DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.19.004
文章编号：1005-8982（2021）19-0019-06

儿科疾病专题·论著

肺炎支原体肺炎患儿血清microRNA-21和microRNA-221水平变化及与炎症因子、T淋巴细胞亚群的相关性*

田伟，梁淳，宋亚娟
（邯郸市中心医院 检验科，河北 邯郸 056008）

摘要：目的 探讨肺炎支原体肺炎（MPP）患儿血清microRNA-21（miR-21）和microRNA-221（miR-221）的水平变化及与炎症因子、T淋巴细胞亚群的关系。**方法** 选取2017年1月—2019年1月邯郸市中心医院就诊的MPP患儿120例为研究对象（MPP组），另选取本院同期体检的健康儿童100例为对照组（CON组）。比较两组研究对象血清miR-21和miR-221的水平差异，并分析二者与患儿外周血中炎症因子[白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)]和T淋巴细胞亚群($CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$)之间的相关性。**结果** MPP组血清miR-21和miR-221水平高于CON组($P<0.05$)。MPP组外周血$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD4^+/CD8^+$低于CON组，而IL-6、IL-8、TNF-α的水平高于CON组(均$P<0.05$)。MPP组血清miR-21和miR-221与患者外周血$CD3^+$（$r=-0.494$和-0.656，$P=0.037$和0.014）、$CD4^+$（$r=-0.621$和-0.554，$P=0.015$和0.031）、$CD8^+$（$r=-0.772$和-0.476，$P=0.003$和0.043）、$CD4^+/CD8^+$（$r=-0.545$和-0.660，$P=0.023$和0.014）均呈负相关，而与TNF-α（$r=0.787$和0.619，$P=0.000$和0.015）、IL-6（$r=0.530$和0.598，$P=0.035$和0.029）、IL-8（$r=0.665$和0.614，$P=0.012$和0.017）均呈正相关。**结论** MPP患儿血清miR-21和miR-221水平升高，且与患儿T淋巴细胞亚群水平的降低、炎症因子水平的升高有一定的相关性，监测两者的水平变化有助于评估MPP患儿的免疫状态和炎症反应，并为合理制订治疗方案提供帮助。

关键词： 肺炎支原体肺炎；microRNA-21；microRNA-221；T淋巴细胞亚群；炎症因子
中图分类号： R725.6　　**文献标识码：** A

Changes in serum microRNA-21 and microRNA-221 levels in children with mycoplasma pneumoniae and their relationship with inflammatory factors and T lymphocyte subset*

Wei Tian, Chun Liang, Ya-juan Song
(Department of Clinical Laboratory, Handan Central Hospital of Hebei Province, Handan, Hebei 056008, China)

Abstract: Objective To study the changes of serum microRNA-21(miR-21) and microRNA-221(miR-221) levels in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP)and their relationship with inflammatory factors and T lymphocyte subsets. **Methods** From January 2017 to January 2019, 120 children with MPP who were treated in our hospital were selected as the study objects (MPP group), and 100 healthy children who were examined in the same period were selected as the control group (CON group). The levels of miR-21 and miR-221 in serum of the two groups were compared, and the correlation between them and inflammatory factors [Interleukin (IL) - 6, IL-8, Tumor

收稿日期：2021-02-14
* 基金项目：河北省2017年度医学科学研究重点课题计划项目（No：20171432）

necrosis factor - α (TNF - α)] and T lymphocyte subsets ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+$/ $CD8^+$) in peripheral blood of children was analyzed. **Results** The serum levels of miR-21 and miR-221 in the MPP group were higher than those in the CON group (all $P < 0.05$). Levels of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, and $CD4^+$/ $CD8^+$ in peripheral blood of the MPP group were lower than those of the CON group, while levels of TNF-α, IL-6, and IL-8 were higher than those of the CON group (all $P < 0.05$). Serum miR-21 and miR-221 in the MPP group were negatively correlated with $CD3^+$ (r = -0.494, P = 0.037; r = -0.656, P = 0.014), $CD4^+$ (r_T =-0.621, P = 0.015; r=-0.554, P = 0.031), $CD8^+$ (r = -0.772, P = 0.003; r = -0.476, P =0.043), and $CD4^+/CD8^+$ (r = -0.545, P = 0.023; r = -0.660, P = 0.014) in the peripheral blood of the patients, while significantly positively correlated with TNF-α (r =0.787, P = 0.000; r =0.619, P = 0.015), IL-6 (r = 0.530, P = 0.035; r = 0.598, P = 0.029), and IL-8 (r = 0.665, P = 0.012; r = 0.614, P = 0.017). **Conclusion** The levels of miR-21 and miR-221 in MPP children's serum are increased, which have a certain correlation with the decrease of T-lymphocyte subsets and the increase of inflammatory factors. Monitoring the changes of the levels of two indexes is helpful to evaluate the immune status and inflammatory response of MPP children, and to provide help for the rational development of treatment programs.

