

• 论 著 •

肺炎支原体肺炎患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化
及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系研究^{*}

梁 淳,尹 蕾,田 伟

河北省邯郸市中心医院检验科,河北邯郸 056008

摘 要:**目的** 研究肺炎支原体肺炎(MPP)患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系。**方法** 选取 2017 年 2 月至 2019 年 2 月该院收治的 MPP 患儿 120 例(观察组)及在该院体检的健康儿童 120 例(对照组)为研究对象,检测并比较 2 组血浆 miR-223、miR-21、外周血 T 淋巴细胞亚群、血清白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,采用 Pearson 相关进行相关性分析。**结果** 观察组血浆 miR-223、miR-21 及血清 IL-6、IL-8、TNF- α 水平高于对照组,而外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Pearson 相关分析显示,观察组血浆 miR-223、miR-21 水平与外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关($P<0.05$),而与血清 IL-6、IL-8、TNF- α 水平呈正相关($P<0.05$)。**结论** MPP 患儿血浆 miR-223、miR-21 水平较高,且与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子密切相关。

关键词:肺炎支原体肺炎; miR-223; miR-21; 炎症因子; T 淋巴细胞亚群

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2021. 03. 005 **中图法分类号:**R563. 1;R446

文章编号:1673-4130(2021)03-0274-04 **文献标志码:**A

Changes of plasma miR-223 and miR-21 levels in children with
Mycoplasma pneumoniae pneumonia and their relationship with
T lymphocyte subsets and inflammatory factors^{*}

LIANG Chun, YIN Lei, TIAN Wei

Department of Clinical Laboratory, Handan Central Hospital of Hebei
Province, Handan, Hebei 056008, China

Abstract:**Objective** To study the changes of plasma miR-223 and miR-21 levels in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) and their relationship with T lymphocyte subsets and inflammatory factors.**Methods** Totally 120 MPP children (observation group) and 120 healthy children (control group) in the hospital from February 2017 to February 2019 were selected as the research objects. The levels of plasma miR-223, miR-21, peripheral blood T lymphocyte subsets, interleukin (IL)-6, IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected and compared between the two groups. Pearson correlation was used for correlation analysis.**Results** The levels of plasma miR-223, miR-21 and serum IL-6, IL-8, TNF- α in the observation group were higher than those in the control group, while the peripheral blood CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte and CD4⁺/CD8⁺ were lower than those in the control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that, plasma miR-223 and miR-21 in observation group were negatively correlated with peripheral blood CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte and CD4⁺/CD8⁺ ($P<0.05$), positively correlated with serum IL-6, IL-8 and TNF- α ($P<0.05$).**Conclusion** The plasma levels of miR-223 and miR-21 were higher in MPP children, which were closely related to T lymphocyte subsets and inflammatory factors.

Key words: Mycoplasma pneumoniae pneumonia; miR-223; miR-21; inflammatory factors; T lymphocyte subsets

肺炎支原体肺炎(MPP)是儿童临床上常见的获得性肺炎之一,潜伏期较长^[1-2]。因 MPP 发病早期隐匿,且复发率高,久治不愈,如未及时治疗,易威胁患儿生命^[3]。微小 RNA(miRNA)是新发现的一类非编

^{*} 基金项目:河北省 2017 年度医学科学研究重点课题计划项目(20171432)。
作者简介:梁淳,女,主管技师,主要从事生化检验研究。
本文引用格式:梁淳,尹蕾,田伟.肺炎支原体肺炎患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系研究[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(3):274-277.

