

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.18.013
文章编号: 1005-8982 (2023) 18-0072-05

临床研究·论著

不同严重程度肺炎支原体肺炎患儿肺部NLRP3 信号通路的变化及其临床价值*

彭力, 钟礼立, 黄寒, 林琳, 丁小芳, 陈敏, 林小娟

[湖南师范大学附属第一医院(湖南省人民医院) 儿童呼吸病学湖南省重点实验室,
湖南 长沙 410005]

摘要: 目的 探讨不同严重程度肺炎支原体肺炎(MPP)患儿肺部NLRP3信号通路的变化及临床价值。
方法 选取2022年4月—2022年10月在湖南省人民医院进行肺泡灌洗的90例MPP患儿, 并分为轻度组和重度组, 分别有26和64例。选取同期该院行异物取出术后复查的10例儿童作为对照组。比较各组的临床资料, Spearman相关性分析MAP1LC3B水平与NF- κ B、NLRP3水平的相关性。**结果** 对照组MAP1LC3B、NF- κ B和NLRP3表达量低于MPP组($P < 0.05$)。轻度组与重度组性别构成、发病年龄、WBC、PLT、PCT、ALT、MP拷贝数、IgG、IgM比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。重度组的发热时间和住院时间较轻度组长($P < 0.05$), CRP、LDH、D二聚体、IgA、MAP1LC3B、NF- κ B和NLRP3表达量较轻度组高($P < 0.05$)。Spearman相关性分析显示, MAP1LC3B表达与NF- κ B水平($r_s = 0.510, P < 0.05$)、NLRP3水平($r_s = 0.610, P < 0.05$)均呈正相关。
结论 自噬-NLRP3信号通路参与了MPP的发病, 且与病情严重程度有关。

关键词: 肺炎支原体肺炎; 儿童; 自噬

中图分类号: R725.6

文献标识码: A

Changes and clinical significance of NLRP3 signaling pathway in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia of different severity*

Peng Li, Zhong Li-li, Huang Han, Lin Lin, Ding Xiao-fang, Chen Min, Lin Xiao-juan

[Hunan Provincial Key Laboratory of Pediatric Respiratory, First Hospital Affiliated to Hunan Normal University (Hunan Provincial People's Hospital), Changsha, Hunan 410005, China]

Abstract: Objective To investigate the changes and clinical significance of NLRP3 signaling pathway in children with mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) of different severity. **Methods** A total of 90 children with MPP who were hospitalized for alveolar lavage in our hospital from April 2022 to October 2022 were divided into mild group (26 cases) and severe group (64 cases). Meanwhile, 10 children undergoing recheck after removal of foreign bodies in our hospital during the same period were set as the control group. Clinical data of the groups were compared, and the correlation of the level of MAP1LC3B with the levels of NF- κ B and NLRP3 was analyzed via the Spearman method. **Results** Compared with the control group, the level of MAP1LC3B in the MPP group was significantly higher ($P < 0.05$). There was no difference in the sex composition, age, WBC, PLT, PCT, ALT, and the copy number, IgM and IgG of MP between the mild group and the severe group ($P > 0.05$). Compared with the mild

收稿日期: 2023-03-09

* 基金项目: 湖南省教育厅科学研究青年项目(No: 22B0058); 湖南省卫健委科研课题(No: 202206010013); 湖南省中医药科研课题(No: A2023057); 湖南省创新型省份建设专项(No: 2019TP1043)

[通信作者] 钟礼立, E-mail: zhonglil1@hunnu.edu.cn

group, the severe group had a longer duration of fever and length of hospital stay, and higher levels of CRP, LDH, D-dimer, IgA, MAP1LC3B, NF- κ B and NLRP3 ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis revealed that the expression of MAP1LC3B was positively correlated with the levels of NF- κ B ($r_s = 0.510$, $P < 0.05$) and NLRP3 ($r_s = 0.610$, $P < 0.05$). **Conclusions** Autophagy-NLRP3 signaling pathway is involved in the pathogenesis of MPP, and is related to the severity of the disease.