Keywords: mycoplasma pneumoniae; microRNA-21; microRNA-221; t-lymphocyte subsets; cytokines

儿童肺炎支原体肺炎（mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP）是常见的社区获得性肺部感染疾病之一，是由肺炎支原体感染所致，全年均可能发病，以秋冬季最高，据统计MPP占儿童社区获得性肺部感染疾病的10% ~ 30%[1]。儿童MPP临床表现隐匿，在诊疗过程中误诊率及漏诊率较高，严重影响患儿身体健康，因此，及时准确地判断病情是临床治疗的关键。肺炎支原体是一种介于细菌和病毒之间可独立生存的病原微生物，人类是其唯一的宿主，其黏附于宿主细胞后通过堆积氧化物直接损伤宿主细胞，还可扰乱患儿免疫系统功能、改变T细胞亚群构成及促进炎症级联反应加重患儿病情[2]，但是其具体病理机制尚未完全清楚，亟待深入研究。microRNA是长度约20个核苷酸的非编码小核糖核酸，其可调节机体内细胞的分化、增殖及调亡等众多生命过程，其中的microRNA-21（miR-21）及microRNA-221（miR-221）在调节机体免疫系统及激活炎症反应的过程中发挥着重要作用[3-4]，但是关于MPP患儿体内miR-21和miR-221表达的报道很少。本研究拟分析MPP患儿血清miR-21和miR-221的水平变化及其与炎症因子、T淋巴细胞亚群的关系，以期为MPP的诊治提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2017年1月—2019年1月在邯郸市中心医院就诊的120例MPP患儿为研究对象（MPP组）。其中，男性63例，女性57例；年龄3 ~ 8岁，平均（5.32 ± 1.35）岁。纳入标准：①MPP的诊断符合《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识（2015版）》相关标准[5]；②无心肌炎、小儿哮喘及心包炎等疾病。排除标准：①14 d内接受过抗感染治疗；②细菌感染等呼吸系统疾病；③先天性免疫缺陷疾病。另选取本院同期体检的健康儿童100例作为对照组（CON组）。其中，男性55例，女性45例；年龄4 ~ 8岁，平均（5.68 ± 1.47）岁。两组年龄和性别构成比较，差异无统计学意义（P >0.05），具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准同意，所有儿童家属签署知情同意书。

1.2 研究方法

①血标本采集：清晨采集入组对象空腹静脉血2 ml（3份），一份加入淋巴细胞分离液分离，分离后6 h内检测T淋巴细胞亚群，一份加入RNA提取剂，置于-80℃冷藏器中备用，一份离心机3 000 r/min（离心半径14 cm）离心10 min，取上清液置于-80℃冷冻保存备用。②miR-21和miR-221的检测：实时荧光定量聚合酶链反应（qRT-PCR），先经RNA提取试剂盒（德国QLAGEN公司）提取总RNA及检测，经逆转录cDNA试剂盒（北京天根生化科技有限公司）合成cDNA，再使用qRT-PCR扩增仪（美国AB公司）对miR-21、miR-221及内参引物*U6*进行扩增。扩增程序为：95℃预变性3 min，95℃变性15 s，50℃退火1 min，75℃延伸1 min，一共进行45个循环。miR-21引物：正向5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGAT-3'，反向5'-ACTGGTGTCGTGGAGTCG-3'；miR-221引物：正向5'-CAGCATACATGATTCC

TTGTGA-3'，反向 5'-CTTTGGTGTTTGAGATGTTTGG-3'；内参引物 U6：正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'，反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$（ΔCt =样品 Ct 均值-内参 Ct 均值）法对 miR-21 和 miR-221 水平进行定量分析。③T 淋巴细胞亚群的检测：采用流式细胞术进行检测，血样经红细胞裂解液裂解→PBS 清洗液清洗→稀释至每毫升 1×10^6 个细胞，最后经流式细胞仪（美国 BD 公司）收集并分析 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$，并计算 $CD4^+/CD8^+$。④炎症因子的检测：血清样本解冻后使用 880 型酶标仪（德国拜发仪器公司），采用酶联免疫吸附试验检测肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-8（IL-8）水平，试剂盒均购自北京中杉金桥公司。