码 RNA,在不同疾病人群中,血浆 miRNA 表达存在明显差异^[4]。有研究显示,T 淋巴细胞可激活机体免疫系统维持免疫功能平衡,而炎症因子可激活炎性反应,两者均可能参与了 MPP 的发生、发展^[5]。与血清检测比较,血浆标本检查前放置的时间相对较短,可有效避免外界因素对检测结果造成的干扰,并节约检测时间。本文主要研究 MPP 患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2017 年 2 月至 2019 年 2 月收治的 MPP 患儿 120 例作为观察组,其中男 67 例,女 53 例;年龄 5~14 岁,平均(10.80±2.55)岁。纳入标准:(1)所有 MPP 患儿均与《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 版)》^[6]中所制订的 MPP 相关诊断标准相符;(2)无哮喘、心肌炎及心包炎等其他相关炎症疾病;(3)入院前尚未接受相关治疗。排除标准:(1)伴有其他常见呼吸系统疾病;(2)存在免疫缺陷;(3)临床病历资料缺失。另取同期于本院进行体检的健康儿童 120 例作为对照组,其中男 69 例,女 51 例;年龄 5~15 岁,平均(10.84±2.58)岁。2 组儿童年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有受试者家属均在知情同意书上签字,本研究获得医院伦理委员会审批通过。

1.2 研究方法 (1)采用实时荧光定量 PCR 法检测血浆 miR-223、miR-21 水平。首先采用血浆总 RNA 提取试剂盒(购自德国 Qiagen 公司)进行血浆总 RNA 的提取,并进行纯化。紫外分光光度计测定 260 nm 的吸光度(A)值,计算 RNA 浓度,控制其处于 0.15~1.00。随后进行反转录,严格按照 miScript II 反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA。总反应体系为 20 μ L,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 60 min、95 $^{\circ}$ C 5 min。采用无酶水稀释后保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。由德国 Qiagen 公司设计合成相关引物,根据 miScript SYBR Green Kit 说明书完成反应混合物的配制,每个反应体系为 15 μ L,采用罗氏 LightCycler480 II 荧光定量 PCR 仪检测,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 预激活 15 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 45 个循环。每个反应孔均设置 3 个复孔,以内参实现归一化。miR-223 上游引物:5'-CAG AAA GCC CAA TTC CAT CT-3';下游引物:5'-GGG

CAA ATG GAT ACC ATA CC-3'。miR-21 上游引物:5'-ACA CTC CAG CTG GGT AGC TTA TCA GAC TGA-3';下游引物:5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GT-3'。待测 miRNA 水平采用相对定量软件 Ver1.0 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算获得。(2)以流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群水平。分别取 2 组儿童的外周血标本 100 μ L,加入试剂混匀后放置在避光室温条件下进行时长为 30 min 的孵育,随后加入红细胞裂解液进行红细胞的裂解,以 PBS 清洗,控制细胞浓度为 1×10^6 个/mL,采用流式细胞仪收集细胞,并完成 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的检测及 CD4⁺/CD8⁺ 的计算。(3)采用酶联免疫吸附试验法检测血清白细胞介素(IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,分别于入院后第 2 天清晨采集观察组儿童空腹状态下及对照组儿童体检时静脉血 5 mL,以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,置于冰箱中保存备用,操作严格遵从相关试剂盒说明书完成,试剂盒均购自武汉博士德生物科技有限公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;观察组患儿血浆 miR-223、miR-21 水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系采用 Pearson 相关进行相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组儿童血浆 miR-223、miR-21 水平比较 观察组儿童血浆 miR-223、miR-21 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 2 组儿童血浆 miR-223、miR-21 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-223	miR-21
观察组	120	12.36±7.52	6.24±3.14
对照组	120	5.56±3.16	4.71±2.58
<i>t</i>		9.132	4.124
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.2 2 组儿童外周血 T 淋巴细胞亚群水平比较 观察组儿童外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平均显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。2 组儿童外周血 T 淋巴细胞的检测结果见图 1。

表 2 2 组患儿外周血 T 淋巴细胞亚群水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
观察组	120	37.25±8.35	18.59±5.36	18.01±6.02	1.03±0.36
对照组	120	42.44±7.61	27.48±7.18	21.81±6.49	1.26±0.48
<i>t</i>		5.032	10.869	4.702	4.199
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 2 组儿童血清炎症因子水平比较 观察组儿童血清 IL-6、IL-8、TNF-α 水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 观察组患儿血浆 miR-223、miR-21 水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,观察组患儿血浆 miR-223、miR-21 水平与外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关($P<0.05$);而与血清 IL-6、IL-8、TNF-α 水平呈正相关($P<0.05$)。见表 4。

