

乳铁蛋白-DNA复合物检测评价 甲型H1N1重症流感患者血浆 中性粒细胞胞外诱捕网水平

杨晓宇¹ 张玥^{2,3} 麦维利¹ 李蕊^{2,3} 朱鏐变^{1,2,3} 韩俊燕^{2,3} 曾辉^{1,2,3}

【摘要】目的 建立乳铁蛋白-DNA复合物的相对定量检测方法, 评价甲型H1N1重症流感及其他病原体感染者血浆样本中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的含量。**方法** 将DNA含量明确的血浆样本进行梯度稀释作为标准品, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中乳铁蛋白-DNA复合物含量。采用乳铁蛋白-DNA ELISA方法比较19例甲型H1N1重症流感患者与19例献血者(对照组)血浆乳铁蛋白-DNA复合物含量差异。**结果** 甲型H1N1重症流感患者血浆中乳铁蛋白-DNA复合物水平与游离DNA(cfDNA)和组蛋白-DNA复合物水平均呈正相关($r=0.6763$ 、 $P<0.0001$, $r=0.7560$ 、 $P<0.0001$)。甲型H1N1重症流感患者血浆中乳铁蛋白-DNA复合物含量为 $[2.082(1.169, 5.021)] \mu\text{g/ml}$, 显著高于对照组 $[0.233(0.170, 0.376)] \mu\text{g/ml}$, 差异有统计学意义($P<0.0001$), 且乳铁蛋白-DNA复合物含量与甲型H1N1重症流感患者的急性生理与慢性健康评分(APACHE II评分)呈正相关($r=0.7379$ 、 $P=0.0005$)。**结论** 血浆乳铁蛋白-DNA复合物含量可用于评价甲型H1N1重症流感患者NETs水平。

【关键词】 甲型H1N1重症流感; 乳铁蛋白-DNA复合物; 中性粒细胞胞外诱捕网; 酶联免疫吸附法

Lactoferrin-DNA complex detection to evaluate plasma neutrophil extracellular traps of patients with severe influenza A (H1N1) Yang Xiaoyu¹, Zhang Yue^{2,3}, Mai Weili¹, Li Rui^{2,3}, Zhu Liuluan^{1,2,3}, Han Junyan^{2,3}, Zeng Hui^{1,2,3}.

¹Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; ²Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ³Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To establish a relative quantitative assay for lactoferrin-DNA complex, and to assess the levels of neutrophil extracellular traps (NETs) in plasma samples from patients with severe influenza A (H1N1) and other pathogen infectious diseases. **Methods** Plasma samples with clear DNA content were serially diluted as a standard, and the level of lactoferrin-DNA complex in plasma was determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The lactoferrin-DNA ELISA method was used to compare the difference of plasma lactoferrin-DNA complex between 19 patients with severe influenza A (H1N1) and 19 blood donors (control group). **Results** Level of plasma lactoferrin-DNA complex of patients in severe influenza A (H1N1) was positively correlated with that of cfDNA (cell-free DNA) and histone-DNA complex, respectively ($r=0.6763$, $P<0.0001$; $r=0.756$, $P<0.0001$). The plasma lactoferrin-DNA complex content in patients with severe influenza A (H1N1) was $2.082(1.169, 5.021) \mu\text{g/ml}$, which was significantly higher than that of the controls $[0.233(0.170, 0.376) \mu\text{g/ml}]$, $P<0.0001$, and positively correlated with Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II score (APACHE II score) ($r=0.7379$, $P=0.0005$). **Conclusion** Plasma lactoferrin-DNA complex level could be used to assess NETs level in patients with severe influenza A (H1N1).

【Key words】 Severe influenza A (H1N1); Lactoferrin-DNA complex; Neutrophil extracellular traps; Enzyme-linked immunosorbent assay

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.02.007

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81570372; No. 81501692)

作者单位: 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院¹; 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所²; 100015 北京, 新发突发传染病研究北京市重点实验室³

通信作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

近年研究发现,中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是造成组织损伤的重要机制之一^[1-4]。本课题组前期研究发现,甲型H1N1重症流感患者血浆NETs水平增高,粒细胞释放NETs的能力增强,且NETs含量与发生多器官功能衰竭的风险呈正相关^[5]。因此,需要建立准确、灵敏的NETs检测方法用于临床监测。

