论著·临床研究

肺炎支原体肺炎 NLRP3 炎症小体通路的表达及意义

房有福 李娜

(潍坊医学院附属益都中心医院儿内二科, 山东 青州 262500)

[摘要] **目的** 探讨肺炎支原体肺炎(MPP)患儿NLRP3炎症小体通路的表达及意义。**方法** 147例MPP患儿根据病情分为轻症组($n=83$)和重症组($n=64$),根据病程分为急性期($n=77$)和恢复期($n=70$)组,同期选取健康儿童50例作为对照组。实时荧光定量PCR技术检测外周血NLRP3、ASC和caspase-1基因表达,酶联免疫吸附试验检测血清IL-1 β 和IL-18水平。**结果** MPP患儿外周血NLRP3、ASC和caspase-1 mRNA的表达量均高于对照组($P<0.05$),IL-1 β 和IL-18水平也高于对照组($P<0.05$)。轻症和重症MPP患儿的NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA表达量以及IL-1 β 、IL-18水平均高于对照组,以重症组更高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。MPP患儿急性期和恢复期的NLRP3、ASC和caspase-1 mRNA表达量以及IL-1 β 、IL-18水平均高于对照组,以急性期更高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。NLRP3与ASC mRNA、caspase-1 mRNA表达量以及IL-1 β 、IL-18水平均呈正相关($r=0.701$ 、 0.717 、 0.676 和 0.645 , $P<0.05$)。**结论** NLRP3炎症小体通路可能参与了MPP发病过程,与病情严重程度及病程密切相关。**[中国当代儿科杂志, 2018, 20(9): 742-745]**

[关键词] 肺炎支原体肺炎; NLRP3炎症小体; 儿童

Change in the expression of the NLRP3 inflammasome signaling pathway in peripheral blood and its significance in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia

FANG You-Fu, LI Na. Second Department of Internal Medicine, Yidu Central Hospital, Weifang Medical College, Qingzhou, Shandong 262500, China (Email: fyf888@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of the NLRP3 inflammasome signaling pathway in peripheral blood and its significance in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP). **Methods** According to the severity, 147 children with MPP were divided into mild group with 83 children and severe group with 64 children. According to the stage of disease, the children were divided into acute group with 77 children and recovery stage with 70 children. A total of 50 healthy children were enrolled as the control group. Quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of NLRP3, ASC, and caspase-1. ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18). **Results** Compared with the control group, the children with MPP had significantly higher relative mRNA expression levels of NLRP3, ASC, and caspase-1 in peripheral blood and serum levels of IL-1 β and IL-18 ($P<0.05$). Compared with the control group, both mild and severe groups had significantly higher relative mRNA expression levels of NLRP3, ASC, and caspase-1 in peripheral blood and serum levels of IL-1 β and IL-18 ($P<0.05$). The severe group had significantly higher levels of above mentioned parameters than the mild group ($P<0.05$). Both acute group and recovery group had significantly higher relative mRNA expression levels of NLRP3, ASC, and caspase-1 in peripheral blood and serum levels of IL-1 β and IL-18 than the control group ($P<0.05$). The acute group had significantly higher levels of above mentioned parameters than the recovery group ($P<0.05$). The relative expression level of NLRP3 was positively correlated with the relative mRNA expression levels of ASC and caspase-1 and the serum levels of IL-1 β and IL-18 ($r=0.701$, 0.717 , 0.676 , and 0.645 respectively; $P<0.05$). **Conclusions** The NLRP3 inflammasome signaling pathway might be involved in the pathogenesis of MPP in children and is closely associated with the severity and course of the disease. **[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(9): 742-745]**

