detection of circulating fibrocytes in bronchopulmonary dysplasia in the premature infants and its significance

Li Chun, Deng Chun

(Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical significance of CD34, COL I and CXCR4 in bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods:** Expressions of CD34, COL I and CXCR4 in peripheral blood from 44 premature infants with BPD on the 1st, 3rd, 5th, 7th and 28th d after birth were measured by flow cytometry (FCM) and the expression differences of CD34, COL I, CXCR4 between BPD group and the non-BPD group were compared. **Results:** On the 1st d after birth, the expression of CXCR4 increased greatly in BPD group compared with that of non-BPD group. With the increase of days after birth, COL I level peaked on 28th d in BPD group, while CD34 and CXCR4 levels reduced to the lowest. Data of ANOVA for repeated measurement showed that time and the changes in CD34, COL I and CXCR4 levels caused an interactive effect on the occurrence of BPD ($F=77.66, P=0.000$). ROC curve displayed that area under the curve of COL I was 0.867, higher than those of CD34 and CXCR4. When COL I was 1.3%, the sensitivity was 69.7% and specificity was 86%. There were statistically significances in BPD group among different time points ($P=0.000$). **Conclusion:** Circulating fibrocytes with increased level of COL I as well as decreased level of CD34 and CXCR4 are closely related with the occurrence of BPD.

【Key words】premature infants; circulating fibrocytes; bronchopulmonary dysplasia

作者介绍: 李 春, Email: llibeo@163.com,

研究方向: 新生儿疾病。

通信作者: 邓 春, Email: dengcgcb@163.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目 (编号: 2008-2-159); “国家临床重点专科-新生儿学” 资助项目 (编号: 卫办医政函[2011]873 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2229.007.html>
(2014-10-30)

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是在遗传易感性基础上,氧中毒、早产、感染或炎症以及机械通气等各种不利因素对发育不成熟的肺导致的损伤,及损伤后肺组织的异常修复^[1],是早产儿,尤其是超低和极低出生体重儿呼吸系统常见的并发症之一。在 BPD 慢性肺纤维化的过程中,目前认为成纤维细胞起关键作用^[2-3],在肺损伤的修复过程中,主要依靠肺泡上皮细胞的修复和以成纤维细胞为主的间叶细胞的繁殖。1994 年 Bucala 等^[4]发现一类具有成纤维细胞特性的白细胞亚群,称之为循环纤维细胞(circulating fibrocytes, CF),可表达 I 型胶原(collagen I, COL I)、III 型胶原(collagen III, COL III)、CD11b、CD13、CD34、CD45RO、纤连蛋白^[5]。研究发现,循环中的纤维细胞响应远处受损伤的肺组织释放的趋化因子信号,表达趋化因子受体 CXCL12 并与同源配体 CXCR4 产生应答,从而迁移到肺创伤愈合部位,促进成纤维细胞/肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)在损伤肺中的蓄积^[6]。尽管目前发现在肺损伤时有肺外的纤维细胞迁移至肺组织,但这些研究结果均来自动物实验,且大多针对特发性肺纤维化^[7],在 BPD 这一特定病理生理过程中,循环中纤维细胞作用如何尚不明确。本文对 61 例早产儿外周血标本中 COL I、CD34、CXCR4 的表达进行分析,旨在探讨循环中的纤维细胞在早产儿 BPD 损伤修复纤维化过程中的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2013 年 1 月至 2013 年 12 月重庆医科大学附属儿童医院收治需呼吸机治疗胎龄 28~34 周的早产儿 100 例纳入研究,观察 28 d(除外 39 例因死亡或未住院满 28 d 出院,剩余 61 例),所有患儿均生后 24 h 内入院,其中男性 38 例,女性 23 例。胎龄(30.3 ± 1.8)周,出生体质量($1\,579 \pm 368$)g。其中符合 BPD 诊断标准^[8]31 例,非 BPD 组 30 例。由 2 组患儿临床资料比较可见,差异无统计学意义,具备可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集 收集患儿入院后第 1(D1)、3(D3)、5(D5)、7(D7)、28(D28)d 循环外周血。