NETs是由DNA与组蛋白以及粒细胞特有的颗粒蛋白,如髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)及乳铁蛋白(lactoferrin)等形成的不规则网状结构复合物^[6]。因此,目前常用的液态样本中NETs的检测方法包括可溶性胞外游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)的绝对定量检测^[7-8]和NETs成分蛋白-DNA复合物的相对定量检测。参与NETs形成的蛋白质组份中,乳铁蛋白存在于粒细胞二级颗粒中,具有抗病毒的作用^[9-10]。虽然已建立了以乳铁蛋白作为NETs标记的免疫荧光法^[11],但该方法用于临床定量检测仍有局限性。因此,本研究拟在前期研究基础上,采用甲型H1N1重症流感患者血浆样本,建立乳铁蛋白-DNA复合物的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量检测方法,以研究甲型H1N1重症流感患者血浆中的乳铁蛋白-DNA复合物(NETs)与预后间的相关性,现报道如下。

材料和方法

一、材料

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits试剂盒购自Invitrogen公司; Cell Death Detection ELISA试剂盒(11544675001)购自Roche公司;抗乳铁蛋白抗体(ab92536)购自Abcam公司;美国Thermo公司Varioskan flash全波长多功能酶标仪。

二、方法

1. 样本来源:收集2009年10月至2010年1月期首都医科大学附属北京地坛医院收治的19例甲型H1N1重症流感患者的入院点血浆和19例献血者(对照组)血浆样本。入组患者均已签署知情同意书,所有标本的采集及应用符合本院伦理委员会决议。入组患者和健康志愿者的临床资料见表1。两组患者的年龄、性别均匹配,具有可比性。

病例均符合我国国家卫生健康委员会(原国家卫生部)制定的《甲型H1N1流感诊疗方案

(2009年第3版)》^[12]中诊断标准及危重症的分型标准。患者血浆样本使用PBS缓冲液依次稀释2、4、8、16、32倍,进行cfDNA及ELISA检测。

2. 游离DNA检测:采用Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits试剂盒检测样本血浆中游离DNA含量。按照试剂盒说明书稀释DNA标准品储液和样品,按50 μl/孔加入96孔黑底酶标板中,每孔加入50 μl稀释的PicoGreen®,标准品终浓度依次为1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml和0 ng/ml。室温避光2~5 min。用酶标仪检测荧光信号强度,激发光 $A_{480\text{ nm}}$,发射光 $A_{520\text{ nm}}$ 。为防止荧光淬灭尽快上机。

3. 乳铁蛋白-DNA和组蛋白-DNA ELISA:按Cell Death Detection ELISA试剂盒说明书中的步骤包被抗组蛋白抗体(1:9)、抗乳铁蛋白抗体(1:200)于96孔板,每孔100 μl,4℃孵育过夜。吸出包被液,加入200 μl孵育液室温封闭30 min。300 μl洗涤液洗板3遍后加入80 μl孵育液和20 μl样本进行吸附,混匀后室温孵育90 min。洗板3遍后,加入100 μl过氧化物酶POD偶联抗DNA抗体,室温孵育90 min。洗板3遍,加入100 μl过氧化物酶底物(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS)振荡显色。加入100 μl终止液终止反应后,采用酶标仪在405 nm检测吸光度。各样本与空白孔(未包被抗体)的吸光度差值作为矫正值。

将多个NETs含量较高的甲型H1N1重症流感患者血浆混合作为NETs标准品,将标准品的cfDNA浓度调整为2 000 ng/ml。此标准品可分装后冻存,用于不同批次间样本检测。将标准品倍比稀释为2 000 ng/ml、1 000 ng/ml、500 ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml和67.5 ng/ml,利用乳铁蛋白-DNA ELISA和组蛋白-DNA ELISA对标准品进行检测,对标准品DNA浓度与 $A_{405\text{ nm}}$ 值进行一元一次方程回归,回归方程的相关系数 R^2 应 > 0.99 。最后将倍比稀释样本的 $A_{405\text{ nm}}$ 值代入各自标准曲线计算出复合物中的DNA含量,进行绝对定量比较。

三、统计学处理

采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析及绘图,患者年龄、住院时间、入院前发热天数、血浆cfDNA及乳铁蛋白-DNA复合物水平为非正态分布,以中位数(四分位间距)表示;相关性分析采用非正态分布数据的Spearman相关性分析,两组间比较采用Mann-Whitney检验。以 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

