

血浆可溶性晚期糖基化终产物受体水平在危重患者呼吸机相关性肺炎预后中的意义^{*}

上海市东方医院吉安医院 唐瑾 张文 徐小妹 杨志龙 刘可心 王学斌^{*}, 吉安 343000

摘要 目的:观察晚期糖基化终产物(RAGE)及其代谢产物可溶性晚期糖基化终末产物受体(sRAGE)水平对危重患者呼吸机相关性肺炎(VAP)预后的预测作用。方法:回顾性分析40例VAP患者的临床资料,根据患者28 d生存状况分为存活组(24例)和死亡组(16例)。采用实时荧光定量RT-PCR检测患者外周血单个核细胞(PMBC)中RAGE mRNA表达。采用酶联免疫吸附法检测患者血浆sRAGE和血清炎症因子白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析相关指标与VAP患者死亡的关系。结果:28 d病死率为40%(16/40)。与存活组比较,死亡组患者PMBC中RAGE mRNA及PCT、IL-6、TNF- α 和sRAGE水平显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。血浆中sRAGE水平ROC曲线下面积为0.779,最佳截点为2.59 ng/L,敏感度、特异度分别为81.3%、73.9%($P = 0.003$)。PMBC中RAGE mRNA的ROC曲线下面积为0.749,IL-6为0.872,TNF- α 为0.720,PCT为0.879,CRP为0.310。结论:血浆sRAGE水平及PMBC中RAGE mRNA的升高与VAP患者的死亡密切相关。血浆sRAGE水平对预测VAP患者的预后具有一定的意义。

关键词 呼吸机相关性肺炎; 炎症因子; 晚期糖基化终产物受体; 预后

中图分类号 R563⁺.1 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20210208

Evaluation of plasma soluble receptors for advanced glycation end-products on the prognosis of critically ill patients with ventilator-associated pneumonia TANG Jin, ZHANG Wen, XU Xiao-mei, YANG Zhi-long, LIU Ke-xin, WANG Xue-bin^{*}. Jian Hospital of East Hospital, Jian 343000, China

Abstract Objective: To observe the predictive effect of receptors for advanced glycation end products (RAGE) and their metabolites soluble receptors for advanced glycation end products (sRAGE) on critically ill patients with ventilator-associated pneumonia (VAP). Methods: The retrospective analysis was done on 40 cases of VAP. All the patients according to the 28-day survival were divided into two groups; survival group (24 cases) and death group (16 cases). The RAGE mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells (PMBC) was detected by real-time-PCR. ELISA method was used to detect the protein expression of sRAGE, IL-6, IL-8 and TNF- α in the plasma and serum of patients. Correlation between these indicators and mortality in VAP patients was analyzed by ROC curve. Results: The 28-day mortality in VAP patients was 40% (16/40). As compared with survival group, the RAGE mRNA, PCT, IL-6, TNF- α and sRAGE levels in death group were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The area under the ROC curve of the plasma sRAGE level was 0.779, and the best cut-off point was 2.59 ng/L. The sensitivity and specificity of the assay were 81.3% and 73.9% respectively ($P = 0.003$). Under the other ROC curves, the area of PMBC RAGE mRNA, IL-6, TNF- α , PCT and CRP was 0.749, 0.872, 0.720, 0.879, and 0.310 respectively. Conclusions: The elevation of plasma sRAGE and PMBC RAGE mRNA is closely related to the death of VAP. The level of sRAGE in plasma has a certain significance in predicting the prognosis of VAP patients.

Key words Ventilator-associated pneumonia; Inflammatory cytokines; Receptors for advanced glycation end-products; Prognosis

呼吸机相关性肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)是指接受机械通气(mechanical ventilation, MV)48 h后至拔管后48 h内出现的肺部感染^[1]。VAP病死率高,严重影响重症患者的预后。近年来研究表明晚期糖基化终产物受体(receptor of

advanced glycation end-products, RAGE)在I型肺泡上皮细胞的基底外侧膜有丰富的表达^[2],且RAGE和核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)之间存在一个正反馈调控的信号通路^[3]。因此推测RAGE可能在VAP发生发展中起重要作用。本文研究RAGE和可溶性晚期糖基化终末产物受体(soluble receptor for advanced glycation end-products, sRAGE)

^{*}基金项目:吉市科计字[2018]6号(49)

^{*}通信作者:王学斌, E-mail: wxuebin@163.com

对 VAP 患者预后的评估价值。

资料与方法

一般资料 选择 2018 年 1~12 月上海市东方医院和吉安医院重症监护室收治的需行机械通气治疗且确诊为 VAP 患者 40 例(男 25,女 15),平均年龄(64.2 ± 8.9)岁。根据患者确诊 VAP 后 28 d 生存状况分为存活组与死亡组。其中存活组 24 例,原发病:呼吸系统疾病 7 例、心血管疾病 2 例、脑血管疾病 4 例、重症胰腺炎 4 例、脓毒血症 5 例、其他 2 例。死亡组 16 例,原发病:呼吸系统疾病 4 例、心血管疾病 2 例、脑血管疾病 3 例、重症胰腺炎 3 例、脓毒血症 2 例、其他 2 例。2 组患者的基础疾病构成无显著差别。

诊断标准 根据中华医学会重症医学分会 2013 年指南^[4],有创通气 48 h 以上至停用呼吸机 48 h 以内,符合以下 2 项或 2 项以上临床诊断标准和病原学诊断标准之一者诊断为 VAP。胸部 X 线影像可见新发或进展性的浸润阴影,同时满足以下 2 项或 2 项以上临床诊断标准:①体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$;②外周血白细胞计数(WBC) $>10 \times 10^9/\text{L}$ 或 $<4.0 \times 10^9/\text{L}$;③气管支气管内出现脓性分泌物。排除肺水肿、急性呼吸窘迫综合征、肺结核、肺栓塞等疾病。

所有入选患者均接受规范化治疗,包括原发病治疗、合理的抗生素和液体管理、机械通气、纠正电解质和酸碱紊乱、营养支持和器官功能维护等。实验程序符合赫尔辛基宣言并经上海市东方医院吉安医院伦理委员会同意,所有患者或家属均知情并签署同意书。

方法 收集患者年龄、性别、身高、体重、原发疾病等一般资料,记录患者入院时的体温、神志、呼吸频率、血压、肺部症状体征、肺部影像学、血气分析、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、血常规、肝肾功能等。每位患者入院后 24 h 进行急性生理与慢性健康状况评估(acute physiology and chronic health evaluation, APACHE II)评分。记录有创、无创呼吸机应用及参数设置,血管活性药物的使用及剂量。

1. 检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 RAGE 的 mRNA 表达量:采集患者外周血 20 mL,用 Ficoll 密度梯度离心法分离出单核细胞层,应用 CD14 标记筛选。分离后的单个核细胞进行体外培养,取第 5-15 代细胞进行实

验。采用实时荧光定量 RT-PCR 检测人 PMBC 中 RAGE mRNA 表达:总 RNA 的提取、RNA 逆转录均按照试剂盒说明书进行。实时荧光定量 PCR 试剂盒进行实时定量 RT-PCR 试验,引物由上海生工科技有限公司合成,引物序列如下:RAGE Forward primer: GAAACTGAACACAGGCCGGA, Reverse primer: CACG-GACTCGGTAGTTGGAC; GAPDH Forward primer: 5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT-3', Reverse primer: 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'。反应条件为: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 72°C 30 s 扩增 40 个循环。所有样本做 3 复孔。根据待测标本的 Ct 值,以 GAPDH 为内参,采用相对定量法对 RT-PCR 结果进行分析。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对含量分析。

2. 检测血清炎症因子水平:取患者外周静脉血 5 mL,离心后留取上清液,置于 -20°C 冰箱待检,试剂盒由上海生物仪器公司提供。采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组患者血清炎症因子白介素-6(interleukin 6, IL-6)、白介素-8(interleukin 8, IL-8)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

3. 检测血浆中 sRAGE 水平:取患者外周静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。采用 ELISA 法检测患者血浆 sRAGE 水平, sRAGE 抗体试剂盒购自美国 R&D 公司。

统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件,符合正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,非正态分布的变量采用非参数检验(Mann-Whitney U test)。计数资料用百分数(%)表示,比较采用 χ^2 检验。绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,根据约登指数的最大值确定其对应的 VAP 患者生存与否的最佳临界值、敏感度及特异度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

临床资料 2 组患者的性别、年龄、APACHE II 评分、WBC、CRP、IL-8 水平比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。2 组患者的血 PCT、TNF- α 、IL-6、RAGE mRNA 和 sRAGE 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

RAGE 与 VAP 预后的相关性分析 Pearson 相

关性分析显示, VAP 患者的预后与 PCT ($r = -0.626$, $P = 0.000$)、TNF- α ($r = -0.404$, $P = 0.010$)、IL-6 ($r = -0.590$, $P = 0.000$)、RAGE mRNA ($r = -0.469$, $P = 0.002$)、sRAGE ($r = -0.470$, $P = 0.002$) 呈显著负相关。

PMBC 中 RAGE mRNA 和血浆中 sRAGE 水平对 VAP 的诊断效能分析 ROC 曲线分析显示, PMBC

中 RAGE mRNA 水平 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.749, 最佳截点为 0.46, 此时检测的敏感度、特异度分别为 1%、56.5% ($P = 0.009$)。血浆中 sRAGE 水平 ROC 曲线下面积为 0.779, 最佳截点为 2.59 ng/L, 此时检测的敏感度、特异度分别为 81.3%、73.9% ($P = 0.003$)。各指标诊断 ROC 曲线及效能见表 2 和图 1。

表 1 2 组患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	性别 (例)		年龄 (岁)	APACHE II 评分 (分)	WBC ($\times 10^9$)	CRP (mg/L)	PCT (ng/mL)
		男	女					
死亡组	16	11	5	64.9 $\pm$ 10.4	28.8 $\pm$ 7.9	15.1 $\pm$ 2.5	18.0 $\pm$ 6.5	2.36 $\pm$ 0.53
存活组	24	15	9	63.8 $\pm$ 7.9	24.9 $\pm$ 6.7	16.2 $\pm$ 2.8	13.4 $\pm$ 3.1	1.57 $\pm$ 0.47 **

组别	例	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	RAGE mRNA	sRAGE (ng/L)
死亡组	16	82.1 $\pm$ 35.6	262 $\pm$ 121	238 $\pm$ 116	1.26 $\pm$ 0.73	3.09 $\pm$ 1.10
存活组	24	52.4 $\pm$ 29.4 *	130 $\pm$ 64 **	173 $\pm$ 96	0.64 $\pm$ 0.52 **	2.15 $\pm$ 0.71 **

注:与死亡组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各指标对 VAP 患者预后的判断效能分析

指标	AUC	截断点	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
CRP	0.310	10.62	37.5	8.7	0.046
PCT	0.879	2.28	81.3	95.7	0.000
TNF- α	0.720	66.0	81.3	65.2	0.021
IL-6	0.872	115.1	1	39.1	0.000
RAGE mRNA	0.749	0.46	1	56.5	0.009
sRAGE	0.779	2.59	81.3	73.9	0.003

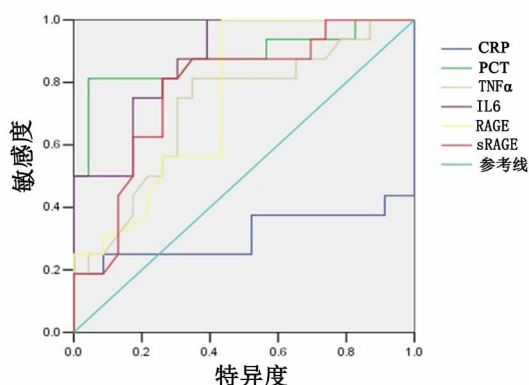


图 1 各指标判断 VAP 患者预后的 ROC 曲线

讨论

流行病学提示气管插管、误吸、自身定植菌群、肺损伤、某些药物 (长期使用抗生素、激素、免疫抑制剂、抗肿瘤药等) 的使用、炎症反应等因素可能导致 VAP 的发生^[5-7]。机械通气诱导细胞因子表达导致生物学反应即生物伤, 同时破坏肺泡细胞膜的完整性, 细胞因子从细胞内转移到肺泡腔和全身血液循环, 还有一些细胞跨膜受体将牵张转化为细胞

内信号, 导致 NF- κ B 通路的激活, 引起促炎细胞因子的过度产生^[8]。

RAGE 是一种跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族。RAGE 有一个配体家族, 包括晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end-products, AGE)、双性素 (amphoterin)、 β -淀粉样变多肽 (amyloid peptide, A β)、细胞外新鉴定的 RAGE 结合蛋白 (extracellular newly identified RAGE-binding protein, EN-RAGE)、高迁移率族蛋白 B 1 (high mobility group protein B 1, HMGB 1) 等^[9,10]。RAGE 在肺组织表达丰富, 在中性粒细胞聚集、肺水肿和细胞因子释放的过程中起着重要作用^[11,12]。Su 等^[13]应用 RAGE 作为 I 型肺泡上皮细胞损伤的标志物, 并用 RAGE 来区分直接和间接因素导致的急性肺损伤。Uchida 等^[14]报道, RAGE 分布于 I 型肺泡上皮细胞的基底外侧膜, 并认为 RAGE 可以作为 I 型肺泡细胞的生物标志物, 且与急性肺损伤程度呈正相关。sRAGE 是从细胞膜表面裂解下来的 RAGE 的胞外段, 通过受损的肺泡壁和毛细血管渗透到肺泡水肿液和血液中, 与感染存在紧密关联, 参与体内炎症反应, 为促进炎症

反应的活性递质。危重患者血清中 sRAGE 主要来源于肺组织,能特异性反映肺泡上皮的损伤^[15]。

危重患者使用 MV 发生 VAP 时肺组织的损伤和修复是一个交叉而持续的过程,RAGE 参与了肺的修复与重建过程。本研究发现 PCT、TNF- α 、IL-6、RAGE mRNA 及 sRAGE 水平与 VAP 患者的存活率呈显著负相关。部分研究结果与既往的报道类似,陈玺等^[16]报道 MV 并 VAP 患者血清和支气管肺泡灌洗液中的 PCT 水平明显升高。

在这几个标志物中,血浆中 sRAGE 水平对于预测 VAP 患者的预后优势较为明显,检测的敏感度、特异度分别为 81.3%、73.9% ($P=0.003$),其 ROC 曲线下面积亦较大,为 0.779,具有一定的诊断准确性,最佳截点为 2.59 ng/L。然而 PMBC 中 RAGE mRNA 水平 ROC 曲线下面积为 0.749,虽对预测 VAP 患者的预后有一定诊断意义,但预测 VAP 患者的敏感度很差,为 1%,特异度也较差,为 56.5%。血清 PCT 水平对预测 VAP 患者的预后优势最为明显,ROC 曲线下面积为 0.879,最佳截点为 2.28 ng/mL,此时检测的敏感度、特异度分别为 81.3%、95.7% ($P=0.000$)。因此在呼吸机辅助通气时,检测患者血浆 sRAGE 和血清 PCT 水平对于预测 VAP 患者的预后具有很好作用。

本研究为单中心的回顾性分析,部分入组患者在入组前(其他科室转入我科) 10 d 内已使用抗菌药物治疗。VAP 患者均为危重症患者,常存在多脏器功能损害等情况,这些因素均可导致血清中 sRAGE 水平增高。本研究虽在纳入标准中限制了可能引起血清中 sRAGE 水平升高的患者入组,但仍可能因危重患者混杂因素过多而对最终结果造成一定偏倚,期待临床研究提供更多和更有说服力的循证医学证据。

参考文献

- 1 Spalding MC, Cripps MW, Minshall CT. Ventilator-Associated Pneumonia: New Definitions[J]. Crit Care Clin, 2017, 33(2): 277-292.
- 2 Blondonnet R, Audard J, Belville C, et al. RAGE inhibition reduces acute lung injury in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7208.
- 3 Downs CA, Johnson NM, Tsapralis G, et al. RAGE-induced changes in the proteome of alveolar epithelial cells[J]. J Proteomics, 2018,

- 177:11-20.
- 4 中华医学会重症医学分会. 呼吸机相关性肺炎诊断、预防和治疗指南[J]. 中华内科杂志, 2013, 6(23): 524-543.
- 5 Kuipers MT, van der Poll T, Schultz MJ, et al. Bench-to-bedside review: damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury[J]. Crit Care, 2011, 15(6): 235.
- 6 Tsay TB, Jiang YZ, Hsu CM, et al. Pseudomonas aeruginosa colonization enhances ventilator-associated pneumonia-induced lung injury[J]. Respir Res, 2016, 17(1): 101.
- 7 Hellyer TP, Morris AC, McAuley DF, et al. Diagnostic accuracy of pulmonary host inflammatory mediators in the exclusion of ventilator-acquired pneumonia[J]. Thorax, 2015, 70(1): 41-47.
- 8 Shelhamer MC, Rowan MP, Cancio LC, et al. Elevations in inflammatory cytokines are associated with poor outcomes in mechanically ventilated burn patients[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 79(3): 431-436.
- 9 Bongarzone S, Savickas V, Luzzi F, et al. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective[J]. J Med Chem, 2017, 60(17): 7213-7232.
- 10 Byun K, Yoo Y, Son M, et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases[J]. Pharmacol Ther, 2017, 177: 44-55.
- 11 Oczypok EA, Perkins TN, Oury TD. All the "RAGE" in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses[J]. Paediatr Respir Rev, 2017, 23: 40-49.
- 12 Yonchuk JG, Silverman EK, Bowler RP, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) as a biomarker of emphysema and the RAGE axis in the lung[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192(7): 785-792.
- 13 Su X, Looney MR, Gupta N, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(1): L1-L5.
- 14 Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(9): 1008-1015.
- 15 Takahashi G, Hoshikawa K, Matsumoto N, et al. Changes in serum S100A12 and sRAGE associated with improvement of the PaO₂(2)/FiO₂(2) ratio following PMX-DHP therapy for postoperative septic shock[J]. Eur Surg Res, 2011, 47(3): 135-140.
- 16 陈玺, 魏春林. 降钙素原、白细胞介素-17 和可溶性髓系细胞触发受体 1 水平的检测在机械通气并呼吸机相关性肺炎患者中的意义[J]. 内科急危重症杂志, 2019, 25(4): 309-313.

(2019-07-20 收稿 2020-01-15 修回)