

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.20.002

## 外周血 cf-DNA/NETs 水平在脓毒症患者中的临床价值研究\*

张春容,陶 武<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属永川医院急诊科,重庆永川 402160)

**[摘要]** **目的** 探讨 cf-DNA/NETs 在脓毒症(sepsis)患者中的临床价值。**方法** 收集健康体检者(control 组)30 例、sepsis 患者(sepsis 组)42 例和非感染性全身炎症反应综合征(nf-SIRS 组)患者 36 例的抗凝血标本,检测 cf-DNA/NETs 表达,并与 C 反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)对比分析。**结果** 与 control 组比较,sepsis 组炎症指标均处于较高的水平。与 nf-SIRS 组比较,sepsis 组 PCT $[(1.2 \pm 1.7) \text{ ng/mL vs. } (5.1 \pm 6.8) \text{ ng/mL}]$ 和 cf-DNA/NETs $[(596 \pm 183) \text{ ng/mL vs. } (1\ 576 \pm 254) \text{ ng/mL}]$ 显著升高。sepsis 组和 nf-SIRS 组 PCT 水平在第 7 天时差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但 sepsis 组仍维持较高水平的 cf-DNA/NETs $[(1\ 389 \pm 673) \text{ ng/mL vs. } (474 \pm 122) \text{ ng/mL}]$ 。**结论** cf-DNA/NETs 和 PCT 在早期诊断 sepsis 方面均有一定价值,但 cf-DNA/NETs 在后期辨别 sepsis 与 nf-SIRS 方面更优于 PCT。

**[关键词]** 脓毒症;全身炎症反应综合征;降钙素原;中性粒细胞胞外诱捕网

**[中图分类号]** R714.62

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)20-2740-03

### Clinical value of cf DNA/NETs levels in peripheral blood of sepsis patients\*

Zhang Chunrong, Tao Wu<sup>△</sup>

(Department of Emergency, the Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the clinical value of cf DNA/NETs levels in peripheral blood of sepsis patients. **Methods** We measured the cf DNA/NETs expression in blood samples of 30 cases of healthy subjects (the control group), 42 cases of sepsis patients (the sepsis group) and 36 cases of nf SIRS patients (the nf SIRS group), and compared them with CRP and PCT. **Results** Compared with control group, patients all showed higher levels of inflammatory indexes in sepsis group. Compared with nf SIRS group, PCT $[(1.2 \pm 1.7) \text{ ng/mL vs. } (5.1 \pm 6.8) \text{ ng/mL}]$  and cf DNA/NETs $[(596 \pm 183) \text{ ng/mL vs. } (1\ 576 \pm 254) \text{ ng/mL}]$  were increased significantly in sepsis group. PCT levels in the patients in both groups at seventh day already had no significant difference ( $P > 0.05$ ), but sepsis group still maintained high levels of cf DNA/NETs $[(1\ 389 \pm 673) \text{ ng/mL vs. } (474 \pm 122) \text{ ng/mL}]$ . **Conclusion** cf-DNA/NETs and PCT have certain value in the early diagnosis of sepsis, cf DNA/NETs showed better diagnostic value in distinguishing sepsis from non infectious systemic inflammatory response syndrome than PCT in late stage.

**[Key words]** sepsis; systemic inflammatory response syndrome; procalcitonin; cf-DNA/NETs

脓毒症(sepsis)多为全身或局部感染所诱发,激活的粒细胞是清除入侵病原体执行免疫防御的主要效应细胞。因其病情、病因多样且复杂,研究者们一直致力于寻找有效的生物标志物探寻可能的发病机制<sup>[1]</sup>。现有研究报道,除了杀菌蛋白外,中性粒细胞还存在第 2 种杀菌机制——释放由颗粒蛋白和 DNA 构成的中性粒细胞胞外诱捕网(cf-DNA/NETs)<sup>[2]</sup>,但 cf-DNA/NETs 在 sepsis 患者中报道还较少。为进一步阐述 sepsis 可能的机制,本研究据此设计,拟探讨 cf-DNA/NETs 在 sepsis 患者中的表达及意义,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 纳入 2014 年 3 月至 2015 年 1 月于本院就诊的 sepsis 患者 42 例(sepsis 组),诊断均符合美国胸科医师协会/美国危重症医学学会在美国华盛顿联合会议对 sepsis 的诊断标准。另纳入非感染引起的全身炎症反应综合征患者 36 例(non infection SIRS, nf-SIRS 组)。纳入 30 例健康体检者作为对照组(control 组)。排除标准:年龄小于 18 岁;妊娠状态或哺乳期妇女;合并人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者;恶性肿瘤者;免疫抑制(包括长期使用激素治疗和放疗等);入组 24 h

