

doi:10.11816/cn.ni.2023-213015



• 论 著 •

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

# 小儿肺炎支原体肺炎 TLR4、NLRP3 炎性小体表达及其与疾病进展的关系

奚玉秀<sup>1</sup>, 陈晓宇<sup>1</sup>, 崔盈<sup>1</sup>, 过黎黎<sup>1</sup>, 沈峰<sup>1</sup>, 周春香<sup>2</sup>, 张晓枫<sup>2</sup>

(1. 江南大学附属医院儿科 2. 呼吸内一科, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** **目的** 探究肺炎支原体肺炎(MPP)患儿外周血单个核细胞中 Toll 样受体-4(TLR4)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体表达及其与疾病进展的关系。**方法** 选取 2017 年 1 月—2021 年 4 月于江南大学附属医院接受治疗的 MPP 患儿 112 例为研究组,根据其疾病严重程度分为轻症组 67 例和重症组 45 例,另选取健康体检儿童 50 名为对照组,采集入组研究对象外周静脉血,检测单个核细胞中 TLR4 和 NLRP3 相对表达量,检测血清炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18 水平。**结果** 研究组 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平及 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均高于对照组( $P < 0.05$ );重症组 MPP 患儿外周血 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均高于轻症组( $P < 0.05$ );Pearson 相关性分析表明,MPP 患儿 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平与 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均呈正相关( $P < 0.05$ );受试者工作特征(ROC)曲线分析显示,TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平预测重症 MPP 的曲线下面积(AUC)为 0.950、0.994。**结论** MPP 患儿 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平及 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均升高,且 TLR4、NLRP3 炎性小体可作为 MPP 病情进展的预测因子。

**关键词:** 肺炎支原体肺炎;儿童;Toll 样受体-4;NOD 样受体蛋白 3;疾病进展

**中图分类号:** R725.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-4529(2023)01-0129-04

## Expression of inflammasomes TLR4 and NLRP3 in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and its association with disease progression

XI Yu-xiu, CHEN Xiao-yu, CUI Ying, GUO Li-li, SHEN Feng, ZHOU Chun-xiang, ZHANG Xiao-feng  
(Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To explore the expression of inflammasomes Toll-like receptor 4 (TLR4) and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia (MPP) and analyze its association with disease progression. **METHODS** A total of 112 children with MPP who were treated in the Affiliated Hospital of Jiangnan University from Jan 2017 to Apr 2021 were assigned as the study group and divided into the mild group with 67 cases and the severe group with 45 cases according to the severity of disease, meanwhile, 50 healthy children who received physical examination were chosen as the control group. The peripheral blood specimens were collected from the enrolled research subjects, the relative expression levels of TLR4 and NLRP3 in PBMCs were detected, and the levels of serum inflammatory factors interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 were detected. **RESULTS** The expression levels of TLR4, NLRP3 mRNA and levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 were higher in the study group than in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of peripheral blood TLR4, NLRP3 mRNA and levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 were higher in the severe group than in the mild group ( $P < 0.05$ ). Pearson correlation analysis indicated that the expression levels of TLR4 and NLRP3 mR-

收稿日期: 2022-07-11; 修回日期: 2022-09-23

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81500071)

通讯作者:周春香, E-mail: 108343901@qq.com

作者简介:奚玉秀(1977—),女,本科,副主任护师,研究方向:儿科护理

引用本文:奚玉秀,陈晓宇,崔盈,等.小儿肺炎支原体肺炎 TLR4、NLRP3 炎性小体表达及其与疾病进展的关系[J].中华医院感染学杂志,2023,33(1):129-132. doi:10.11816/cn.ni.2023-213015

NA of the children with MPP were positively correlated with the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 ( $P < 0.05$ ). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that the areas under curves (AUCs) of TLR4 and NLRP3 mRNA were respectively 0.950 and 0.994 in prediction of severe MPP. **CONCLUSION** The children with MPP show the rise of expression levels of TLR4, NLRP3 mRNA as well as the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18. The inflammasomes TLR4 and NLRP3 can be used as factors for prediction of progression of MPP.