表 3 2 组儿童血清炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	n	IL-6	IL-8	TNF-α
观察组	120	57.22±14.01	66.83±24.52	21.94±9.22
对照组	120	14.28±3.69	40.87±18.02	8.57±2.51
t		32.468	9.345	14.269
P		<0.001	<0.001	<0.001

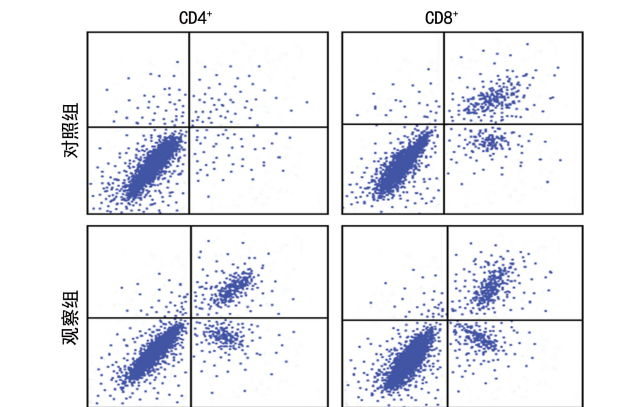


图 1 2 组儿童外周血 T 淋巴细胞的检测结果

表 4 观察组患儿血浆 miR-223、miR-21 水平与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的相关性分析

相关指标	miR-223		miR-21	
	r	P	r	P
CD3 ⁺	-0.623	<0.001	-0.682	<0.001
CD4 ⁺	-0.693	<0.001	-0.635	<0.001
CD8 ⁺	-0.611	0.001	-0.595	0.006
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-0.648	<0.001	-0.672	<0.001
IL-6	0.623	<0.001	0.681	<0.001
IL-8	0.646	<0.001	0.624	<0.001
TNF-α	0.681	<0.001	0.619	<0.001

3 讨 论

MPP 是一种多发生于 5~15 岁儿童肺炎支原体(MP)感染的流行病,若不进行及时、有效的干预,随着病情的不断进展可能引发患儿免疫功能紊乱,同时可能导致心、肝、肾、脑等多器官损伤,对患儿的生命健康安全造成极大威胁^[7-9]。随着近年来相关研究的不断深入,越来越多的研究报道证实体液免疫及细胞免疫中的大量炎症因子均介导了 MP 的发病过

程^[10-12]。患儿因自身免疫系统发育尚未完善,炎症因子在 MP 感染过程中的免疫机制、炎性反应发生机制仍存在一定的争议,需进一步研究探讨。miRNA 是一种可有效调节真核细胞基因表达的单链小片段 RNA,具有调控炎症因子及介质表达的作用^[13-14]。miR-223、miR-21 是近年来所发现的新型 miRNA,可通过对下游 IL-6、IL-10 等炎症因子的表达产生影响,进一步促进相关疾病的发生、发展。相关研究报道显示,miR-223 在食管癌患者外周血中表达显著上调^[15],而 miR-21 在肺癌患者外周血中表达明显上调^[16],因此,笔者推测两者可能参与了恶性肿瘤的发生、发展过程。本文通过研究 MPP 患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系,旨在为 MPP 患儿的诊治提供新的思路和靶点。