内死亡者;患者或家属不同意参加此项研究者。对照组纳入时排除 1 周前有发热、咳嗽咳痰或体检时有白细胞(WBC)升高可疑感染征象者。3 组受试者在年龄、性别比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。与 control 组比较,sepsis 组和 nf-SIRS 组体温显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集与检测** 于第 1、3、7 天 7:00~9:00 采集血液样本于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,−80 ℃保存待测。cf-DNA/NETs 检测同文献报道,采用基于 PicoGreen 荧光染料的方法,采用 Modulus™单管型多功能检测仪进行检测,范围在 50~3 000 ng/mL<sup>[2]</sup>。将标准品小牛胸腺嘧啶 DNA 干粉倍比稀释后加入 PicoGreen 工作液并混匀,使用 Modulus™单管型多功能检测仪 Blue 荧光模块检测其荧光值。以标准品溶液的浓度与对应的荧光强度作直线回归,并制标准曲线。将待测血液样本与 PicoGreen 工作液混匀,检测其荧光值,代入标准曲线即求得样本 cf-DNA/NETs 水平。

**1.2.2 资料收集** 收集 3 组受试者的人口学资料。收集患者各项临床资料和实验室检测结果,包括体温、影像学资料、C 反

表 1 3 组受试者第 1 天各实验室检测指标比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	CRP(mg/L)	PCT(ng/mL)	WBC( $\times 10^9/L$ )	N(%)	cf-DNA/NETs(ng/mL)
control 组	30	6.2 $\pm$ 1.6	0.01 $\pm$ 0.05	5.4 $\pm$ 3.7	78.4 $\pm$ 10.4	76.2 $\pm$ 34.7
sepsis 组	42	47.2 $\pm$ 22.4*	5.10 $\pm$ 6.80*#	13.4 $\pm$ 4.6*	96.8 $\pm$ 7.6*	1 576.0 $\pm$ 254.0*
nf-SIRS 组	36	51.8 $\pm$ 18.9*	1.20 $\pm$ 1.70*	11.8 $\pm$ 5.8*	92.5 $\pm$ 7.3*	596.0 $\pm$ 183.0*#

\*:  $P < 0.05$ , 与 control 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 nf-SIRS 组比较。

表 2 两组患者 PCT 和 cf-DNA/NETs 在各时间点表达情况( $\bar{x}\pm s$ , ng/mL)

组别	n	PCT			cf-DNA/NETs		
		第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天
sepsis 组	42	5.1 $\pm$ 6.8#	2.7 $\pm$ 7.3#	0.7 $\pm$ 1.1	1 576 $\pm$ 254#	1 443 $\pm$ 389#	1 389 $\pm$ 673#
nf-SIRS 组	36	1.2 $\pm$ 1.7	0.8 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.6	596 $\pm$ 183	582 $\pm$ 137	474 $\pm$ 122

#:  $P < 0.05$ , 与 nf-SIRS 组比较。

应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、WBC、中性粒细胞(N)比例等。对患者进行急性生理及慢性健康评估(APACHE II)量表检测。

**1.3 统计学处理** 所有数据录入 Excel 表格,使用 Graph pad5.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较使用单因素方差分析(one-way anove)。计量资料组间比较使用 Fisher 确切概率法。双侧检验效能,以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

**2 结 果**

**2.1 实验室检测指标比较** 与 control 组比较,sepsis 组和 nf-SIRS 组各项炎症指标均显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。sepsis 组 PCT 和 cf-DNA/NETs 水平显著高于 nf-SIRS 组,两组在 CRP、WBC 和 N 比例等一般感染指标上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

**2.2 各组在不同时间点的 cf-DNA/NETs 表达** 在入组后第 1、3 天,两组患者间 PCT 和 cf-DNA/NETs 水平仍维持显著差异状况。而在治疗后第 7 天,sepsis 患者血浆 PCT 水平将至 0.7 ng/mL, nf-SIRS 组为 0.4 ng/mL,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。sepsis 组 cf-DNA/NETs 并未随着时间的推移显著降低,在第 7 天时仍维持较高水平,与 nf-SIRS 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 治疗 7 d 后亚组分析** 在治疗后第 7 天,sepsis 组有 5 例患者各项指标恢复正常,考虑近日出院进行院外随访(A 组)。24 例患者体温恢复正常,不再发热,但临床症状提示有感染可能(B 组)。另 13 例患者仍发热,最低体温高于 37.8  $^{\circ}C$ ,细菌学检查提示有确切的致病菌(C 组)。nf-SIRS 组与 A 组结果类似,两组间各指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与前两组比较,B、C 组 cf-DNA/NETs 均处于较高水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 PCT 值仅在 C 组表现为显著增高,与各组均有统计学差异( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 治疗后 7 d 临床亚组分析 PCT 和 cf-DNA/NETs 表达( $\bar{x}\pm s$ , ng/mL)