Keywords: mycoplasma pneumoniae pneumonia; child; autophagy

肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)是社区获得性肺炎常见致病菌之一^[1],主要致病机制包括直接感染、间接感染和免疫损伤^[2]。近年来重症或难治性儿童肺炎支原体肺炎(mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP)患儿较多,病死率可达 3%~5%^[3],然而该病发病机制目前仍未完全阐明^[4]。

自噬是人类进行稳态维持的一种机制,将胞内损伤的蛋白质、细胞器及侵入病原菌经溶酶体进行降解,具有抵抗病原菌作用^[5]。近来研究显示 MP 侵入呼吸道上皮细胞后可引发机体自噬,但目前自噬相关信号通路在儿童 MPP 研究较少。基于此,本研究回顾性分析湖南省人民医院 MPP 患儿临床资料,评估 NOD 样受体蛋白 3(NOD like receptor protein 3, NLRP3)信号通路相关蛋白在不同严重程度 MPP 中的变化,为 MPP 发病机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2022 年 4 月—2022 年 10 月湖南省人民医院儿童医学中心住院,行纤维支气管镜肺泡灌洗治疗的 90 例 MPP 患儿作为 MPP 组。其中男性 50 例,女性 40 例;年龄 2~11 岁,平均(5.6±2.1)岁。MPP 符合《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 年版)》^[6]诊断标准,即临床表现和影像学具有肺炎改变,结合病原学检查考虑 MP 急性感染:MP-免疫球蛋白(M, IgM)≥1:160,或双份血清(间隔 2 周)恢复期抗体滴度上升 4 倍或下降至原来的 1/4,或 MP-DNA 阳性。根据病情将 90 例经纤支镜肺泡灌洗的 MPP 患儿分为轻度组和重度组,在诊断 MPP 基础上,至少存在以下特征之一为重度组:拒食或有脱水征;意识障碍;呼吸频率增快(根据不同年龄判定);紫绀;呼吸困难(呻吟、鼻翼扇动或三凹征);多肺叶或≥2/3 肺受累;胸腔积液;脉搏血氧饱和度≤0.92;合并肺外并发症等^[7]。其余患儿作为轻度组。轻度组患儿 26 例,其中男性 17 例,女性 9 例。

重度组患儿 64 例,其中男性 33 例,女性 31 例。选取同期本院行异物取出术后复查的 10 例儿童作为对照组,其中男性 5 例,女性 5 例,无发热、明显咳嗽等临床症状,无肺外并发症等情况。

1.2 方法

回顾性分析 MPP 患儿性别、年龄、住院时间等基本资料,以及住院后的临床资料和实验室检查指标[白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板计数(platelet count, PLT)、降钙素原(Procalcitonin, PCT)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、IgA、IgG、IgM、D 二聚体]、MP 拷贝数及肺外并发症。患儿均于入院 24 h 内留取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)标本,采用荧光定量聚合酶链反应行 MP-DNA 检测,采用酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)检测受试者 BALF 标本自噬相关蛋白微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3B(microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, MAP1LC3B)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和 NLRP3 水平。操作方法严格按照产品说明书进行,批内及批间分析变异系数分别<10%,所有样本设 3 个复孔。取对照组的肺泡灌洗液标本行 MAP1LC3B、NF- κ B 和 NLRP3 水平检测。本研究经医院医学伦理委员会审批通过(No:2023-17)。

1.3 MPP 患儿获取纤维支气管镜肺泡灌洗液步骤

纤维支气管镜先端插入病变管嵌入管腔内(灌洗部位多选择病变严重肺段,病变范围比较广泛者则选右肺中叶,小婴儿选择右下叶),以 37℃生理盐水(体重<20 kg 者,每次灌洗量 1 mL/kg,体重≥20 kg 者,每次灌洗量 20 mL/kg)进行支气管肺泡灌洗 3 次。随即以负压 13.3~20 kPa(100~150 mmHg)进行抽吸以获取灌洗液标本,置入灭菌痰液收集器。回收率>40%、无大气道分泌物混入,红细胞<20%视为合格标本。及时处理标本后置于-80℃冰箱冷