Key words: Mycoplasma pneumoniae pneumonia; NLRP3 inflammasome; Child

肺炎支原体肺炎 (mycoplasmal pneumoniae pneumonia, MPP) 是儿童常见的非典型肺炎, 近年来发病率不断升高, 临床症状多样, 急性发作期若得不到及时治疗, 可导致呼吸系统及其他多个系统严重损伤, 甚至发生多器官功能障碍综合征^[1-2]。研究^[3]表明, MPP 发病机制较为复杂, 肺炎支原体导致的肺泡上皮细胞直接损伤或免疫炎症反应起着重要作用。NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 作为机体固有免疫系统的重要感受器, 在激发及调控炎症反应中发挥关键性作用^[4-5]。NLRP3 与接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis associated speck-like protein, ASC)、半胱天冬酶 1 (caspase-1) 结合后形成炎症小体, 通过调控 caspase-1 活化, 促进白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 及 IL-18 等炎症因子成熟、释放, 发挥促炎作用^[6]。本研究拟分析 MPP 患儿外周血 NLRP3 炎症小体通路表达变化, 探讨其与 MPP 病情的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 3 月至 2017 年 12 月益都中心医院治疗的 MPP 患儿 147 例为研究对象, 其中男性 86 例、女性 61 例, 年龄 2~12 岁, 平均 6.5 ± 1.9 岁。MPP 诊断符合《诸福棠实用儿科学》相关标准^[7]。排除合并自身免疫性疾病、原发性免疫缺陷、恶性肿瘤、其他急慢性感染, 以及近 30d 使用过激素及免疫调节剂者。根据 MPP 患儿病情严重程度分为轻症组 (83 例) 和重症组 (64 例)。重症 MPP 诊断^[8]需要符合以下至少 1 条: (1) 大环内酯类抗生素治疗 7d 仍有咳嗽、发热或者症状加重; (2) 影像学检查示单侧或双侧大片状、高密度实变影, 且有大量或中量胸腔积液, 甚至弥散性肺间质浸润或坏死性肺炎表现; (3) 出现严重的低氧血症或中枢神经系统症状、心肌炎、肾功能衰竭、消化道出血等。MPP 急性期、恢复期判断根据《诸福棠实用儿科学》标准^[7]: (1) 急性期: 病程在 10d 以内, 白细胞总数和 C 反应蛋白轻度升高, 血清 MP-IgM 抗体阳性, 胸部影像学检查示双肺纹理粗、肺门影增大; (2) 恢复期: 咳嗽、咳痰以及肺部体征等消失或减轻, 胸部影像学异常消失

或减轻, 体温正常 2 周以上。147 例中急性期 77 例、恢复期 70 例。以本院体检中心健康体检儿童 50 例作为对照组, 均排除免疫系统疾病, 以及过敏性疾病、呼吸道急慢性感染, 男性 28 例、女性 22 例, 平均 6.4 ± 1.8 岁, 与 MPP 患儿在性别、年龄的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究通过医院伦理委员会批准, 以及研究对象知情同意。

1.2 标本采集

MPP 患儿于入院次日、对照组于体检当日抽取空腹静脉血 10 mL 分装于 EDTA 抗凝管和非抗凝管。抗凝管取血清, 加入等体积 PBS 吹打、混匀, 再加入等体积人淋巴细胞分离液 (购自上海研谨生物科技有限公司), 2000 r/min 离心 15 min, 留取单个核细胞层, 加入 5 倍体积 PBS 洗涤后离心留取沉淀, 保存于 -80°C 冰箱以备用。非抗凝血于 3500 r/min 离心 15 min, 取上清, 保存于 -70°C 冰箱。

1.3 实时荧光定量 PCR 技术检测 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 表达

取单个核细胞, 加入细胞裂解液, 按 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (购自美国 Invitrogen 公司) 说明提取总 RNA, 使用紫外分光光度计对总 RNA 纯度和浓度进行检测, 以 A260/A280 在 1.80~2.20 为合格。按逆转录试剂盒 (大连宝生物公司) 说明将总 RNA 合成 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪 (购自美国 ABI 公司), 按照 PCR 扩增试剂盒 (大连宝生物公司) 说明进行扩增。引物序列: NLRP3 上游: 5'-TCTGTTCATTGGCTGCGGAT-3', 下游: 5'-GCCTTTTTCGAACCTTGCCGT-3'; ASC 上游: 5'-GCTGCAGATGGACCCCATAG-3', 下游: 5'-ACATTGTGAGCTCCAAGCCA-3'; caspase-1 上游: 5'-CACGAGACCTGT GCGATCAT-3', 下游: 5'-CTTGAGGGAA CCACTCGGTC-3'; β -actin 上游: 5'-TGTCACCAA CTGGGACGATA-3', 下游: 5'-GGGGTGTGAAGG TCTCAA-3'。PCR 反应条件: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 45 s, 连续循环 38 次, 每个样品设 3 个平行复孔。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算外周血 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 相对表达量。

1.4 酶联免疫吸附试验检测 IL-1 β 和 IL-18 水平

取血清, 利用 ELISA 法检测 IL-1 β 和 IL-18 水平。试剂盒均购自上海研域化学试剂公司。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行数据处理。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的比较采用两样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP 患儿和对照组 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 表达以及 IL-1β、IL-18 水平比较