**Key words:** *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia; Child; Toll-like receptor 4; NOD-like receptor protein 3; Disease progression

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 侵入宿主后,可刺激机体免疫系统,使炎症因子局部聚集并蔓延,最终诱发呼吸道感染<sup>[1]</sup>。发生肺炎支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, MPP) 的患儿不仅有呼吸系统症状,同时还可出现其他系统症状<sup>[2]</sup>。呼吸系统症状以发热、咳嗽为主,初期呈阵发性干咳,而重症患儿可出现气胸、纵膈积气等不良并发症;同时 MPP 患儿还可能出斑丘疹、心肌损伤、自身免疫性溶血性贫血等其他并发症<sup>[3]</sup>。近年来 MPP 发病率有逐渐上升的趋势, MPP 病程可达 2 个月以上,严重影响儿童的正常发育成长<sup>[4-5]</sup>,因此精确评估 MPP 患儿病情发展具有重要的临床意义。Toll 样受体-4 (Toll like receptor 4, TLR4) 是重要免疫蛋白质分子,可激活机体免疫细胞应答; NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体通过激活适应性免疫以及先天免疫,可抵御微生物入侵<sup>[6-7]</sup>; 两者通过转导信号刺激效应分子进行表达,在多种炎症的发生发展过程中具有重要作用。因此,本研究对 112 例 MPP 患儿单个核细胞中 TLR4、NLRP3 炎性小体表达水平进行分析,探究其与 MPP 发展的关系,为临床提供参考,结果如下。

## 1 对象与方法

**1.1 对象** 选取 2017 年 1 月—2021 年 4 月在江南大学附属医院接受治疗的 MPP 患儿 112 例为研究组,根据其疾病严重程度<sup>[8]</sup>分为轻症组 67 例和重症组 45 例。纳入标准:(1)符合 MPP 的诊断标准<sup>[9]</sup>。(2)年龄 1~14 岁。(3)患儿在最近 3 个月内未接受过 MPP 相关治疗。(4)参与患儿家属对研究内容、方案知情并已签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他呼吸道感染疾病。(2)患有反复呼吸道感染、慢性肺疾病病史。(3)合并自身免疫性疾病。(4)合并心、肾、肝脏系统疾病。另选取健康体检儿童 50 名为对照组。本研究经医院伦理委员会审核批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 NLRP3、TLR4 mRNA 表达水平检测** 采集研究组患儿入院次日,对照组体检当日外周静脉血,采用 RNA 提取试剂盒(福州奥研实验器材有限责任公司)提取 RNA,逆转录试剂盒(南京博研生物科技有限公司)将总 RNA 反转录为 cDNA,获得 cDNA 后于 -20 °C 保存待测。使用 PCR 扩增试剂盒(上海沪峥生物科技有限公司)进行目标基因扩增,NLRP3 和 TLR4 引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

表 1 NLRP3、TLR4 引物序列

Table 1 The primer sequences of NLRP3 and TLR4

基因	序列
NLRP3	上游: 5'-TCTGTTTCATTGGCTGCGGAT-3' 下游: 5'-GCCTTTTTCGAACTTGCCGT-3'
TLR4	上游: 5'-ACTTGGACCTTTCAGCAAC-3' 下游: 5'-TTTAAATGCACCTGGTTGGA-3'

**1.2.2 血清炎性因子水平检测** 采集研究组患儿入院次日,对照组体检当日外周静脉血,离心 15 min,转速 3 500 r/min,取上清液,置于 -70 °C 冰箱下保存待测。采用全自动生化分析仪及配套试剂(美国贝克曼库尔特有限公司)检测白细胞介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-18 (Interleukin-18, IL-18) 水平。