组别	n	PCT	cf-DNA/NETs
A 组	5	0.23 $\pm$ 0.36	351 $\pm$ 117
B 组	24	0.52 $\pm$ 0.65	1 462 $\pm$ 140 <sup>ab</sup>
C 组	13	1.34 $\pm$ 0.73 <sup>abc</sup>	1 649 $\pm$ 216 <sup>ab</sup>
nf-SIRS 组	36	0.40 $\pm$ 0.60	474 $\pm$ 122

a:  $P < 0.05$ , 与 nf-SIRS 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 A 组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 B 组比较。

**3 讨 论**

Brinkmann 等<sup>[3]</sup>首次报道炎性期激活的 N 能够形成 cf-DNA/NETs,其主要成分为 DNA、抗菌肽与颗粒源性蛋白质。cf-DNA/NETs 结构中富含组蛋白,包括组蛋白 H1、H2A、H2B、H3 和 H4。颗粒源性蛋白质有嗜苯胺蓝颗粒中的 N 弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、组织蛋白酶 G,以及其他特异性颗粒蛋白质。Pilszczek 等<sup>[4]</sup>报道,N 在形成 NETs 应答金黄色葡萄球菌反应时,整个过程非常迅速(5~60 min)。Wartha 等<sup>[5]</sup>指出,N 死亡时释放 cf-DNA/NETs 是一种不同于细胞凋亡或死亡的新的细胞死亡途径,这种细胞死亡程序称为 ETosis。细胞经 ETosis 表现为细胞核膜崩解,细胞核和细胞质混合,细胞器消失,并在胞外形成纤维样诱捕网结构。三维网状结构的 cf-DNA/NETs 不仅可在病灶部位募集高浓度杀菌肽,还可利用其独特的物理结构阻止病原体的扩散<sup>[6]</sup>。带正电荷的 cf-DNA/NETs 组分与带负电荷的病原体之间的电荷吸引是发生捕获的可能机制<sup>[7]</sup>。

本研究报道一致,在疾病早期即有 cf-DNA/NETs 的显著升高。而且 cf-DNA/NETs 的表达有一定特异性,在感染引起的 sepsis 患者可高达 1 576 ng/mL,在非感染引起的 SIRS 患者仅轻度增高为 596 ng/mL。本研究还发现,cf-DNA/NETs 的水平似乎和血液中 WBC 的数量和 N 比例并无相关性,因为 sepsis 组和 nf-SIRS 组患者这两项指标差异并不明显。虽然 sepsis 组和 nf-SIRS 组存在着是否发生感染的根本病因,但两组患者的 CRP 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),能反映两组间区别的仅为 PCT 和 cf-DNA/NETs。进一步分析两组患者各时间点的 PCT 和 cf-DNA/NETs 表达情况发现,PCT 会随着治疗不断下降,到第 7 天时两组已无显著差异,但两组患者此时的临床表现往往差异很大,sepsis 患者体内病灶并未完全消散。治疗 7 d 后对 sepsis 组按疗效和临床症状进行亚组分析发现,而 cf-DNA/NETs 不管是在疾病早期还是晚期,表达都较为稳定,其水平不会随着治疗和时间改变(C 组),而更多的是与机体的感染情况相关(B 组),较 PCT 更能客观地反映患者机体内抗菌水平。对于与 nf-SIRS 患者表现类似的 B 组患者,虽然体温恢复正常,PCT 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但临床高度怀疑仍有残留的感染灶,持续高水平的 cf-DNA/NETs 是有力证据。对于后期 sepsis 患者,B 组患者依靠常规指标难以与 nf-SIRS 患者区分出来,是进行 cf-DNA/NETs 检测的主要受益者。