MPP 患儿外周血 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 的表达量, 以及 IL-1β 和 IL-18 水平均高于对照组 (P<0.05), 见表 1、2。

表 1 肺炎支原体肺炎患儿和对照组的 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	caspase-1 mRNA
对照组	50	1.16 ± 0.10	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.05
MPP 患儿	147	1.91 ± 0.27	1.63 ± 0.24	1.70 ± 0.23
<i>t</i> 值		19.091	17.093	18.497
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 2 MPP 患儿和对照组的 IL-1β 和 IL-18 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1β	IL-18
对照组	50	2.7 ± 1.1	107 ± 14
MPP 患儿	147	6.7 ± 2.1	178 ± 33
<i>t</i> 值		13.142	14.656
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

2.2 不同严重程度 MPP 患儿 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达, 以及 IL-1β 和 IL-18 水平的比较

轻症、重症 MPP 患儿 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 表达量以及 IL-1β、IL-18 水平均高于对照组, 以重症组更高, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。见表 3、4。

2.3 急性期、恢复期患儿的 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达以及 IL-1β、IL-18 水平比较

MPP 患儿急性期、恢复期的 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 表达量以及 IL-1β、IL-18 水平均高于对照组, 以急性期更高, 差异均有统计学意义 (P<0.05), 见表 5、6。

表 3 不同严重程度 MPP 患儿 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	caspase-1 mRNA
对照组	50	1.16 ± 0.10	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.05
轻症组	83	1.72 ± 0.13 ^a	1.45 ± 0.10 ^a	1.51 ± 0.09 ^a
重症组	64	2.17 ± 0.18 ^{ab}	1.86 ± 0.15 ^{ab}	1.94 ± 0.12 ^{ab}
<i>F</i> 值		710.769	713.530	1193.426
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与轻症组比较, P<0.05。

表 4 不同严重程度 MPP 患儿 IL-1β、IL-18 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1β	IL-18
对照组	50	2.7 ± 1.1	107 ± 14
轻症组	83	5.3 ± 1.2 ^a	154 ± 15 ^a
重症组	64	8.6 ± 1.3 ^{ab}	209 ± 23 ^{ab}
<i>F</i> 值		338.189	484.030
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与轻症组比较, P<0.05。

表 5 急性期、恢复期患儿的 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	caspase-1 mRNA
对照组	50	1.16 ± 0.10	1.04 ± 0.08	1.08 ± 0.05
急性期	77	2.04 ± 0.19 ^{ab}	1.79 ± 0.17 ^{ab}	1.91 ± 0.16 ^{ab}
恢复期	70	1.78 ± 0.17 ^a	1.51 ± 0.12 ^a	1.51 ± 0.10 ^a
<i>F</i> 值		453.903	451.097	762.161
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与恢复期比较, P<0.05。

表 6 急性期、恢复期患儿的 IL-1β 和 IL-18 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1β	IL-18
对照组	50	2.7 ± 1.1	107 ± 14
急性期	77	7.9 ± 1.8 ^{ab}	190 ± 35 ^{ab}
恢复期	70	5.3 ± 1.6 ^a	163 ± 33 ^a
<i>F</i> 值		174.663	117.874
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, P<0.05; b 示与恢复期比较, P<0.05。

2.4 NLRP3 的 mRNA 表达与 ASC、caspase-1 的 mRNA 表达及 IL-1β、IL-18 水平的相关性

Pearson 相关分析显示, MPP 患儿 NLRP3 mRNA 表达与 ASC、caspase-1 的 mRNA 表达以及 IL-1β、IL-18 水平均呈正相关 ($r=0.701$ 、 0.717 、 0.676)。

和 0.645, $P < 0.05$)。

3 讨论

MPP以肺间质和支气管急性炎症为主要病变,但也可能累及多个器官和系统,出现肺外并发症,严重者甚至危及患儿生命^[9-10]。有研究^[11]指出,快速、有效的评估MPP病情,对指导治疗改善患儿预后具有重要意义。目前,MPP致病机制尚未完全清楚,有研究指出,过度的免疫和炎症反应可能是MPP特别是难治性MPP发生的主要因素^[12]。固有免疫是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线,模式识别受体作为固有免疫反应中代表性的免疫受体,识别入侵机体的病原微生物并相互作用而活化下游信号通路,引发机体免疫应答和炎症反应^[13]。NOD样受体是细胞内主要的模式识别受体,NLRP3则是主要的NOD样受体类型,活化后可与ASC及caspase-1组成NLRP3炎症小体,在炎症反应中发挥核心作用^[14]。有研究^[15]指出,NLRP3炎症小体在肺结核、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等发病机制中发挥重要作用。本研究显示,MPP患儿外周血NLRP3、ASC和caspase-1 mRNA表达量均高于对照组,提示NLRP3炎症小体可能参与了MPP发病过程。