冻保存以备检查。

1.4 MPP 患儿行纤维支气管镜检查的指征

1.4.1 适应证 胸部 X 射线或 CT 检查示肺不张或含气不良, 或符合难治性 MPP 诊断标准^[6]的患儿。

1.4.2 禁忌证 严重心肺功能减退、心律失常、活动性大咯血, 严重的出血性疾病、凝血功能损伤、严重的肺动脉高压及其他可能诱发大咯血的疾病, 严重营养不良, 不能耐受手术等均为相对禁忌证。发热患儿行纤维支气管镜术前需将体温降至 38 ℃ 以下。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (四分位数间距) [M(P₂₅, P₇₅)] 表示, 比较用 *t* 检验或秩和检验; 计数资料以构成比或率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; 相关性分析用 Spearman 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP 组与对照组 MAP1LC3B、NF-κB 和 NLRP3 水平比较

MPP 组与对照组 MAP1LC3B、NF-κB 和 NLRP 水

平比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05), 对照组低于 MPP 组。见表 1。

表 1 MPP 组与对照组 MAP1LC3B、NF-κB 和 NLRP3 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAP1LC3B/ (ng/mL)	NF-κB/ (ng/mL)	NLRP3/ (pg/mL)
对照组	10	3.12 ± 1.43	0.42 ± 0.12	2.23 ± 1.02
MPP 组	90	8.92 ± 4.31	2.32 ± 1.04	8.01 ± 3.94
<i>t</i> 值		2.365	2.628	2.876
<i>P</i> 值		0.023	0.015	0.005

2.2 轻度组与重度组临床资料比较

轻度组与重度组性别构成、发病年龄、WBC、PLT、PCT、ALT、IgG、IgM、MP 拷贝数比较, 差异均无统计学意义 (P > 0.05)。轻度组与重度组发热时间、住院时间、影像学肺实变、肺外并发症、胸腔积液、CRP、LDH、D 二聚体、IgA、MAP1LC3B、NF-κB、NLRP3 表达量比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05); 重度组发热时间和住院时间较轻度组长, CRP、LDH、D 二聚体、IgA、MAP1LC3B、NF-κB 和

表 2 轻度组与重度组临床资料比较

组别	n	男/女/例	发病年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	发热时间/ [d, M(P ₂₅ , P ₇₅)]	住院时间/ (d, $\bar{x} \pm s$)	影像学肺实变 例(%)	肺外并发症 例(%)
轻度组	26	17/9	5.53 ± 2.12	6(1, 8)	6.62 ± 2.51	6(23.08)	0(0.00)
重度组	64	33/31	6.05 ± 1.97	7(5, 9)	8.05 ± 2.52	57(89.06)	55(85.94)
$\chi^2/t/Z$ 值		1.431	1.730	-2.490	2.421	38.334	57.455
<i>P</i> 值		0.232	0.089	0.013	0.018	0.000	0.000
组别	胸腔积液 例(%)	WBC/($\times 10^9, \bar{x} \pm s$)	PLT/($\times 10^9, \bar{x} \pm s$)	CRP/[mg/L, M(P ₂₅ , P ₇₅)]	PCT/[μg/L, M(P ₂₅ , P ₇₅)]		
轻度组	0(0.00)	8.66 ± 3.59	356.34 ± 139.45	6(2, 12)	0.05(0.02, 0.14)		
重度组	25(39.06)	9.26 ± 4.09	382.23 ± 106.56	12(3, 26)	0.08(0.05, 0.21)		
$\chi^2/t/Z$ 值	14.063	-0.644	-0.806	-2.220	-1.137		
<i>P</i> 值	0.000	0.522	0.423	0.026	0.256		
组别	LDH/(u/L, $\bar{x} \pm s$)	ALT/(u/L, $\bar{x} \pm s$)	D 二聚体/[mg/L, M(P ₂₅ , P ₇₅)]	IgA/(g/L, $\bar{x} \pm s$)	IgG/(g/L, $\bar{x} \pm s$)		
轻度组	334.81 ± 70.08	17.27 ± 7.94	0.42(0.28, 0.91)	1.15 ± 0.44	9.31 ± 1.91		
重度组	396.53 ± 137.49	22.78 ± 9.24	0.72(0.38, 1.26)	1.57 ± 0.70	10.29 ± 2.54		
$\chi^2/t/Z$ 值	2.517	1.161	1.636	2.687	1.722		
<i>P</i> 值	0.014	0.249	0.009	0.009	0.089		
组别	IgM/(g/L, $\bar{x} \pm s$)	MP 拷贝数 ($\bar{x} \pm s$)	MAP1LC3B/(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	NF-κB/(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	NLRP3/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)		
轻度组	1.24 ± 0.41	6.43 ± 1.24	5.91 ± 2.58	0.83 ± 0.37	4.66 ± 1.86		
重度组	1.61 ± 0.68	6.60 ± 1.15	12.89 ± 4.86	2.76 ± 0.95	12.21 ± 3.38		
$\chi^2/t/Z$ 值	0.992	0.463	2.591	5.079	4.942		
<i>P</i> 值	0.324	0.645	0.032	0.001	0.001		

NLRP3 表达量较轻度组高。见表 2。

2.3 MAP1LC3B 与 NF- κ B、NLRP3 水平的相关性分析

Spearman 相关性分析显示, MAP1LC3B 与 NF- κ B 水平 ($r_s = 0.510$, $P = 0.020$)、NLRP3 水平 ($r_s = 0.610$, $P = 0.006$) 均呈正相关。见图 1、2。

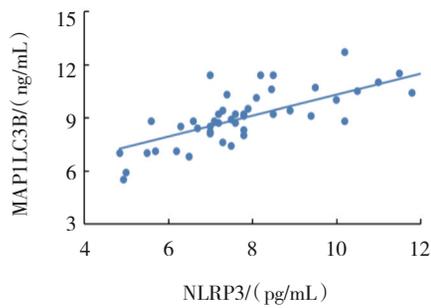


图 1 MAP1LC3B 与 NF- κ B 水平的相关性分析

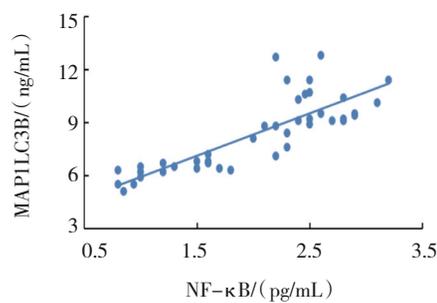


图 2 MAP1LC3B 与 NLRP3 水平的相关性分析

3 讨论

本研究结果提示, MPP 重度组热程较轻度组长, 说明患儿炎症持续存在, 未得到有效控制, 而高炎症反应状态下会导致机体出现持续高热的状况, 最终导致疾病进展^[8]。本研究结果发现, 重度组 CRP、LDH 表达量较轻度组高。CRP、LDH 均为炎症指标^[9], 在重度组明显升高表明该组患儿感染 MP 后发生更强烈的炎症反应。本研究结果还显示, 重度组 D 二聚体平均水平高于轻度组, 与既往研究一致^[10]。另外, IgA 水平在重度组较轻度组明显升高, 可能与重度发生更为强烈的免疫反应有关。

MP 与自噬相关。目前最新研究发现, 肺炎支原体可通过 Toll 样受体 4 和自噬依赖的途径诱导小鼠巨噬细胞产生炎症反应^[11]。肺炎支原体社区获得性呼吸窘迫综合征毒素也可激活 NLRP3 炎症小体, 诱导 THP-1 细胞自噬^[12]。另有鸡毒支原体可能通过 Toll 样受体 2 激活 NF- κ B 信号通路诱导巨噬细胞自

噬^[11,13]。另有研究发现, 绵羊肺炎支原体可诱导肺脏上皮细胞和巨噬细胞自噬^[12]。MAP1LC3B 参与自噬体形成, 是自噬信号通路中不可缺少的蛋白之一, 是判断反应机体自噬严重程度的重要指标^[14]。本研究结果显示, MPP 组 MAP1LC3B 水平较对照组显著升高, 且重度组 MAP1LC3B 水平较轻度组高, 表明自噬参与 MPP 发病, 且与 MPP 严重程度相关, 与文献研究显示自噬相关蛋白与疾病严重程度相关结论一致^[15]。

NLRP3 炎症小体是目前研究最广泛、最明确的一种炎症反应关键的调控点, 且与肺部感染疾病关系密切^[16]。报道表明在呼吸机相关肺损伤中, 肺泡巨噬细胞中自噬的激活通过 NLRP3 炎症小体信号传导介导了机械通气期间的早期肺部炎症^[17]。自噬还可以直接调节核转录因子 NF- κ B, 从而调控相关炎症反应^[13], 而 NF- κ B 通路激活 NLRP3 炎症小体^[18]。因此笔者推测, 自噬通过调节 NF- κ B 介导了 NLRP3 炎症小体的激活, 参与支原体肺炎的炎症反应的发生。本研究结果发现, MPP 组 NF- κ B、NLRP3 表达量较对照组高, 重度组 NF- κ B、NLRP3 水平较轻度组高, 进一步相关性分析提示 MAP1LC3B 与 NF- κ B、NLRP3 呈正相关, 提示自噬-NLRP3 信号通路相关蛋白及细胞因子参与 MPP 的致病机制, 且与疾病严重程度相关, 临床中在疾病早期通过对自噬-NLRP3 信号通路相关蛋白及细胞因子检测可为 MPP 的病情预测提供依据。

综上所述, 自噬-NLRP3 通路信号参与 MPP 的发生、发展, 以自噬-NLRP3 通路作为调控 MPP 炎症反应的靶点, 以期肺炎支原体感染所致肺炎支原体肺炎的早期防治提供理论依据。

参 考 文 献 :

- [1] SU M, WANG Q, LI D, et al. Prevalence and clinical characteristics of hospitalized children with community-acquired Mycoplasma pneumoniae pneumonia during 2017/2018, Chengde, China[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(5): e23786.
- [2] 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.
- [3] JIANG Z L, LI S H, ZHU C M, et al. Mycoplasma pneumoniae infections: pathogenesis and vaccine development[J]. Pathogens, 2021, 10(2): 119.

- [4] TSAI T A, TSAI C K, KUO K C, et al. Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2021, 54(4): 557-565.
- [5] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al. Autophagy in major human diseases[J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863.
- [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] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 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.
- [8] GONG H, SUN B J, CHEN Y, et al. The risk factors of children acquiring refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(11): e24894.
- [9] HUANG W J, XU X H, ZHAO W Q, et al. Refractory *Mycoplasma pneumoniae* in children: a systematic review and meta-analysis of laboratory features and predictors[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 9227838.
- [10] HUANG X, LI D, LIU F, et al. Clinical significance of D-dimer levels in refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 14.
- [11] LUO H, HE J, QIN L, et al. *Mycoplasma pneumoniae* lipids license TLR-4 for activation of NLRP3 inflammasome and autophagy to evoke a proinflammatory response[J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 203(1): 66-79.
- [12] XIA W, DAI X Y, DING L K, et al. Three main short-chain fatty acids inhibit the activation of THP-1 cells by *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(4): 923-930.
- [13] CHEN C L, LI J C, ZHANG W, et al. *Mycoplasma gallisepticum* triggers immune damage in the chicken thymus by activating the TLR-2/MYD88/NF- κ B signaling pathway and NLRP3 inflammasome[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 52.
- [14] LV X W, HE Z F, ZHU P P, et al. miR-451-3p alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting MAP1LC3b-mediated autophagy[J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(10): 1089-1100.
- [15] OKUYAN H M, DOGAN S, BAL T, et al. Beclin-1, an autophagy-related protein, is associated with the disease severity of COVID-19[J]. *Life Sci*, 2021, 278: 119596.
- [16] MALINCZAK C A, SCHULER C F, DURAN A J, et al. NLRP3-Inflammasome inhibition during respiratory virus infection abrogates lung immunopathology and Long-Term airway disease development[J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 692.
- [17] ZHANG Y, LIU G J, DULL R O, et al. Autophagy in pulmonary macrophages mediates lung inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation during mechanical ventilation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(2): L173-L185.
- [18] HE F H, CHENG Q, LI N, et al. Carbenoxolone ameliorates allergic airway inflammation through NF- κ B/NLRP3 pathway in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(6): 743-750.

(李科 编辑)

本文引用格式: 彭力, 钟礼立, 黄寒, 等. 不同严重程度肺炎支原体肺炎患儿肺部NLRP3信号通路的变化及其临床价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(18): 72-76.

Cite this article as: PENG L, ZHONG L L, HUANG H, et al. Changes and clinical significance of NLRP3 signaling pathway in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia of different severity[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(18): 72-76.