CRP 是肝脏细胞在 IL-6 作用下分泌产生的一种急性时相蛋白,在应激情况下增高。张敏等<sup>[8]</sup>报道以 nf-SIRS 为对照,CRP 具有一定早期诊断 sepsis 的价值,这与本报道有出入的地方,可能是因为纳入的患者存在人群差异。sepsis 患者有病情轻重的差异,患者分层分布的差异可能是造成这种结果的重要原因。有研究报道,PCT 有对于早期诊断 sepsis 和判断病情轻重有较好的价值,诊断的特异性和敏感性分别为 80% 和 76%<sup>[9]</sup>。但研究者多局限于早期观察 PCT 的诊断价值,并未对 PCT 的变化进行动态随访。本研究拉长了观察时间,发现随着药物的应用,PCT 已不能准确反映患者后期的状态。对于此时的综合评估,cf-DNA/NETs 更客观恰当。

cf-DNA/NETs 是与机体感染更密切相关的指标。因为 cf-DNA/NETs 是由多种细菌及其组分 LPS 刺激粒细胞活化产生,且机体接受整个病原体的刺激要比其单一组分如 LPS 的刺激能生成更多的 NETs<sup>[10]</sup>。目前研究发现,NETs 多在有病原体入侵的感染部位发生。Lögters 等<sup>[11]</sup>通过研究关节滑液中 cf-DNA/NETs 水平与脓毒性关节炎的关系,发现脓毒性关节炎患者关节滑液 cf-DNA/NETs 水平比非感染性关节炎或骨关节炎患者显著升高。因为 DNA 是 NETs 的主要构成成分,NETs 可因 DNA 酶而非蛋白酶的作用水解。以 rhD-Nase 干预可阻碍机体的早期免疫反应,加重多种微生物引起的败血症病理改变<sup>[12]</sup>。

综上所述,cf-DNA/NETs 和 PCT 一样,不仅在早期诊断 sepsis 方面有一定价值,而且在后期辨别 sepsis 与 nf-SIRS 方面更优于 PCT。在 sepsis 病程全期,均可以 cf-DNA/NETs 表达情况来评估患者感染情况,指导临床治疗。

## 参考文献

- [1] Tang L,Zhao Y,Wang D,et al. Endocan levels in peripheral blood predict outcomes of acute respiratory distress syndrome[J]. *Mediators Inflamm*,2014(2014):625180.
- [2] Kambas K,Mitroulis I,Apostolidou E,et al. Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45427.
- [3] Brinkmann V,Reichard U,Goosmann C,et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*,2004,303(5663):1532-1535.
- [4] Pilszczek FH,Salina D,Poon KK,et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to staphylococcus aureus[J]. *J Immunol*,2010,185(12):7413-7425.
- [5] Wartha F,Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway[J]. *Science Signaling*,2008,1(21):25.
- [6] 张晓兰,宋英莉,朱辉. 中性粒细胞胞外诱捕网的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*,2012,35(3):83.
- [7] Kaplan MJ,Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity[J]. *J Immunol*,2012,189(6):2689-2695.
- [8] 张敏,冯志顺,邓哲彤,等. 血清降钙素原和 C 反应蛋白检测在脓毒症早期诊断中的意义[J]. *广东医学*,2012,32(17):2260-2262.
- [9] 谢卫星,时斌,宋秀琴,等. 降钙素原在鉴别感染性和非感染性全身炎症反应综合征中的意义[J]. *内科急危重症杂志*,2004,10(3):143-145.
- [10] Hemmers S,Teijaro JR,Arandjelovic S,et al. PAD4-mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection[J]. *PLoS One*,2011,6(7):e22043.
- [11] Lögters T,Paunel-Görgülü A,Zilkens C,et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis[J]. *J Orthop Res*,2009,27(11):1401-1407.
- [12] Meng W,Paunel-Görgülü A,Flohé S,et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice[J]. *Crit Care*,2012,16(4):R137.

(收稿日期:2015-01-18 修回日期:2015-04-26)

(上接第 2739 页)

polyps in asymptomatic individuals[J]. *JAMA*,2003,290(22):2959-2967.

- [12] Okamoto M,Shiratori Y,Yamaji Y,et al. Relationship between age and site of colorectal cancer based on colonoscopy findings[J]. *Gastrointest Endosc*,2002,55(4):548-551.
- [13] Rex DK. Real-time endoscopic pathology assessment of colorectal polyps[J]. *Curr Gastroenterol Rep*,2013,15(11):354.
- [14] Rostirolla RA,Pereira-Lima JC,Teixeira CR,et al. Development of colorectal advanced neoplasia/adenomas in the

long-term follow up of patients submitted to colonoscopy with polypectomy[J]. *Arq Gastroenterol*,2009,46(3):167-172.

- [15] Silvana SM,Rosa VF,dos Santos AC,et al. Influence of patient age and colorectal polyp size on histopathology findings[J]. *ABCD Arq Bras Cir Dig*,2014,27(1):109-113.
- [16] Arber N,Spicak J,Rcz I,et al. Five-year analysis of the prevention of colorectal sporadic adenomatous polyps trial[J]. *Am J Gastroenterol*,2011,106(6):1135-1146.

(收稿日期:2015-01-12 修回日期:2015-04-06)