1.2.2 试剂 (1)PE 标记人 CD34:biolegend(美国);(2)PE 标记人 CXCR4:EB(美国);(3)FITC 标记人 CD34:biolegend(美国);(4)I 型胶原抗体(collagen I antibody):lifespan(美国);(5)FITC 标记鼠 IgG1 mAb:4abio(中国);(6)PE 标记鼠 IgG2a mAb:4abio(中国);(7)Becton Dickinson 流式细胞仪

(美国)。

1.2.3 实验方法

1.2.3.1 CD34、COL I、CXCR4 检测 采用荧光抗体染色。染色步骤:每管加细胞悬液 100 μ l,再加入 5 μ l FITC 标记的抗 CXCR4 mAb,5 μ l PE 标记的抗 CD34mAb,和 10 mAb PerCP 标记的抗 COL I mAb。染色时,另取同样量的细胞,加同样的 FITC 和 PE 标记的同型阴性对照 IgG1/IgG2a 及同样量的抗 CD3 mAb 作为对照。然后置室温避光孵育 20 min,以 PBS 振荡 1 次。各管中加入 1 ml 1% 多聚甲醛(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C)固定,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 阴暗处放置 30 min,24 h 内上机分析。

1.2.3.2 CD34 等的检测 用 Becton Dickinson 流式细胞仪,每管收集 20 000~50 000 个淋巴细胞,然后 3 种颜色染色的细胞在 Cellquest 3.2.1fl 软件上进行分析,获取各管的实验数据。

1.3 统计学处理

所有统计学处理均采用 SPSS 16.0 统计软件包进行,计量资料进行正态性分布检验,符合正态性分布者用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态性分布者采用中位数及四分位间距 $[M(Q_1, Q_3)]$ 表示。率的比较采用卡方检验,正态计量资料 2 组间比较采用 t 检验;不同时间点均数之间的组间比较采用重复测量设计方差分析;不同时间点均数之间的组内比较采用单因素方差分析;非正态计量资料采用非参数秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线分析确定 CD34、COL I、CXCR4 诊断 BPD 的能力,了解其敏感性和特异性。

2 结果

2.1 实验组血清中 CD34、COL I、CXCR4 水平比较

BPD 组患儿随着日龄增大 COL I 水平逐渐增高,CD34、CXCR4 水平持续降低(图 1、图 2、表 1);而非 BPD 组 COL I 水平逐渐降低,CD34、CXCR4 水平变化不明显,其中 D28 两组患儿 CD34、COL I、CXCR4 的表达具有差异($P=0.000$)。重复测量设计方差分析表明,日龄的增大及 CD34、COL I、CXCR4 水平的变化对 BPD 的发生存在交互作用($F=77.66$, $P=0.000$),见表 2。ROC 曲线分析(图 3):COL I 的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.867,高于 CD34、CXCR4,且当 COL I 值为 1.3% 时,敏感度为 69.7%,特异度为 86%。

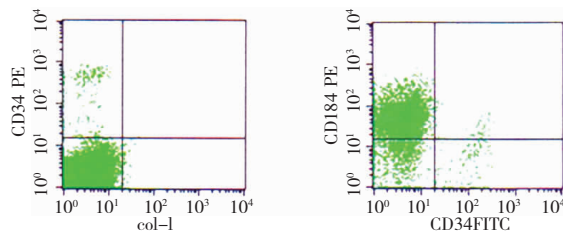


图 1 BPD 组患儿 D1 的 CD34、COL I、CXCR4 水平

Fig. 1 Expression of CD34, COL I and CXCR4 in BPD group on the 1st d after birth

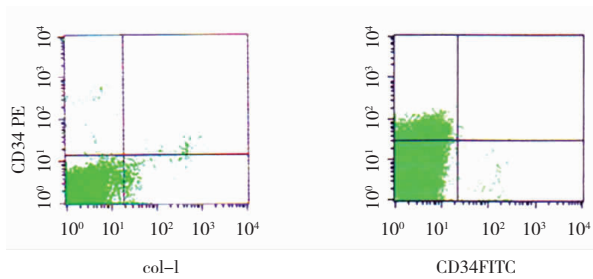


图 2 BPD 组患儿 D28 的 CD34、COL I、CXCR4 水平

Fig.2 Expression of CD34, COL I and CXCR4 in BPD group on the 28th d after birth

表 1 不同日龄 CD34、COL I、CXCR4 水平比较 (%)