**1.3 统计分析** 采用 SPSS 20.0 软件学软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间行独立样本  $t$  检验;相关性采用 Pearson 相关性分析,受试者工作特征 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析单个核细胞 TLR4、NLRP3 mRNA 表达对 MPP 病程的评估价值,曲线下面积 (Area under curve, AUC)  $> 0.7$  表示预测效能良好。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组 TLR4、NLRP3 相对表达量和炎性因子水平** 研究组患儿外周血 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平和 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

**表 2** 两组 TLR4、NLRP3 相对表达量和炎症因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )**Table 2** Comparison of the relative expression levels of TLR4, NLRP3 and levels of inflammatory factors between the two groups( $\bar{x} \pm s$ )

指标	研究组 (n=112)	对照组 (n=50)	t 值	P 值
TLR4 mRNA	0.77±0.09	0.59±0.06	12.905	<0.001
NLRP3 mRNA	1.95±0.13	1.65±0.11	13.253	<0.001
IL-1β(pg/ml)	6.79±1.20	4.38±1.19	11.838	<0.001
IL-18(pg/ml)	179.84±16.25	86.75±13.94	35.132	<0.001

**2.2 重症组与轻症组 MPP 患儿 TLR4、NLRP3 相对表达量和炎症因子水平** 重症组 MPP 患儿外周血 TLR4、NLRP3 mRNA 表达水平和 IL-1β、IL-18 水平均高于轻症组( $P < 0.05$ ),见表 3。

**表 3** 重症组与轻症组 MPP 患儿 TLR4、NLRP3 相对表达量和炎症因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )**Table 3** Comparison of the relative expression levels of TLR4, NLRP3 and levels of inflammatory factors between the severe group and the mild group ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	重症组 (n=45)	轻症组 (n=67)	t 值	P 值
TLR4 mRNA	0.91±0.08	0.66±0.10	14.020	<0.001
NLRP3 mRNA	2.20±0.17	1.73±0.11	17.776	<0.001
IL-1β(pg/ml)	8.62±1.35	5.00±1.07	15.784	<0.001
IL-18(pg/ml)	213.14±19.65	150.64±15.04	19.037	<0.001

**2.3 MPP 患儿单个核细胞中 TLR4、NLRP3 相对表达量与血清炎症因子的相关性分析** Pearson 相关性分析显示, MPP 患儿 TLR4、NLRP3 mRNA 与血清 IL-1β、IL-18 浓度均呈正相关( $P < 0.05$ ),见表 4。

**表 4** MPP 患儿单个核细胞中 TLR4、NLRP3 相对表达量与血清炎症因子的相关性分析**Table 4** Association between the relative expression levels of TLR4, NLRP3 in PBMCs of the MPP children and the serum inflammatory factors

指标	TLR4 mRNA		NLRP3 mRNA	
	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-1β	0.895	<0.001	0.846	<0.001
IL-18	0.715	<0.001	0.663	<0.001

**2.4 TLR4、NLRP3 相对表达量对 MPP 病情进展的预测价值** ROC 曲线分析结果显示, TLR4、NLRP3 mRNA 预测重症 MPP 的 AUC 分别为 0.950、0.994,见表 5。

**表 5** TLR4、NLRP3 相对表达量对 MPP 病情进展的预测价值**Table 5** The values of relative expression levels of TLR4 and NLRP3 in prediction of progression of MPP

指标	cut-off	AUC	95%CI	敏感度 (%)	特异度 (%)
TLR4 mRNA	0.815	0.950	0.912~0.987	91.10	91.00
NLRP3 mRNA	1.995	0.994	0.986~1.000	95.60	98.50