本研究结果显示,观察组儿童血浆 miR-223、miR-21 水平显著高于对照组,提示随着血浆 miR-223、miR-21 水平的不断升高,MPP 发生风险随之升高。分析原因,笔者认为 miR-223、miR-21 均与炎症密切相关,可能通过与多种抗炎因子靶基因相结合,继而对相关靶基因的表达产生抑制,发挥生物学功能,促进 MPP 的发展^[17-18]。此外,观察组儿童外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著低于对照组,这与张晓峰等^[19]的研究报道相符。其中 CD3⁺ T 淋巴细胞在一定情况下可反映机体 T 淋巴细胞活化情况,进而反映机体免疫状况,其水平降低说明 T 淋巴细胞活化受到抑制;CD4⁺ T 淋巴细胞则可刺激 T 淋巴细胞转化为效应细胞或活化巨噬细胞,进而发挥免疫作用,其水平的降低间接反映免疫功能受到抑制;CD8⁺ T 淋巴细胞具有灭杀感染靶细胞的作用,其水平的降低表明机体灭杀感染细胞的能力降低;CD4⁺/CD8⁺ 降低反映机体免疫力的下降。笔者推测,MPP 患儿外周血中免疫系统可能出现一定程度的紊乱。另外,观察组儿童血清 IL-6、IL-8、TNF-α 水平显著高于对照组,其主要原因为当患儿的肺部发生感染或感染加重时,肺内的局部炎症因子会出现“瀑布式”链式反应,继而促进大量炎症因子、巨噬细胞的快速浸润和扩散^[20]。肺泡上皮细胞及肺血管内皮细胞受损后,中性粒细胞与炎症因子会快速进入肺泡腔,继而促进炎性反应的加剧,进一步增加上述各项血清炎症因子的释放。Pearson 相关分析结果显示,观察组患儿血浆 miR-223、miR-21 水平与外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 水平呈负相关,而与血清 IL-6、IL-8、TNF-α 水平呈正相关,这充分说明血浆 miR-223、miR-21 介导 MPP 发生、发展的主要机制可能和调节 T 淋巴细胞亚群及炎症因子水平密切相关。

综上所述,MPP 患儿血浆 miR-223、miR-21 水平明显较健康儿童升高,且二者与 T 淋巴细胞亚群和炎

症因子有关,初步证实 miR-223、miR-21 具有成为 MPP 防治新靶点的潜力。

参考文献

- [1] HUANG L, HUANG X, JIANG W, et al. Independent predictors for longer radiographic resolution in patients with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: a prospective cohort study[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(12): 23719-23720.
- [2] OKUMURA T, KAWADA J I, TANAKA M, et al. Comparison of high-dose and low-dose corticosteroid therapy for refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25(5): 346-350.
- [3] 朱红英, 鹿梦溪. 标准桃金娘油肠溶胶囊联合匹多莫德治疗小儿肺炎支原体肺炎的疗效及对肺功能和免疫炎症反应的影响[J]. *河北医药*, 2019, 41(1): 46-50.
- [4] 张薇, 孙浩森, 王洁, 等. 肺炎患儿外周血 miR-146a、miR-155 表达水平及其与 T 淋巴细胞亚群和炎症因子的关系[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(11): 1404-1407.
- [5] 林泉, 缪长新, 魏旭华, 等. 连花清瘟颗粒联合阿奇霉素序贯治疗儿童肺炎支原体肺炎合并肺不张疗效及对 T 淋巴细胞亚群和炎症因子的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(2): 153-158.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 年版)[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [7] LIN M, SSHI L, HUANG A, et al. Efficacy of levofloxacin on macrolide-unresponsive and corticosteroid-resistant refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *Ann Palliat Med*, 2019, 8(5): 632-639.
- [8] LIU J, ZHAO F, LU J, et al. High *Mycoplasma pneumoniae* loads and persistent long-term *Mycoplasma pneumoniae* DNA in lower airway associated with severity of pediatric *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 1045-1046.
- [9] CHOI Y J, JEON J H, OH J W. Critical combination of