Tab.1 Comparison on the expression of CD34, COL I and CXCR4 in different ages (%)

指标		BPD组	非 BPD 组	t/Z 值	P 值
D1	CD34	2.47 ± 0.88	2.49 ± 1.31	0.088	0.930
	COL I	0.82 ± 0.46	0.74 ± 0.66	0.542	0.590
	CXCR4	61.40 ± 13.37	50.32 ± 21.18	2.433	0.019
D3	CD34	2.12 ± 0.75	2.41 ± 1.26	1.083	0.285
	COL I	1.34 (0.91~1.94)	0.55 (0.18~1.04)	4.315	0.000
	CXCR4	55.86 ± 8.97	46.41 ± 15.05	2.966	0.005
D5	CD34	1.69 ± 0.62	2.22 ± 1.19	2.173	0.035
	COL I	2.29 ± 1.73	0.70 ± 0.61	4.789	0.000
	CXCR4	46.98 ± 9.95	45.12 ± 16.67	0.528	0.600
D7	CD34	1.33 ± 0.61	2.19 ± 1.14	3.658	0.001
	COL I	3.22 ± 2.49	0.58 ± 0.52	5.763	0.000
	CXCR4	39.26 ± 12.19	48.27 ± 16.16	2.464	0.017
D28	CD34	0.67 ± 0.25	2.18 ± 1.19	6.814	0.000
	COL I	3.42 (2.87~4.98)	0.23 (0.11~0.94)	6.565	0.000
	CXCR4	31.90 ± 13.48	47.80 ± 16.64	4.106	0.000

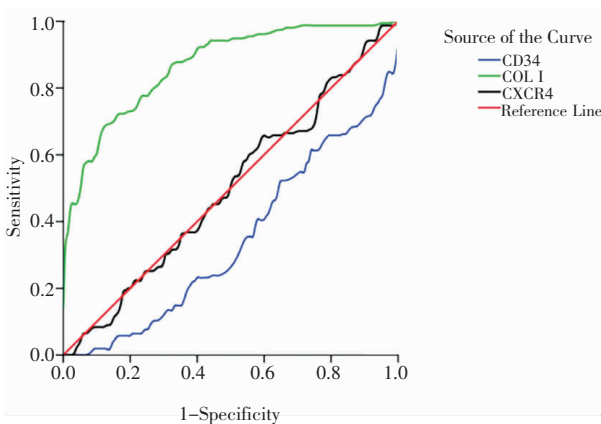


图 3 2 组患儿 CD34、COL I、CXCR4 的 ROC 曲线

Fig.3 ROC curves of CD34, COL I and CXCR4 in two groups

2.2 与 BPD 有关的单因素分析

通过对比 BPD 组及非 BPD 组患儿的临床资料发现,2 组患儿母亲胎膜早破、母绒毛膜羊膜炎、是否剖宫产、动脉导

管未闭、肺表面活性物质使用、产前地塞米松使用、窒息史、入院日龄比较无明显差异($P>0.05$),而胎龄、出生体重、机械通气时间、用氧时间、呼吸机相关性肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)比较有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.3 不同时间点 BPD 及非 BPD 组 CD34、COL I、CXCR4 水平对比

随着日龄增大,BPD 组较非 BPD 组 COL I 升高明显,而 CD34、CXCR4 持续降低。BPD 组对 CD34、COL I、CXCR4 的表达均有差别($F=34.88, P=0.000; F=12.07, P=0.000; F=32.29, P=0.000$);非 BPD 组各组无统计学意义($F=0.39, P=0.816; F=0.96, P=0.43; F=0.389, P=0.817$),见图 4。