### 3 讨论

支原体是目前发现的最小原核微生物,介于细菌与病毒之间,部分支原体会导致人类和动物致病<sup>[10]</sup>。可致病的支原体有 MP、生殖器支原体等,MP 的细胞膜中含有丰富的脂蛋白,且其含量与致病性呈正相关。脂质相关膜蛋白(Lipid-associated membrane proteins, LAMP)可使支原体 MP 黏附于宿主细胞,可导致细胞通透性改变、致使宿主细胞凋亡,同时干扰正常细胞传递<sup>[11-12]</sup>。MP 的吸附作用还会刺激机体炎症因子分泌,引起呼吸道上皮细胞生长因子表达失衡,导致细胞修复程序紊乱,促使 MPP 的发生发展。MPP 主要病变位置为肺间质、支气管,还可累及多个器官和系统<sup>[13]</sup>,出现肺外并发症的可能性较大<sup>[14]</sup>。因此了解 MPP 患儿病情的发展进程、为临床治疗方案提供参考,具有重要意义。

TLR4 与呼吸道疾病的发病、归转具有重要联系,其表达水平与气道炎症呈正相关<sup>[15]</sup>。研究结果显示,研究组单个核细胞中 TLR4 mRNA 表达高于对照组,重症 MPP 患儿水平高于轻症患儿,说明 TLR4 表达与 MPP 患儿病情的发展存在一定联系。分析原因,可能是由于细胞膜上 LAMP 是 TLR4 的配体,LAMP 与单核巨噬细胞表面的 TLR4 结合后可聚集下游髓样分化因子 88(Myeloid differentiation factor 88, MyD88)<sup>[16]</sup>。TLR4/MyD88 通路可使蛋白激酶磷酸化,活化 NF-κB 进入细胞核,可促使单核巨噬细胞合成、分泌炎症因子,造成肺组织损伤<sup>[17]</sup>。Pearson 分析表示,TLR4 与促炎因子呈正相关关系,可再次证实 TLR4 在 MPP 炎症发展中的重要作用。陈金妮等<sup>[18]</sup>研究表明,重度 MPP 患儿的 TLR4 水平高于轻度患儿,同时与 D-二聚体水平呈正相关,TLR4/MyD88 信号通路与 MPP 患儿血液高凝状态的形成有关;刘文君等<sup>[19]</sup>研究也指出,TLR4 在传导炎症信号中有关键性作用,可活化单核-巨噬细胞,释放细胞因子以促进炎症反应,是控制炎症反应的靶点,本研究结果与以上结论一致。

研究结果显示,研究组 NLRP3 mRNA 水平高于对照组,重症 MPP 患儿水平高于轻症患儿,说明 NLRP3 炎症小体与 MPP 病情发展具有一定联系,同时 NLRP3 mRNA 与患儿血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平呈正相关关系,可证实 NLRP3 参与 MPP 炎症反应的形成、发展过程,据此可推测患儿的病情发展。分析原因,NLRP3 通过与接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis associated speck-like protein,ASC)结合形成炎症小体,促进 IL-1 $\beta$ 、IL-18 等炎症因子的合成和释放,达到调控机体免疫应答的作用<sup>[20]</sup>;同时 NLRP3 炎症小体在内源性危险信号激活或致病微生物激活下,会促使大量的促炎因子成熟、释放,可导致机体过度炎症反应<sup>[21-22]</sup>。有研究<sup>[23]</sup>证实,炎性因子 IL-1 $\beta$  的分泌依赖 NLRP3 炎症小体中的核苷酸,NLRP3 炎症小体的异常激活与细胞氧化应激反应密切相关。房有福等<sup>[24]</sup>研究表明,MPP 患儿 NLRP3 mRNA 表达水平与血清促炎因子水平呈正相关,NLRP3 炎症小体参与 MPP 的发病,同时与其病情严重程度以及病程也具有一定相关性,可作为评估 MPP 病情进展的重要指标,本研究结论与其一致。ROC 分析表明,TLR4、NLRP3 在单个核细胞中的表达可作为 MPP 病情进展的预测因子,同时检测两项可显著提高评估精确性。