机体中NLRP3炎症小体一旦受到病原微生物或内源性危险信号激活,则促进下游IL-1 β 和IL-18等促炎因子大量成熟并分泌到细胞外,进而使IL-1 α 、IL-6、TNF- α 等炎症因子活化而导致机体过度炎症反应^[16]。本研究还显示,MPP患儿IL-1 β 和IL-18水平也高于对照组,且NLRP3 mRNA表达与ASC、caspase-1的mRNA表达以及IL-1 β 、IL-18水平均呈正相关,进一步说明NLRP3炎症小体介导的炎症反应可能参与MPP发病。而且本研究重症或者急性期患儿NLRP3、ASC和caspase-1的mRNA表达量及IL-1 β 和IL-18水平高于轻症组和恢复期患儿,提示NLRP3炎症小体可能与MPP患儿病情严重程度以及病程有关,有望成为评估MPP患儿病情和疾病进程的指标。

综上所述,MPP患儿NLRP3炎症小体通路的表达发生改变,与病情严重程度及病程进展有关,有望成为评估MPP患儿病情及病程的辅助指标。

[参 考 文 献]

- [1] 许沙沙,郭连峰,吴妍,等. 儿童肺炎支原体肺炎临床特征和流行病学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(14): 3307-3310.
- [2] Waites KB, Xiao L, Liu Y, et al. Mycoplasma pneumoniae from the respiratory tract and beyond[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(3):747-809.
- [3] Wang J, Cheng W, Wang Z, et al. ATF3 inhibits the inflammation induced by mycoplasma pneumonia in vitro and in vivo[J]. Pediatr Pulmonol, 2017, 52(9): 1163-1170.
- [4] Son S, Hwang I, Han SH, et al. Advanced glycation end products impair NLRP3 inflammasome-mediated innate immune responses in macrophages[J]. J Biol Chem, 2017, 292(50): 20437-20448.
- [5] Jhang JJ, Lin JH, Yen GC. Beneficial properties of phytochemicals on NLRP3 inflammasome-mediated gout and complication[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(4): 765-772.
- [6] Hajipour E, Mashayekhi FJ, Mosayebi G, et al. Resveratrol decreases apoptosis and NLRP3 complex expressions in experimental varicocele rat model[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(2): 225-229.
- [7] 胡亚美,江载芳,申昆玲. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2015: 1281.
- [8] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 《中华儿科杂志》编委会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [9] 陈其芬,张亦维. 布拉氏酵母菌散剂联合阿奇霉素序贯治疗肺炎支原体肺炎继发腹泻患儿的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(2): 116-120.
- [10] Huang L, Chen H, Peng S. Spontaneous pneumomediastinum, emphysema, and pulmonary bullae associated with refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia in a child[J]. Pediatr Pulmonol, 2017, 52(10): E77-E80.
- [11] 拜世英,马艳红. 儿童肺炎支原体肺炎并发血栓形成的早期识别和诊治[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(10): 792-795.
- [12] 杨香红,李艳莉,罗春玉. 肺炎支原体肺炎患儿免疫功能的变化及其与病情程度和疾病分期的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(7): 113-116.
- [13] Bouças AP, de Souza BM, Bauer AC, et al. Role of innate immunity in preeclampsia: A systematic review[J]. Reprod Sci, 2017, 24(10): 1362-1370.
- [14] Patel S. Inflammasomes, the cardinal pathology mediators are activated by pathogens, allergens and mutagens: A critical review with focus on NLRP3[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92(8): 819-825.
- [15] 王金凤,刘晓菊,曾晓丽. NLRP3炎症小体与肺部疾病[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(2): 115-118.
- [16] Dai X, Tohyama M, Murakami M, et al. Epidermal keratinocytes sense dsRNA via the NLRP3 inflammasome, mediating interleukin (IL)-1 β and IL-18 release[J]. Exp Dermatol, 2017, 26(10): 904-911.

(本文编辑: 俞燕)