表 2 CD34、COL I、CXCR4 水平表达对 BPD 发生影响资料
重复测量方差分析

Tab. 2 ANOVA for repeated measurement of data concerning the expression of CD34, COL I and CXCR4 during the occurrence of BPD

变异来源	df	MS	F 值	P 值
时间	2.119	2 545.99	66.25	0.000
测量指标	2	104 801.15	673.54	0.000
时间 × 测量指标	4.24	2 984.46	77.66	0.000

表 3 BPD 组和非 BPD 组临床资料对比 (n, %)

Tab.3 Comparison on clinical data between BPD and non-BPD group (n, %)

指标	BPD组 (n =31)	非 BPD 组 (n =30)	t/Z 值	P 值
胎龄 (周)	29.3 ± 1.7	31.4 ± 1.2	5.791	0.000 ^b
出生体重 (g)	1 410 ± 302	1 753 ± 353	4.075	0.000 ^b
胎膜早破	8 (25.8)	15 (50.0)	3.799	0.051 ^a
绒毛膜羊膜炎	7 (22.6)	13 (43.3)	2.98	0.084 ^a
窒息史	20 (64.5)	12 (40.0)	3.674	0.055 ^a
机械通气时间 (d)	16.97 ± 29.50	3.97 ± 2.44	2.446	0.020 ^b
剖宫产率 (%)	14 (45.2)	16 (53.3)	0.407	0.523 ^a
肺表面活性物质使用率 (%)	18 (58.0)	23 (76.7)	2.394	0.122 ^a
地塞米松使用率 (%)	6 (19.3)	11 (36.7)	2.273	0.132 ^a
动脉导管未闭	16 (51.6)	10 (33.3)	2.083	0.149 ^a
入院日龄 (h)	6.38 ± 5.15	4.58 ± 5.88	1.276	0.207 ^b
用氧时间 (d)	41.1 ± 23.4	9.1 ± 2.6	7.578	0.000 ^b
VAP	23 (74.2)	9 (30.0)	11.939	0.001 ^a

注:a, χ^2 检验;b, t 检验

3 讨论

随着新生儿重症监护技术的发展,早产儿尤其是极低体重儿存活率的提高,BPD 的发生率也随之升高,这使得 BPD 成为影响早产儿生存质量的重要

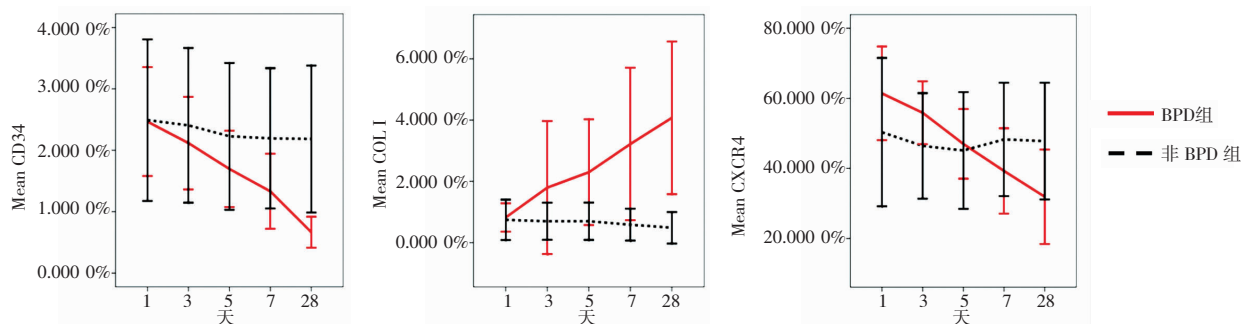


图 4 不同日龄 BPD 及非 BPD 组各组分 CD34、COL I、CXCR4 水平对比

Fig.3 Comparison on expression of CD34, COL I and CXCR4 in BPD and non-BPD groups among different ages after birth