结 果

一、建立乳铁蛋白-DNA复合物的ELISA检测方法

ELISA法在检测NETs时因缺乏蛋白质-DNA复合物标准品只能进行相对定量,且ELISA检测的吸光度值易受多种因素影响而波动,故本研究采用混合血浆作为NETs标准品,以消除实验中不稳定因素。利用乳铁蛋白-DNA ELISA检测系列稀释的标准品,以 $A_{405\text{ nm}}$ 值为横坐标,标准品DNA浓度为纵坐标,做拟合曲线, $R^2 = 0.9913$ (图1)。

二、乳铁蛋白-DNA ELISA与其他NETs检测方法比较

将19例甲型H1N1重症流感患者血浆样本进行倍比稀释,进行乳铁蛋白-DNA、组蛋白-DNA ELISA及cfDNA检测。经Spearman相关性分析,3

种检测方法结果具有相关性(乳铁蛋白-DNA复合物与cfDNA: $r = 0.6763$, $P < 0.0001$; 组蛋白-DNA复合物与cfDNA: $r = 0.5553$, $P < 0.0001$; 乳铁蛋白-DNA复合物与组蛋白-DNA复合物: $r = 0.7560$, $P < 0.0001$), 见图2。

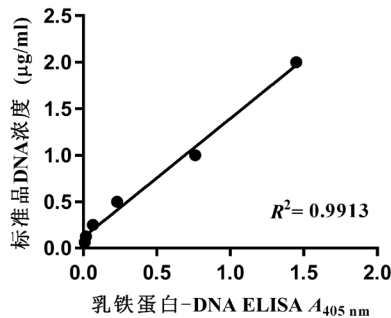
三、甲型H1N1重症流感患者与对照组血浆中乳铁蛋白-DNA复合物的含量

对照组患者血浆中cfDNA含量为 0.2352 ($0.2153, 0.2487$) $\mu\text{g/ml}$, 而甲型H1N1重症流感患者血浆cfDNA含量为 0.8246 ($0.7136, 1.724$) $\mu\text{g/ml}$, 差异具体显著统计学意义 ($P < 0.0001$, 图3A)。甲型H1N1重症流感患者血浆中乳铁蛋白-DNA复合物含量为 2.082 ($1.169, 5.021$) $\mu\text{g/ml}$, 显著高于对照组 0.233 ($0.170, 0.376$) $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.0001$, 图3B), 与cfDNA含量变化一致。同时, 甲型H1N1重症流感患者血浆乳铁蛋白-DNA复合物水平与APACHE II评分呈正相关 ($r = 0.7379$, $P = 0.0005$, 图3C)。