- initial markers for predicting refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: a case control study[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 193-194.
- [10] 李俊梅, 郑成中, 张曼, 等. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的临床特点及血清 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 的变化分析[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(24): 4768-4772.
- [11] 李少存, 黄丽娜, 郭初, 等. 胸片表现与免疫功能状态在难治性肺炎支原体肺炎患儿肺外并发症早期识别中的临床价值[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(2): 341-344.
- [12] 王伟, 王珂, 秦殊, 等. T 细胞亚群及 PCT 监测在学龄前儿童支原体肺炎诊治中的价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(14): 83-86.
- [13] 丁莹, 雷小丽, 孙旦, 等. 肺炎支原体肺炎外周血 miRNAs 差异表达谱的筛选与验证[J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(2): 90-93.
- [14] 许长娣, 周瑶, 赵德育, 等. 肺炎支原体肺炎患儿外周血及小鼠模型 miRNAs 差异表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4): 567-570.
- [15] 李书军, 宋学平, 侯俊峰, 等. has-miR-223 通过靶向 AR-TN 调控食管癌 KYSE-150 细胞的迁移和侵袭能力[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(17): 1002-1006.
- [16] 李世荣, 刘艳, 王振明, 等. 血清 miR-483-5p、miR-21 和 miR-25 检测在非小细胞肺癌诊断中的价值[J]. *山东医药*, 2019, 59(23): 19-22.
- [17] 陈丽, 赵红勉. miR-223 通过 Lmo2 基因和 MAPK 信号通路调控急性淋巴细胞白血病的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(9): 944-949.
- [18] 黄林枫, 熊岚, 吴奎, 等. 脓毒症患儿血浆 miR-146a、miR-223 表达与 IL-6、IL-10、TNF- α 水平变化的临床意义分析[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(32): 6324-6327.
- [19] 张晓峰, 崔玉宝, 何勇, 等. 肺炎支原体肺炎初诊患儿免疫状态分析[J]. *医学综述*, 2019, 25(23): 4757-4761.
- [20] 甄乾娜, 张磊, 王兴斌, 等. 外周血 T 淋巴细胞亚群和细胞因子在儿童肺炎支原体肺炎诊断中的意义[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(8): 1060-1062.

(收稿日期: 2020-05-09 修回日期: 2020-09-12)

(上接第 273 页)

- [11] 侯修敏, 张银妆, 匡圆圆, 等. 2013—2016 年湘雅医院心力衰竭住院患者的病因、诊治特点及预后影响因素[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(3): 538-546.
- [12] 张二苗, 刘龙, 王凌燕. CA125 在冠心病所致充血性心力衰竭患者中的临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(1): 25-30.
- [13] 王花. 芪蒡强心胶囊对冠心病合并心力衰竭患者血清脂联素水平及心功能的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(22): 2450-2452.
- [14] 王素青, 林英会. 冠心病合并慢性心力衰竭患者血清 HCY、CF-6、UMA 水平及意义[J]. *解放军预防医学杂志*, 2017, 35(2): 142-143.
- [15] 刘颖. 冠心病合并心力衰竭患者血浆组织蛋白酶 S 和血小板反应蛋白-1 的表达及意义[J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(6): 903-906.

- [16] 吴岚, 孙景辉, 张春艳, 等. 扩张型心肌病患者血清 periostin 蛋白的检测及意义[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(22): 1734-1736.
- [17] 陈鑫, 解玉水, 王长谦, 等. 慢性心衰患者 Cat S、TSP-1 表达水平与右心室功能障碍及 LVEF 的关系[J]. *热带医学杂志*, 2019, 19(2): 195-198.
- [18] 邢文, 张莹, 丁丁, 等. 老年冠心病并心力衰竭患者血清 Periostin 蛋白与心脏重构的相关性[J]. *皖南医学院学报*, 2018, 37(3): 223-226.
- [19] 朱川萌, 黎荣山, 卓柳安, 等. 冠心病伴心力衰竭患者血清 Periostin 蛋白水平变化及临床意义[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(6): 729-732.
- [20] 段佳佳, 夏大胜. 慢性心力衰竭患者炎症因子的变化及作用[J]. *中国心血管杂志*, 2012, 17(2): 93-95.

(收稿日期: 2020-05-12 修回日期: 2020-09-17)