综上所述,TLR4、NLRP3 炎症小体可作为 MPP 病情进展的预测因子,指导临床治疗,但仍需更多大样本、多中心的试验进一步验证。

## 参考文献

- [1] Garcia-Morales L,Ruiz E,Gourgues G, et al. A RAGE based strategy for the genome engineering of the human respiratory pathogen *Mycoplasma pneumoniae* [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9(10):2737-2748.
- [2] 王雨倩,王颖洁,张莉,等. 儿童肺炎支原体肺炎肺外损害的危险因素分析[J]. 广东医学,2020, 41(23):2386-2389.
- [3] Ramien ML. Reactive infectious mucocutaneous eruption: *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis and other parainfectious eruptions[J]. Clin Exp Dermatol, 2021, 46(3):420-429.
- [4] Mahmood M,Javaid A,Shahid F, et al. Rational design of multimeric based subunit vaccine against *Mycoplasma pneumoniae*: subtractive proteomics with immunoinformatics framework[J]. Infect Genet Evol, 2021, 91:104795.
- [5] 侯秋英,杨敏玲,祝峰,等. 儿童肺炎支原体感染对免疫功能影响的研究[J]. 浙江医学,2022, 44(14):1495-1500.
- [6] 宋瑶,肖臻. NLRP3 炎症小体调控肺部炎症疾病的机制及其中药干预的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9):128-131.
- [7] 刘丹,李玲霞,吴锦艳,等. NLRP3 炎症小体及其调控机制研究进展[J]. 动物医学进展,2020, 41(12):90-95.
- [8] 郑宝英,朱春梅. 重症肺炎支原体肺炎的早期识别[J]. 中国医刊,2015, 50(7):4-6.
- [9] 中华中医药学会儿童肺炎联盟. 儿童肺炎支原体肺炎中西医结合诊治专家共识(2017 年制定)[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(12):881-885.
- [10] Li HO,Colantonio S,Ramien ML. Treatment of *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis with cyclosporine [formula: see text][J]. J Cutan Med Surg, 2019, 23(6):608-612.
- [11] Meyer Sauteur PM,Theiler M,Buettcher M, et al. Frequency and clinical presentation of mucocutaneous disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia[J]. JAMA Dermatol, 2020, 156(2):144-150.
- [12] Go JR,Ali NS,Berbari EF. *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis[J]. Mayo Clin Proc, 2021, 96(6):1520-1521.
- [13] 徐顺芯. 糖皮质激素治疗小儿肺炎支原体肺炎并发肺外疾病的临床研究[J]. 重庆医学,2021, 50(S01):265-267.
- [14] 胡杨,刘春峰. 儿童肺炎支原体相关肺外并发症临床表现及发病机制[J]. 中国小儿急救医学,2021, 28(1):7-11.
- [15] 杨艳,薛征. TLR4 基因敲除对哮喘小鼠气道炎症的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(24):2945-2949.
- [16] 乔翠霞,赵刚,张立泽,等. 基于 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核因子- $\kappa$ B 通路探讨电针对溃疡性结肠炎大鼠的干预机制[J]. 针刺研究, 2020, 45(3):180-187,201.
- [17] Naghib M,Hatam-Jahromi M,Niktab M, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and toll-like receptors: a mutual avenue[J]. Al-lergol Immunopathol (Madr), 2018, 46(5):508-513.
- [18] 陈金妮,李大伟,林秋玉,等. 难治性肺炎患儿感染病原学及 HMGB1、TLR2、TLR4 表达[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(18):2847-2850.
- [19] 刘文君,王亚亭,毕良学,等. 维生素 D3 辅助治疗儿童重症哮喘可降低血清 TLR4、S100 $\beta$  蛋白水平以及延缓哮喘复发[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(9):1382-1386.
- [20] 陈江龙,陈砦,吕志宝. NLRP3 炎症小体激活转录后及翻译后调节机制研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2020, 43(6):670-676.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 房有福,李娜. 肺炎支原体肺炎 NLRP3 炎症小体通路的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(9):742-745.