表1 对照组和甲型H1N1重症流感患者的临床资料

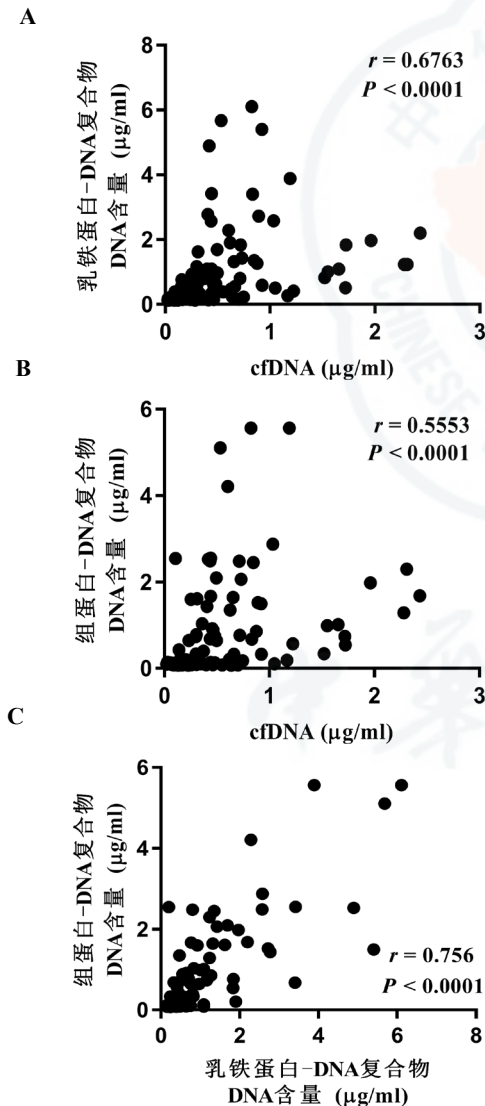
临床资料	对照组 (19例)	甲型H1N1重症流感患者 (19例)	统计量	P值
年龄(岁) ^a	37 (31, 65)	33 (25, 69)	$Z = -1.125$	0.261
男性[例(%)]	10 (52.6)	12 (63.2)	$\chi^2 = 0.432$	0.511
基础疾病[例(%)]				
呼吸系统疾病	1 (5.3)	1 (5.3)	$\chi^2 = 0.000$	1.000
高血压	2 (10.5)	7 (36.8)	$\chi^2 = 2.330$	0.127
糖尿病	0 (0.0)	5 (26.3)	$\chi^2 = 3.683$	0.055
心脏病	0 (0.0)	2 (10.5)	$\chi^2 = 0.528$	0.468
自身免疫性疾病	1 (5.3)	0 (0.0)	$\chi^2 = 0.000$	1.000
肝脏疾病	0 (0.0)	1 (5.3)	$\chi^2 = 0.000$	1.000
妊娠	0 (0.0)	0 (0.0)	—	—
病原微生物培养阳性[例(%)]				
细菌	0 (0.0)	10 (52.6)	$\chi^2 = 10.993$	0.001
真菌	0 (0.0)	4 (21.1)	$\chi^2 = 2.515$	0.113
细菌和真菌	0 (0.0)	2 (10.5)	$\chi^2 = 0.528$	0.468
住院时间 ^a	0 (0, 0)	8 (4, 13)	—	—
入院前发热天数 ^a	0 (0, 0)	3 (2, 7)	—	—
抗病毒治疗[例(%)]	0 (0.0)	19 (100.0)	$\chi^2 = 34.105$	< 0.001
抗菌药物治疗[例(%)]	0 (0.0)	19 (100.0)	$\chi^2 = 34.105$	0
糖皮质激素治疗[例(%)]	0 (0.0)	5 (26.3)	$\chi^2 = 3.683$	0.055
免疫调节治疗[例(%)]	0 (0.0)	0 (0.0)	—	—
中性粒细胞计数($\times 10^9/\text{L}$) ^a	3.1 (2.9, 3.6)	8.5 (4.2, 16.9)	$Z = -4.306$	< 0.001
APACHE II评分 ^a	—	12 (8, 17)	—	—
SOFA评分 ^a	—	8 (4, 9)	—	—

注: APACHE II评分: 急性生理与慢性健康评分 (acute physiological and chronic health evaluation II score); SOFA评分: 序贯器官衰竭评分 (sepsis-related organ failure assessment score); ^a: 中位数 (四分位间距)



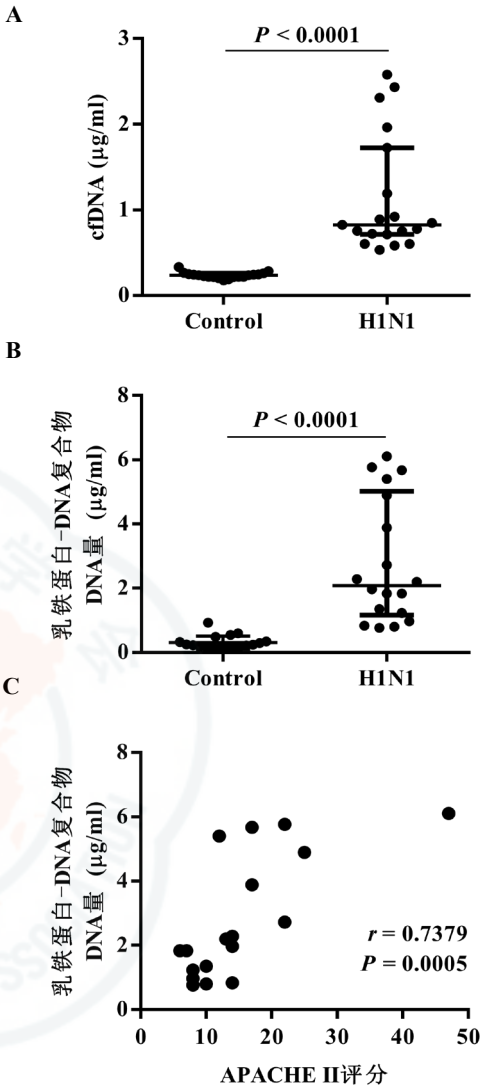
注：以标准品血浆的乳铁蛋白-DNA ELISA吸光度和该吸光度下对应的cfDNA浓度值绘制标准曲线