因素^[9]。本研究发现小胎龄儿、低出生体重、VAP、长时间机械通气及用氧可增加患 BPD 风险。这是由于小孕周早产儿肺发育不成熟,肺间质和肺泡分化不全,肺弹力纤维和结缔组织发育不良,在各种致病因素可诱发肺部过度炎症反应,肺泡数目减少,末端肺泡结构简单化,毛细血管减少,肺间质重构,最终表现为肺实质慢性炎症和肺纤维化,从而形成 BPD 病理改变。其中肺发育不成熟、急性肺损伤、损伤后异常修复是引起 BPD 的 3 个关键环节^[10]。

CF 是一种以 CD34、CD45、COL I 为标志的骨髓来源细胞,并表达细胞支架组成的弹性蛋白及 I 型、III 型胶原、纤维连接蛋白等成纤维细胞产物的细胞类型,广泛参与组织修复、纤维化的发生以及多种病理生理变化。Bucala 等^[4]在损伤后 24 h 内就在损伤部位发现了这些属于白细胞亚群的循环纤维细胞,纺锤形状,表达胶原/前胶原和 CD34。本研究发现 BPD 组早产儿生后第 1 天 CXCR4 明显升高,说明 CXCR4 在 CF 迁移过程中其重要作用,可以结合并募集 CF 细胞,这是在临床病例中首次发现这一病理变化。这些循环纤维细胞在损伤部位的出现要比周围部位固有的 MF 迁入损伤部位更快,进而参与胶原的产生,所以这类细胞被确认为是来源于外周血循环。Phillips 等^[11]研究发现在博来霉素致小鼠肺纤维化的模型及人的肺纤维化病灶中,趋化因子 CXCL12 将循环中表达 CD34、CD45、COL I、CXCR4 的 CF 趋化至肺部,并参与 CF 的活化、增殖、迁移及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 分泌等功能,进而促进纤维化的发生,提示 CXCL12/CXCR4 生物轴在循环纤维细胞向 MF 转化的过程中发挥了关键的作用^[12]。

Pilling 等^[13]通过观察培养的循环纤维细胞表面标记,发现在提取循环纤维细胞进行细胞培养初期,循环纤维细胞表型为 CD34、CD45、COL I,然而在转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF-

β) 或内皮素的作用下循环纤维细胞向成纤维细胞分化,从而开始表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 并逐渐丧失 CD34 和 CD45 的表达。本研究通过测定早产儿生后 1、3、5、7、28 d 外周血中 CD34、COL I、CXCR4 水平,发现 BPD 组患儿循环血中生后 28 d CD34/COL I 比值达最小,而 CXCR4 水平持续降低,表明 BPD 组患儿随日龄增大,循环纤维细胞在损伤修复的过程中比例不断升高,并在这一过程中逐渐丧失 CD34 的表达,这些表达 CXCR4 细胞响应远处受损伤的肺组织释放的趋化因子信号,与趋化因子受体 CXCL12 结合,在从骨髓趋化至肺部的过程中停止表达 CD34,促进循环纤维细胞向 MF 转化,MF 会产生大量 ECM,包括 I、III、IV 型胶原、糖蛋白及蛋白聚糖,并分泌金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 使 ECM 在肺间质中生成增多和分解减少^[14],造成 ECM 大量沉积,从而导致肺间质纤维化,从而形成 BPD 的病理改变。

CF 是一类参与多种形式肺部疾病发生发展的间充质祖细胞,在肺损伤修复中发挥重要作用。虽然目前尚无任何一项治疗方法可以单独预防和治疗 BPD,这主要是因为随着正常肺组织的修复, BPD 的肺部病理改变也在逐渐变化,使得很难从中得到切实有效的治疗方法,但随着对 CF 生物学行为的深入研究,有助于预测 BPD 的发生,从而寻找阻断其从循环到肺组织的趋化及自身向效应细胞分化的关键环节,为减少 BPD 的发生提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Bhandari A, Bhandari V. Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatrics*, 2009, 123(6): 1562-1573.
- [2] Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopul-