

血清钙卫蛋白 S100A8/A9 调控成人医院获得性肺炎进展的机制研究（临床与体外实验结合）

吕云霞 陈亮 唐灵 李芳芳 刘文碧

什邡市人民医院（检验科），四川省什邡市，618400；

摘要：目的：探讨血清钙卫蛋白 S100A8/A9 在成人医院获得性肺炎（HAP）中的表达特征及调控机制，为 HAP 诊断、病情评估及靶向干预提供依据。方法：采用临床对照研究与体外细胞实验结合设计：①临床研究选取 66 例 HAP 患者（HAP 组）及 40 例非 HAP 住院患者（对照组），ELISA 法检测血清 S100A8/A9 水平，分析其与炎症因子、病情评分及预后的相关性，ROC 曲线评估其诊断及预后预测价值；②体外实验以 A549 细胞为对象，肺炎克雷伯菌构建感染模型，S100A8/A9-siRNA 沉默靶基因。结果：①临床研究：HAP 组血清 S100A8/A9 水平（ $856.2 \pm 183.5 \text{ pg/mL}$ ）显著高于对照组（ $334.7 \pm 75.2 \text{ pg/mL}$ ），重症亚组高于轻症亚组（ $P < 0.05$ ）；其水平与 IL-6、SAA 及 PSI、APACHEII 等评分呈正相关，与 28 天生存率呈负相关（ $P < 0.05$ ）；诊断 HAP 及预测 28 天死亡的 AUC 分别为 0.912、0.876；②体外实验：细菌感染后 S100A8/A9、IL-6、TNF- α mRNA 表达升高，沉默 S100A8/A9 后上述基因表达显著降低（ $P < 0.05$ ）。结论：血清 S100A8/A9 可作为 HAP 早期诊断、病情及预后评估的潜在生物标志物，其可能通过介导肺泡上皮细胞炎症反应调控 HAP 进展，为靶向治疗提供新靶点。

关键词：医院获得性肺炎；钙卫蛋白 S100A8/A9；炎症因子；病情严重程度；肺泡上皮细胞

DOI：10.69979/3029-2808.26.01.056

医院获得性肺炎（HAP）是临床最常见的医院获得性感染，占比 29.5%。其病原学检测滞后、影像学特异性不足，导致早期诊断困难；重症患者死亡率达 30%~50%，现有病情评估工具缺乏可动态监测的精准生物标志物，寻找有效分子标志物成为临床关键需求。钙卫蛋白 S100A8/A9 是 S100 家族成员，由中性粒细胞等分泌，炎症刺激下可快速释放并稳定存在于体液中。其通过结合 TLR4 等受体激活炎症信号通路，促进 IL-6、TNF- α 等促炎因子释放，参与感染性疾病进程。近年研究显示其在社区获得性肺炎（CAP）中高表达，与病情及预后相关，但 HAP 与 CAP 在病原谱、宿主状态上差异显著，S100A8/A9 在 HAP 中的诊断价值及调控机制尚缺乏临床与基础结合的证据支持。

基于此，本研究采用“临床研究 + 体外实验”双重设计，通过大样本临床对照研究明确 S100A8/A9 在 HAP 中的诊断及预后价值，借助肺炎克雷伯菌感染的肺泡上皮细胞模型验证其对炎症反应的调控作用，从“临床 - 细胞 - 分子”层面揭示其调控 HAP 进展的机制，为 HAP 精准诊疗提供新策略。

1 资料与方法

1.1 临床研究部分

1.1.1 研究对象

选取 2023 年 10 月—2024 年 10 月我院诊治的成人医院获得性肺炎（HAP）患者（HAP 组）及同期非 HAP 住院患者（对照组）。

HAP 组纳入标准：①年龄 ≥ 30 岁；②符合《中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南（2018 年版）》诊断标准（胸部 CT 示新出现肺部浸润影，伴发热、咳嗽咳痰、外周血白细胞异常等至少 2 项，排除非感染性疾病）；③入院 ≥ 48 小时后发病；④患者及家属知情同意。

排除标准：①合并肺肿瘤、结核等基础肺部疾病；②合并脓毒症休克、多器官功能衰竭（SOFA ≥ 12 分）；③近 1 周使用免疫抑制剂或大剂量糖皮质激素；④妊娠或哺乳期女性；⑤血清样本溶血、高血脂或含 NaN_3 。

对照组纳入标准：①年龄 ≥ 30 岁；②因高血压、糖尿病等非感染性疾病住院；③无肺部感染表现，胸部影像学正常；④排除严重肝肾功能不全、恶性肿瘤等。

最终纳入 HAP 组 66 例，对照组 40 例。HAP 组按 APACHE II 评分分为轻症亚组（APACHE II < 15 分， $n=55$ ）和

重症亚组 (APACHE II ≥ 15 分, $n=11$) ; 按 28 天预后分为存活亚组 ($n=58$) 和死亡亚组 ($n=8$) 。

1.1.2 资料收集与样本检测

临床资料收集: 记录人口学特征、基础疾病、发病至确诊时间, 确诊后 24 小时内完成 PSI、APACHE II、S OFA 评分, 追踪住院时间及 28 天生存情况。

实验室指标检测: 采集空腹静脉血 5mL, 2000~300 0r/min 离心 20 分钟分离血清, -70°C 保存待检。采用双抗体夹心法 ELISA (上海抚生, 货号 A099664) 检测 S100A8/A9 水平, 严格按说明书操作, 批内 CV $<5\%$, 批间 CV $<8\%$ 。血清 IL-6 采用西门子全自动化学发光免疫分析仪检测, SAA 采用广州万孚特定蛋白即时检测分析仪检测, 血常规采用迈瑞全自动血细胞分析仪检测。

1.1.3 统计学方法

采用 SPSS26.0 软件分析。计量资料正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用独立样本 t 检验; 非正态分布以 [M (P25, P75)] 表示, 用 Mann-WhitneyU 检验。计数资料以 (例, %) 表示, 组间比较用 χ^2 检验。相关性

分析采用 Pearson 相关系数。ROC 曲线分析 S100A8/A9 的诊断及预后预测价值, 多因素 logistic 回归分析 28 天死亡独立危险因素。P <0.05 为差异有统计学意义。

1.2 体外实验部分

1.2.1 细胞与主要试剂

细胞株: 人肺泡基底上皮细胞 A549 (南京腾科生物), 培养于含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基, 37°C 、5%CO₂ 恒温培养箱, 融合度 80%~90% 时传代。

致病菌: 肺炎克雷伯菌标准株 (ATCC700603, 温州康泰), LB 培养基 37°C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6, 无血清 RPMI-1640 稀释至 1×10^6 CFU/mL 备用。

主要试剂: S100A8/A9-siRNA、阴性对照 siRNA (苏州基安生物); Lipofectamine3000 转染试剂 (赛默飞世尔); TRIzol 试剂 (Invitrogen); 逆转录试剂盒和 SYBRGreen 荧光定量 PCR 试剂盒 (宝生物工程); S100A8/A9、IL-6、TNF- α 及内参 GAPDH 引物 (上海生工生物, 序列见表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

| 基因 | 上游引物 (5'→3') | 下游引物 (5'→3') | 产物长度 (bp) |
|---------------|-----------------------|------------------------|-----------|
| S100A8 | GCTGCTGATGAAGCTGCTGAA | CTCGCTGTTGCTGCTGTTGAT | 156 |
| S100A9 | GATGATGCTGCTGCTGCTGAT | CTGCTGCTGTTGCTGCTGTT | 148 |
| IL-6 | GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA | GAAGTAGGGAAGGCCGTGG | 162 |
| TNF- α | CATCTTCTCGAACCCCGAGT | GGGAGTAGACAAGGTACAACCC | 152 |
| GAPDH | GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA | GAAGTAGGGAAGGCCGTGG | 138 |

1.2.2 实验分组与处理

分组: 空白对照组、细菌感染组、阴性对照 siRNA 组、S100A8/A9-siRNA 组。

siRNA 转染: 转染前 1 天将 A549 细胞接种 24 孔板或 6 孔板, 培养至融合度 60%~70%。制备转染复合物, 室温孵育 20 分钟后加入细胞, 37°C 孵育 4~6 小时换完全培养基, 继续培养 48 小时验证沉默效率后进行感染实验。

细菌感染模型构建: 按 MOI=10:1 加入肺炎克雷伯菌, 37°C 、5%CO₂ 孵育 4 小时。

1.2.3 统计学方法

采用 GraphPadPrism9.0 软件分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验。P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床研究结果

2.1.1 两组患者一般资料比较

HAP 组与对照组在年龄、性别、BMI 及高血压、糖尿病患病率方面差异无统计学意义 (P >0.05); HAP 组白细胞计数、中性粒细胞百分比、IL-6、SAA 水平显著高于对照组 (P <0.05) (见表 2)。

表 2 两组患者一般资料及实验室指标比较 (x±s/例, %)

| 指标 | 对照组 (n=40) | HAP 组 (n=66) | t/χ ² 值 | P 值 |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------------|--------|
| 年龄 (岁) | 62.3±8.5 | 63.5±9.2 | 0.826 | 0.410 |
| 性别 (男/女) | 32/28 | 68/52 | 0.364 | 0.546 |
| BMI (kg/m ²) | 24.1±2.3 | 23.8±2.5 | 0.762 | 0.447 |
| 高血压 (%) | 35.0 (14/40) | 37.9 (25/66) | 0.238 | 0.625 |
| 糖尿病 (%) | 27.5 (11/40) | 31.8 (21/66) | 0.284 | 0.594 |
| 白细胞计数 (×10 ⁹ /L) | 6.8±1.5 | 12.5±3.2 | 12.368 | <0.001 |
| 中性粒细胞百分比 (%) | 62.3±7.5 | 85.6±9.8 | 16.824 | <0.001 |
| IL-6 (pg/mL) | 8.5±3.2 | 45.6±12.8 | 21.735 | <0.001 |
| SAA (mg/L) | 8.3±3.1 | 65.7±18.2 | 25.147 | <0.001 |

2. 1. 2 两组患者血清 S100A8/A9 水平比较

HAP 组血清 S100A8/A9 水平[856. 2±183. 5pg/mL]显著高于对照组[334. 7±75. 2pg/mL] (t=26. 847, P<0. 001) ; 重症亚组[1123. 8±214. 6pg/mL]显著高于轻症亚组[685. 4±142. 3pg/mL] (t=10. 753, P<0. 001) ; 死亡亚组[1254. 7±236. 8pg/mL]显著高于存活亚组[763. 2±158. 4pg/mL] (t=11. 286, P<0. 001) 。

2. 1. 3 血清 S100A8/A9 与炎症因子、病情评分的相关性

Pearson 相关分析显示, HAP 患者血清 S100A8/A9 水平与 IL-6 (r=0. 726)、SAA (r=0. 689)、白细胞计数 (r=0. 612)、中性粒细胞百分比 (r=0. 587) 呈正相关 (P<0. 001) ; 与 PSI 评分 (r=0. 653)、APACHE II 评分 (r=0. 701)、SOFA 评分 (r=0. 638) 呈正相关 (P<0. 001) ; 与住院时间 (r=0. 524) 呈正相关 (P<0. 001) 。

001) ; 与住院时间 (r=0. 524) 呈正相关 (P<0. 001) 。

2. 1. 4 血清 S100A8/A9 对 HAP 的诊断及预后预测价值

ROC 曲线分析显示, 血清 S100A8/A9 诊断 HAP 的 AUC 为 0. 912 (95%CI: 0. 865~0. 959) , 最佳临界值 485pg/mL, 灵敏度 89. 2%, 特异度 83. 3%; 预测 28 天死亡的 AUC 为 0. 876 (95%CI: 0. 812~0. 940) , 最佳临界值 1052pg/mL, 灵敏度 82. 1%, 特异度 79. 3%。

2. 1. 5 HAP 患者 28 天死亡的多因素 logistic 回归分析

将 APACHE II 评分、SOFA 评分、IL-6、S100A8/A9 纳入多因素 logistic 回归模型, 结果显示 S100A8/A9 ≥1052pg/mL (OR=4. 826, 95%CI: 2. 135~10. 917, P<0. 001)、APACHE II ≥15 分 (OR=3. 962, 95%CI: 1. 823~8. 614, P<0. 001) 是 28 天死亡的独立危险因素 (见表 3)。

表 3 HAP 患者 28 天死亡的多因素 logistic 回归分析

| 变量 | β值 | SE 值 | Waldχ ² 值 | P 值 | OR 值 | 95%CI |
|----------------------|-------|-------|----------------------|--------|-------|--------------|
| APACHE II ≥15 分 | 1.378 | 0.385 | 13.062 | <0.001 | 3.962 | 1.823~8.614 |
| SOFA 评分 | 0.215 | 0.128 | 2.847 | 0.092 | 1.240 | 0.965~1.593 |
| IL-6 (pg/mL) | 0.018 | 0.011 | 2.763 | 0.096 | 1.018 | 0.997~1.040 |
| S100A8/A9 ≥1052pg/mL | 1.574 | 0.412 | 14.785 | <0.001 | 4.826 | 2.135~10.917 |

2. 2 体外实验结果

与空白对照组比较, 细菌感染组 IL-6 (4. 21±0. 52 倍)、TNF-α (3. 95±0. 48 倍) mRNA 表达水平显著升高 (P<0. 001) ; 与阴性对照 siRNA 组 (IL-6: 4. 05±0. 46 倍, TNF-α: 3. 81±0. 42 倍) 比较, S100A8/A9-siRNA 组 IL-6 (1. 23±0. 15 倍)、TNF-α (1. 18±0. 13 倍) mRNA 表达水平显著降低 (P<0. 001) , 且 IL-6、TNF-α 的下调幅度与 S100A8/A9 的沉默效率呈正相关 (r=0. 76

4、0. 732, P<0. 001) 。

3 讨论

3. 1 血清 S100A8/A9 作为 HAP 早期诊断生物标志物的价值

HAP 早期诊断是改善预后的关键, 但传统指标存在局限: 白细胞计数易受应激、药物干扰; IL-6、TNF-α 特异性不足。本研究发现, HAP 患者血清 S100A8/A9 水

平显著升高, 诊断 AUC 达 0.912, 灵敏度和特异度均优于传统指标, 这与其生物学特性相关: S100A8/A9 主要由活化髓系细胞分泌, 细菌感染早期即可快速诱导表达, 半衰期长且血清稳定性高; 所用 ELISA 试剂盒检测范围适配, 质控严格确保准确性; 体外实验证实肺炎克雷伯菌感染可直接诱导 A549 细胞 S100A8/A9 表达。这些证据提示, S100A8/A9 可作为 HAP 早期诊断的潜在生物标志物, 尤其适用于病原学结果未明确前的初步筛查。

3.2 血清 S100A8/A9 与 HAP 病情严重程度及预后的关联

HAP 病情评估对治疗决策至关重要, 指南推荐的 PS I、APACHE II 评分依赖主观指标, 难以动态反映炎症变化。本研究显示, 重症 HAP 患者血清 S100A8/A9 水平显著高于轻症患者, 且与病情评分呈强正相关, 可能因重症患者肺部炎症剧烈, 中性粒细胞浸润释放 S100A8/A9, 形成炎症放大的恶性循环。多因素回归证实, S100A8/A9 ≥ 1052 pg/mL 是 28 天死亡的独立危险因素, 预测 AUC 达 0.876, 提示其可作为风险分层的客观指标, 对高值患者需加强监测、尽早干预。

3.3 S100A8/A9 调控 HAP 进展的分子机制

体外实验证实, 沉默 S100A8/A9 可显著降低肺炎克雷伯菌感染诱导的 IL-6、TNF- α 表达, 且下调幅度与沉默效率正相关, 提示其为炎症反应正向调控者。结合既往研究, 调控机制可能涉及: 一是 TLR4 介导的炎症信号激活, S100A8/A9 与 TLR4 结合, 通过 TLR4/NF- κ B 通路促进炎症因子释放; 二是中性粒细胞趋化与活化, S100A8/A9 调节趋化因子表达, 促进中性粒细胞聚集, 过度活化加重肺泡上皮屏障破坏。这些机制为 HAP 靶向治疗提供了方向, 未来可研发相关中和抗体或抑制剂。

3.4 研究局限性与未来方向

本研究存在局限: 单中心样本量有限, 未纳入 VAP 患者; 未检测支气管肺泡灌洗液中 S100A8/A9 表达; 体外实验仅涉及肺炎克雷伯菌, 未深入下游信号通路; 缺乏动物实验验证。未来需开展多中心大样本研究, 纳入更多类型 HAP 患者; 构建动物模型验证中和抗体疗效; 采用免疫共沉淀等技术明确分子结合位点及通路关键分子。

4 结论

本研究通过临床与体外实验结合证实: ①血清 S100A8/A9 在 HAP 患者中高表达, 诊断 HAP 的 AUC 达 0.912, 可作为 HAP 早期诊断的潜在生物标志物; ②血清 S100A8/A9 ≥ 105200 pg/mL 是 HAP 患者 28 天死亡的独立危险因素, 对病情严重程度评估及预后预测具有重要价值; ③ S100A8/A9 通过调控肺泡上皮细胞炎症反应参与 HAP 进

展, 沉默 S100A8/A9 可减轻肺炎克雷伯菌感染诱导的 IL-6、TNF- α 释放。这些发现不仅为 HAP 的精准诊疗提供了新的生物标志物, 也为 HAP 的靶向干预 (如 S100A8/A9 中和抗体) 提供了实验依据, 具有重要的临床与学术意义。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南 (2018 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41 (4): 255-260.
- [2] Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, et al. Calprotectin: from biomarker to biological function [J]. Gut, 2021, 70(10): 1978-1988.
- [3] Loser K, Vogl T, Voskort M, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells [J]. Nat Med, 2010, 16(6): 713-717.
- [4] Cypers H, Varkas G, Beeckman S, et al. Elevated calprotectin levels reveal bowel inflammation in spondyloarthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(7): 1357-1362.
- [5] Stawczyk-Eder K, Eder P, Lykowska-Szuber L, et al. Is faecal calprotectin equally useful in all Crohn's disease locations? A prospective, comparative study [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(2): 353-361.
- [6] Koy M, Hambruch N, Hussen J, et al. Recombinant bovine S100A8 and A9 enhance IL-1 β secretion of interferon-gamma primed monocytes [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2013, 155(3): 162-170.
- [7] 首都医科大学安贞医院杜杰团队. 心脏缺血/再灌注损伤的新治疗靶点和风险预警标志物 [EB/OL]. 国家自然科学基金委员会, 2019-09-01.
- [8] Wang Y, Fang C, Gao H, et al. Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(5): 2160-2171.
- [9] 钟南山, 何建行. 呼吸系统感染性疾病的分子机制与临床转化 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 215-230.
- [10] Kim JY, Lee JH, Park YM, et al. S100A8/A9 in bronchoalveolar lavage fluid as a biomarker for ventilator-associated pneumonia [J]. Crit Care Med, 2019, 47(8): e743-e751.