1.3　统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，比较用 t 检验；计数资料以构成比（%）表示，比较用 χ^2 检验。相关分析用 Pearson 法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　两组血清 miR-21、miR-221 水平的比较

两组血清 miR-21、miR-221 水平比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），MPP 组高于 CON 组。见表 1。

表1　两组血清 miR-21、miR-221 水平的比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	miR-21	miR-221
MPP 组	120	2.74 ± 0.58	3.24 ± 1.17
CON 组	100	1.08 ± 0.72	1.19 ± 0.67
t 值		18.939	15.525
P 值		0.000	0.000

2.2　两组外周血 T 淋巴细胞亚群的比较

两组外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ 及 $CD4^+/CD8^+$ 比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），MPP 组低于 CON 组。见表 2。

表 2　两组外周血 T 淋巴细胞亚群的比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	$CD3^+$/%	$CD4^+$/%	$CD8^+$/%	$CD4^+/CD8^+$
MPP 组	120	36.29 ± 7.44	17.52 ± 6.15	18.43 ± 5.59	0.95 ± 0.27
CON 组	100	43.56 ± 8.14	28.15 ± 6.57	24.51 ± 6.49	1.15 ± 0.23
t 值		6.914	12.375	7.465	5.847
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

2.3　两组炎症因子的比较

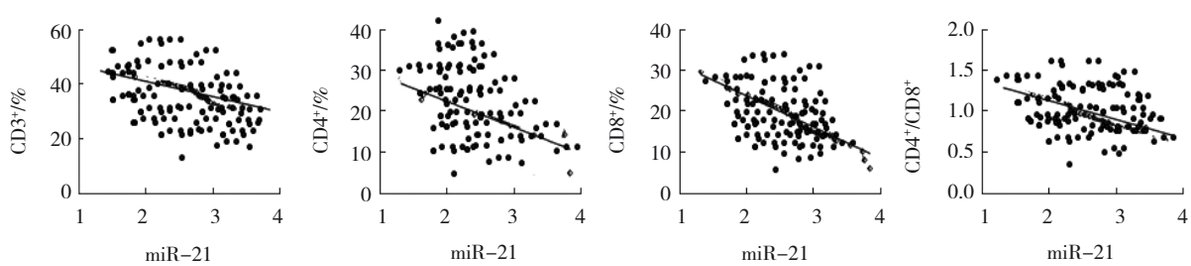
两组炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-8 水平比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），MPP 组高于 CON 组。见表 3。

表 3　两组炎症因子的比较　（ng/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	TNF-α	IL-6	IL-8
MPP 组	120	24.69 ± 7.47	56.72 ± 15.75	71.36 ± 20.63
CON 组	100	8.37 ± 4.95	12.57 ± 4.71	42.33 ± 15.49
t 值		18.690	27.033	11.606
P 值		0.000	0.000	0.000

2.4　MPP 组患儿血清 miR-21、miR-221 水平与 T 淋巴细胞亚群的相关性

MPP 组血清中 miR-21 和 miR-221 与患者外周血中 $CD3^+$（r =-0.494 和 -0.656，P =0.037 和 0.014）、$CD4^+$（r =-0.621 和 -0.554，P =0.015 和 0.031）、$CD8^+$（r =-0.772 和 -0.476，P =0.003 和 0.043）、$CD4^+/CD8^+$（r =-0.545 和 -0.660，P =0.023 和 0.014）均呈负相关。见图 1。



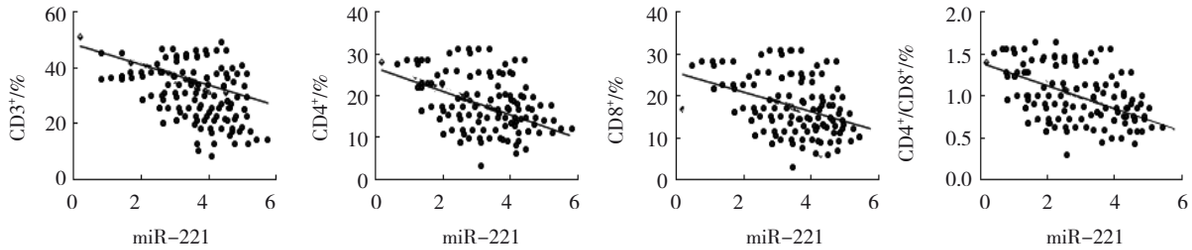


图 1　MPP 组患儿血清 miR-21、miR-221 水平与 T 淋巴细胞亚群的相关趋势图

2.5　MPP 组患儿血清 miR-21、miR-221 水平与炎症因子的相关性

MPP 组血清中 miR-21 和 miR-221 与 IL-6（r = 0.530 和 0.598，P =0.035 和 0.029）、IL-8（r =0.665 和 0.614，P =0.012 和 0.017）、TNF-α（r =0.787 和 0.619，P =0.000 和 0.015）均呈正相关。见图 2。

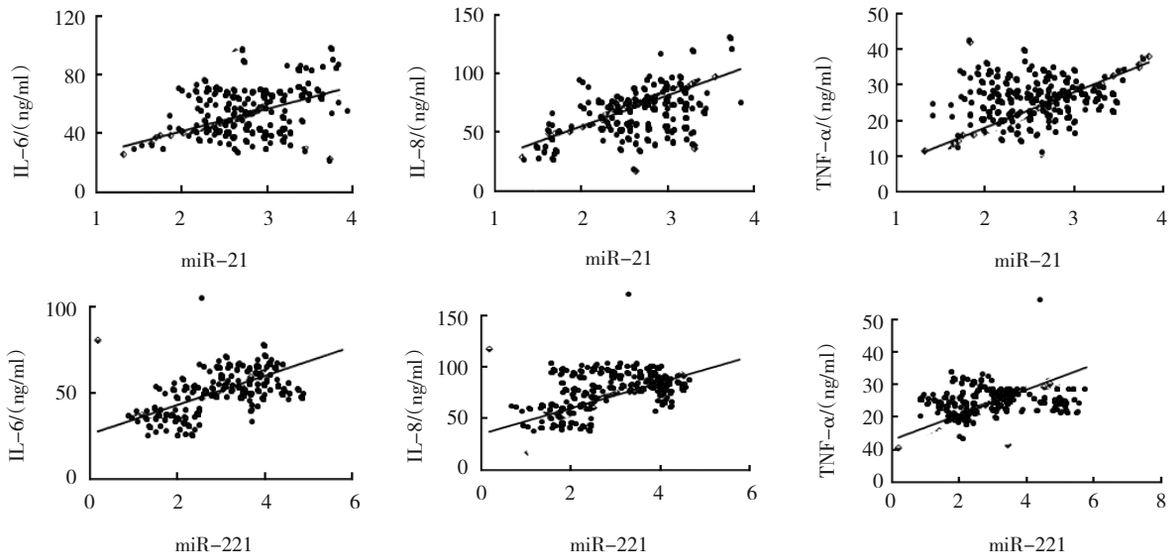


图 2　MPP 组患儿血清 miR-21、miR-221 水平与炎症因子的相关趋势图

3　讨论

MPP 多发于 5 ~ 15 岁的儿童，疾病早期临床中常表现为严重的干咳、头痛及不规律发热，病情严重时患儿免疫系统紊乱、全身炎症反应加重，导致心、肝、脑等重要器官损伤，严重威胁患儿生命健康，目前 MPP 的发病机制尚未完全明确，根据既往的研究报道其发病的主要病理基础是免疫系统的损伤和过度炎症应答反应[6]，因此明确患儿体内免疫损伤机制及炎症反应发生机制是重中之重。

miRNA 一种对真核细胞基因表达有着调控作用的单链小 RNA 片段，其参与细胞的生长发育、分化调亡等过程，同时也与多种疾病的发生、发展密切相关[7]。miR-21 参与了多种疾病的发生、发展，其可通过 Akt 信号通路抑制抑癌基因 PTEN 的表达而引发各类肿瘤，与原肌球蛋白 mRNA 末端结合上调原肌球蛋白的表达可引发动脉粥样硬化，还可以下调免疫调控因子 FasL 的表达而促进肿瘤细胞免疫逃逸[8]。miR-21 对炎症的调控可能是通过对 *EGFR*、*NTF3*、*MAP3K1* 等基因的调节间接调控 MAPK 通路，进而调节炎症反应，其在单核细胞、巨噬细胞、炎症细胞及 T 淋巴细胞中均有表达，参与了冠状动脉粥样硬化性心脏病、糖尿病、血管内皮细胞损伤等众多慢性炎症疾病[9]。林岚等[10]的研究发现老年癫痫患者血清中 miR-21 表达上调，且与炎症因子 IL-2、TNF-α 和 $CD3^+$ 及 $CD4^+$T 淋巴细胞呈正相关，这也提示了 miR-21 参与机体炎症反

应及免疫水平的调节。miR-221可通过促进增殖、迁移、表皮间转化及G_1/S期转化诱导肿瘤细胞的恶性表达，还可以通过促进血管平滑肌细胞的增殖引发血管损伤、重塑，导致动脉粥样硬化的形成[11]。同时，miR-221是目前与MPP免疫紊乱及过度炎症反应关系最为密切的一种miRNA，其可转录调节炎症相关因子的表达，主要是通过调节脂联素受体1来调节血管内皮细胞的炎症反应[12]。王飞等[13]的研究就发现哮喘患儿及小鼠的肺组织中miR-221水平明显上升，且哮喘小鼠肺组织中的炎症因子（IL-1、IL-4）水平显著上升，而使用miR-221抑制剂后炎症因子水平显著下降，这也提示miR-221参与炎症反应的调控。本研结果显示MPP患儿miR-21和miR-221水平明显高于健康儿童，且MPP患儿血清中的炎症因子水平显著升高，而T淋巴细胞亚群显著下降，该结果提示MPP患儿体内免疫功能紊乱及过度炎症反应可能与miR-21和miR-221的表达水平升高有关。

T淋巴细胞是机体细胞免疫的效应细胞，正常情况下其数量保持动态平衡。$CD3^+$T淋巴细胞是成熟细胞，其代表T细胞的活化比例。$CD4^+$T细胞是辅助细胞（Th1/2），Th1细胞主要分泌IL-2和TNF-β，Th2主要分泌IL-4、IL-6、IL-8、IL-10及TNF-α，正常情况下Th1和Th2维持动态平衡，当机体感染病原微生物时，入侵抗原可刺激T细胞产生特异性应答，两者动态平衡被打破，机体会出现免疫功能紊乱及炎症介质大量释放[14]。$CD8^+$T细胞是抑制性辅助细胞，主要功能是直接杀伤外来抗原。$CD4^+/CD8^+$代表机体总体免疫功能，其值下降表示机体免疫功能受到抑制[15]。本研究结果显示MPP患儿$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$及$CD4^+/CD8^+$明显下降，这可能是肺炎支原体感染患儿后，通过抗原呈递及其他生物学机制引起免疫功能紊乱，机体成熟T淋巴细胞较少，细胞亚群失衡。

机体分泌炎症因子的初衷是防御外来病原微生物的入侵，但其过度释放会导致机体损伤。TNF-α由激活的单核、巨噬及T细胞产生，可调节机体适应性免疫、促使细胞凋亡，但有研究[16]显示TNF-α分泌过量可促进炎症反应、损伤器官。IL-6由T细胞及内皮细胞产生，可有效刺激B细胞的分化，在机体急性期发挥重要作用，但过量的IL-6可诱导胸腺细胞分泌大量炎症因子损伤组织[17]。IL-8由活化的巨噬细胞、上皮细胞及T淋巴细胞产生，可以有效地抑制机体免疫因子的释放以控制免疫应答，但二者过量释放其作用减弱甚至起到促进作用[18]。研究结果显示MPP患儿血清各炎症因子的水平明显升高，这也与DONG等[19]的研究相符，提示MPP患儿体内炎症因子过度释放，炎症反应较重，其可能是患者组织损伤的主要机制之一。

此外，本相关性研究结果显示MPP组血清中miR-21和miR-221与患儿外周血中的各T淋巴细胞亚群及$CD4^+/CD8^+$呈负相关，而与各炎症因子呈正相关，这提示miR-21和miR-221可能通过调控MPP患者免疫系统及炎症因子的释放引起组织病理学损伤。通过本研究结果及既往文献的报道，高水平miR-21和miR-221对MPP影响的机制可能有两点：①通过MAPK及MyD88等通路导致患儿免疫功能紊乱，成熟T淋巴细胞减少进而降低机体总体免疫功能、Th1/Th2失衡引起大量炎症因子释放；②直接刺激炎症细胞分泌大量的炎症因子进而引起机体防御性炎症反应过度。这也提示临床可通过检测二者的水平变化以评估MMP患儿的免疫状态和炎症反应程度，并为患儿临床诊断及治疗方案的制订提供一定帮助。当然，本研究属于单中心研究，可能代表不了所有MPP患儿，未来需要设计更多随机对照研究来验证此结论。

综上所述，MPP患儿血清miR-21和miR-221的水平明显升高，且与患者T淋巴细胞亚群水平降低、炎症因子水平升高相关，及时监测二者水平变化可以为MPP的诊治提供帮助。

参 考 文 献：

[1] 殷勇, 陆权, 闫晓莉, 等. 肺炎支原体感染的流行病学[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 91-93.

[2] 吴传飞, 唐红平, 吴仕筠. 小儿肺炎支原体急性感染快速诊断的研究现状与进展[J]. 医学临床研究, 2019, 36(3): 512-514.

[3] 刘洋, 李浪, 苏强, 等. 强化阿托伐他汀对不稳定性心绞痛患者冠状动脉介入治疗术后$CD4^+$T淋巴细胞微小核糖核酸-21表达的影响[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(1): 26-30.

[4] 孙建俊. miR-221在病毒性心肌炎患儿外周血中的表达及其临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(23): 3787-3790.

[5] 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.

[6] 张晓娟, 沈伊娜. 小儿肺炎支原体肺炎发病机制的研究进展[J]. 安徽医学, 2016, 37(1): 111-113.
[7] 莫珍珍, 高海燕, 周瑶, 等. 淋巴细胞相关miRNAs在肺炎支原体肺炎患儿的表达差异[J]. 江苏医药, 2016, 42(2): 142-145.
[8] 彭文丽, 王惟, 何婷, 等. 脓毒症患者血清IL-35与miR-21的表达及相互调控作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 70-73.
[9] 王红, 魏福兰, 王春玲. miR-21研究进展[J]. 口腔生物医学, 2018, 9(2): 106-109.
[10] 林岚, 沈云松, 唐浩, 等. 老年癫痫患者血清miR-222、miR-21的水平变化及其临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(33): 6487-6490.
[11] 顾燕妮, 谢春毅. miRNA与动脉粥样硬化炎症机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(20): 2544-2549.
[12] 何宝明, 柏莹, 李艳琴. miR-221对结核分枝杆菌感染巨噬细胞后炎性因子表达的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(24): 14-17.
[13] 王飞, 汪成伟, 李东涛, 等. miR-221在哮喘患儿痰液的表达及对哮喘小鼠气道炎症的影响[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(6): 579-582.
[14] 靳贝贝, 龚平. $CD4^+$T淋巴细胞亚群与脓毒症免疫应答的研究进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(9): 1174-1178.
[15] 雷辉, 邵荣昌. 肺炎支原体肺炎患儿外周血和肺泡灌洗液中T细胞及细胞因子变化研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(10): 1407-1410.
[16] SHAHRAM M, YAGHOUB F, MAHIN D, et al. Therapeutic effects of ellagic acid on memory, hippocampus electrophysiology deficits, and elevated TNF-α level in brain due to experimental traumatic brain injury[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(4): 399-407.
[17] HASSAN G. Roles of IL-6 in Ocular inflammation: a review[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2017, 26(1): 1-14.
[18] EWA K, LESZEK D, JOANNA B, et al. Urinary IL-8 is a marker of early and long-term graft function after renal transplantation[J]. Ren Fail, 2017, 39(1): 484-490.
[19] DONG Y, LV W, LIN Z. Value of serum mycoplasma pneumoniae immunoglobulin in the diagnosis of mycoplasma-related pneumonia in newborns[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 1445-1449.

（张西倩 编辑）

本文引用格式： 田伟, 梁淳, 宋亚娟. 肺炎支原体肺炎患儿血清microRNA-21和microRNA-221水平变化及与炎症因子、T淋巴细胞亚群的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(19): 19-24.
Cite this article as: TIAN W, LIANG C, SONG Y J. Changes in serum microRNA-21 and microRNA-221 levels in children with mycoplasma pneumoniae and their relationship with inflammatory factors and T lymphocyte subsets[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(19): 19-24.