图1 乳铁蛋白-DNA ELISA检测方法的标准曲线



注：A：血浆乳铁蛋白-DNA复合物与cfDNA水平的相关性。B：血浆组蛋白-DNA复合物与cfDNA水平的相关性。C：血浆乳铁蛋白-DNA复合物与组蛋白-DNA复合物水平的相关性

图2 各种NETs检测方法间的相关性分析



注：A：对照组和甲型H1N1重症流感患者的血浆cfDNA水平。B：应用乳铁蛋白-DNA ELISA法检测对照组和甲型H1N1重症流感患者的血浆乳铁蛋白-DNA复合物中DNA含量，差异有统计学意义。全部数据采用中位数（四分位数间距）表示。C：甲型H1N1重症流感患者血浆乳铁蛋白-DNA水平与其APACHE II评分的相关性

图3 血浆乳铁蛋白-DNA复合物含量与疾病程度间的相关性

讨 论

甲型流感是由甲型流感病毒引起的急性呼吸道传染病，部分患者可进展为重症流感^[13]。虽然中性粒细胞可快速迁移到感染组织参与病原体的清除^[14-15]，但大量中性粒细胞浸润也可造成肺脏及其他器官损伤^[16]，与甲型H1N1重症流感患者呼吸功能衰竭甚至死亡密切相关。

近年来，关于NETs在流感及其他感染性疾病中的作用逐渐成为研究热点^[17-18]。血浆及感染部位的NETs水平可反映疾病严重程度，有助于判断疾病

预后^[19]。cfDNA通过荧光染料PicoGreen®特异性结合DNA,通过检测激发后的荧光强度来计算出样本中游离DNA的绝对含量,进而反映NETs水平^[20-21]。此方法方便、快速,可实现绝对定量。但血浆中cfDNA不仅来源于NETs,还可来源于坏死、凋亡的组织细胞等^[22-23]。因此,对血浆、支气管肺泡灌洗液、组织液等细胞成份复杂的样本,单纯采用上述方法,并不能准确反映NETs水平。

因NETs包含染色质DNA和粒细胞来源的蛋白质,故可采用ELISA法检测染色质组蛋白和粒细胞颗粒蛋白质-DNA复合物,如MPO-DNA、NE-DNA复合物,特异性地反映样本中NETs的含量。本课题组前期研究和其他文献已经建立了MPO-DNA和NE-DNA的ELISA检测方法^[24]。本研究通过对乳铁蛋白-DNA与组蛋白-DNA和cfDNA含量的相关性分析,证实乳铁蛋白-DNA ELISA法也可同组蛋白-DNA一样,作为甲型H1N1重型流感患者血浆NETs的相对定量检测方法($r = 0.7865$),由于不同病因诱导的NETs可能存在结构和组成成份差异,因此,需要采用多种指标对NETs进行检测分析。乳铁蛋白是NETs检测的重要补充,有助于准确判断NETs含量。在研究不同病原体感染相关疾病时,更有利于发现不同病原体活化NETs的特征性标志物。该方法是否可用于其他病原微生物感染等尚有待进一步研究。

本研究使用多个甲型H1N1重型流感患者的混合血浆作为标准品,以实现不同实验方法间的绝对定量比较。但在其他病原体感染者血浆中的NETs成分可能存在差异,目前缺乏通用的标准品。今后研究中如能构建复合物的标准品,将可实现ELISA的定量检测,不仅可真实地反映不同处理组间NETs水平差异,还可以应用于不同样本间的比较,扩大了应用范围。此外,因单一蛋白抗体并不能覆盖检测样本中所有游离NETs成分,如果将多种蛋白抗体共同作为捕获抗体,可能会提高检测的准确性。

目前ELISA检测NETs的方法主要采用双抗体夹心法,以各种蛋白质抗体作为捕获抗体、酶标DNA抗体作为检测抗体。而这种方法检测NETs中含量较低的蛋白质-DNA复合物时,因DNA含量远大于蛋白质含量,以抗-DNA作为检测抗体会缩小不同样本间差异。因此以抗-DNA作为捕获抗体,蛋白质抗体为检测抗体,可通过检测DNA纤维上

的蛋白质,更准确、灵敏地反映不同NETs蛋白质的含量差异。

APACHE II评分主要用于疾病严重程度的评估,是目前ICU常用的病情评价及预后预测方法^[25]。既往研究已表明甲型H1N1重型流感重症流感患者血浆cfDNA、MPO-DNA复合物升高,提示中性粒细胞释放NETs增多。本课题组采用患者入院时样本进行乳铁蛋白-DNA复合物检测,发现与疾病预后相关(与APACHE II评分呈正相关, $r = 0.7379$),故感染早期乳铁蛋白-DNA复合物含量升高可用于预后判断。但因无法取得感染更早期的样本,尚不明确该方法在早期诊断中的应用价值。甲型H1N1重型流感重症流感患者常并发或继发其他病原体感染,且疾病进展受年龄、基础疾病以及免疫状态等多种因素影响,故不同患者疾病进展差异显著,仅通过该方法或NETs的其他检测方法不能准确鉴别疾病分期。

本研究仅建立了用于NETs相对定量的乳铁蛋白-DNA复合物ELISA检测方法,并通过单中心19例甲型H1N1重型流感重症流感样本初步验证方法可靠性。但因样本数目少、来源单一,结果可能出现偏倚,后续研究将采用多中心研究,扩大样本量,充分验证该方法在甲型H1N1重型流感重症流感NETs检测中的准确性,及其疾病严重程度和预后判断中的作用。

参 考 文 献

- [1] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2661-2671.
- [2] Lefrancais E, Mallavia B, Zhuo H, et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e98178.
- [3] Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e148142.
- [4] Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps--the dark side of neutrophils[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1612-1620.
- [5] Zhu L, Liu L, Zhang Y, et al. High level of neutrophil extracellular traps correlates with poor prognosis of severe influenza A infection[J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(3): 428-437.
- [6] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(2): 134-147.
- [7] Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, et al. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: A prospective observational cohort study[J]. *Ann Surg*, 2017, 265(6): 1241-1249.
- [8] Vong L, Sherman PM, Glogauer M. Quantification and visualization of neutrophil extracellular traps (NETs) from murine bone

- marrow-derived neutrophils[M]//Allen IC. Methods in Molecular Biology: Mouse Models of Innate Immunity. New Jersey: Humana Press,2013,1031:41-50.
- [9] van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, et al. Antiviral activities of lactoferrin[J]. Antiviral Res,2001,52(3):225-239.
- [10] Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, et al. Lactoferrin for prevention of common viral infections[J]. J Infect Chemother,2014,20(11):666-671.
- [11] Sivanandham R, Brocca-Cofano E, Krampe N, et al. Neutrophil extracellular trap production contributes to pathogenesis in SIV-infected nonhuman primates[J]. J Clin Invest,2018,128(11):5178-5183.
- [12] 钟南山, 李兰娟, 王辰, 等. 甲型H1N1流感诊疗方案(2009年第3版)[J]. 中华医学杂志,2009,89(45):559.
- [13] Paules C, Subbarao K. Influenza[J]. Lancet,2017,390(10095):697-708.
- [14] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity[J]. Nat Rev Immunol,2011,11(8):519-531.
- [15] Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils[J]. Annu Rev Pathol,2014,9:181-218.
- [16] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Invest,2012,122(8):2731-2740.
- [17] Porto BN, Stein RT. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?[J]. Front Immunol,2016,7:311.
- [18] Narayana MA, Narasaraju T, Rai P, et al. In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection[J]. Front Immunol,2013,4:56.
- [19] Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis[J]. Am J Pathol,2011,179(1):199-210.
- [20] Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock[J]. Crit Care,2018,22(1):176.
- [21] 朱鏐变, 张玥, 李国力, 等. 建立体外诱导和检测中性粒细胞胞外诱捕网的方法[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015(3):405-408.
- [22] Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, et al. Origin of circulating free DNA in sepsis: analysis of the CLP mouse model[J]. Mediat Inflamm,2015,2015:1-9.
- [23] Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables[J]. Clin Chim Acta,2015,450:243-253.
- [24] Yoo DG, Floyd M, Winn M, et al. NET formation induced by Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes[J]. Immunol Lett,2014,160(2):186-194.
- [25] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system[J]. Crit Care Med,1985,13(10):818-829.

(收稿日期: 2018-10-19)

(本文编辑: 孙荣华)

杨晓宇, 张玥, 麦维利, 等. 乳铁蛋白-DNA复合物检测评价甲型H1N1重症流感患者血浆中性粒细胞胞外诱捕网水平[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2019,13(2):122-127.