doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2019.02.001

·论著·

# 肺炎支原体肺炎患儿血浆 sB7-H1 及细胞因子的表达与临床意义

郭素玉,朱灿红,张新星,顾文婧,季伟,严永东,杜培培,陈正荣(苏州大学附属儿童医院,江苏苏州 215003)

[摘要]**目的**:探讨肺炎支原体肺炎(MPP)患儿血浆中可溶性 B7-H1(sB7-H1)的表达水平及其与各细胞因子的关系及临床意义。**方法**:选取 2015 年在苏州大学附属儿童医院呼吸科住院治疗的 MPP 患儿 87 例,并选取同期外科择期手术的 31 例患儿作为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测 MPP 患儿血浆中 sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α 及 GM-CSF 的表达水平。**结果**:MPP 组的 sB7-H1 水平为(1 045±356.50)pg/mL,高于对照组的(294.16±218.33)pg/mL,且经治疗后 sB7-H1 水平下降($P<0.01$)。MPP 患儿 sB7-H1 水平与 IL-36α 呈正相关,而与 IFN-γ、IL-4、IL-17、GM-CSF 无显著相关性。**结论**:sB7-H1 在 MPP 患儿具有高表达,可能在过度免疫反应中起一定的作用。

[关键词]肺炎支原体肺炎;sB7-H1;细胞因子;过度免疫;儿童
[中图分类号]R725.6 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2019)02-0001-04

## Expression and Clinical Significance of Plasma Soluble B7-H1 and Cytokines in Children with *Mycoplasma Pneumoniae* Pneumonia

Guo Suyu, Zhu Canhong, Zhang Xinxing, Gu Wenjing, Ji Wei, Yan Yongdong, Du Peipei, Chen Zhengrong (*Children's Hospital of Soochow University*, *Jiangsu Soochow* 215003, *China*)

[**Abstract**]**Objective**: To probe into the expression level and clinical significance of plasma soluble B7-H1 (sB7-H1) and its correlation with various cytokines in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia (MPP). **Methods**: Totally 87 children admitted into the pneumology department of Children's Hospital of Soochow University in 2015 were extracted as the MPP group, while 31 children with elective surgery in the same period were selected as the control group. The expression levels of sB7-H1, IFN-γ, IL-4, IL-17, IL-36α and GM-CSF in plasma of children with MPP were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results**: The sB7-H1 level of MPP group was (1,045±356.50) pg/mL, higher than that of control group (294.16±218.33) pg/mL, and the sB7-H1 level decreased after treatment ($P<0.001$). The sB7-H1 level was positively correlated with IL-36α in children with MPP, yet not significantly correlated with IFN-γ, IL-4, IL-17 and GM-CSF. **Conclusion**: sB7-H1 has high expression in children with MPP and may play a role in excessive immune inflammation.

[**Keywords**]*Mycoplasma pneumoniae* pneumonia; soluble B7-H1; cytokines; excessive inflammatory response; children

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*,MP)是介于细菌和病毒之间的一类病原微生物,可引起上、下呼吸道感染,10%~40% 的儿童社区获得性肺炎是由 MP 引起的,也是导致毛细支气管炎、哮喘仅次于病毒的第二常见病原体[1]。支原体肺炎流行情况随季节、性别、年龄、地区的不同而有很大差异。肺炎支原体肺炎(*Mycoplasma pneumoniae* pneumonia,MPP)发病机制目前尚不明确,多数研究认为与细胞免疫介导的过度免疫反应有关。已有报道显示,MP 感染的患儿,急性期血清中可检测到某些异常表达的细胞因子,导致机体免疫功能紊乱,激发过度免疫反应,不仅引起肺内炎症,也可引起全身多系统多器官的损伤,甚至遗留严重的后遗症[2]。$CD4^+T$ 细胞的活化是免疫应答的关键,但必须由抗原呈递细胞(APC)提供的第二协同刺激信号才能完全激活,此信号可以促进炎症反应的发展及进行免疫调节。其中,共刺激分子 B7 超家族在递呈协同刺激信号中发挥重要作用[3]。B7-H1 为 B7 超家族的成员,在调节 T 细胞的活化及耐受中起重要作用[4]。但在 MP 感染后引起的过度免疫反应中,共刺激分子及细胞因子所起作用尚不明确,且目前共刺激分子和有关细胞因子对 MPP 病情判断方面的报道相对较少。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年在苏州大学附属儿童医院呼吸科住院治疗并确诊为 MPP 的 87 例患儿,所有患儿均采集住院后 24 h 内的外周血作为急性期组,其中 63 例患儿采集出院前 24 h 内的外周血作为恢复期组。选取同期在苏

**基金项目**:国家自然科学基金项目,编号 81570016;苏州市"科教兴卫"青年科技项目,编号 KJXW2016019;苏州市应用基础研究(医疗卫生)项目,编号 SYSD2016101。
**作者简介**:郭素玉(1992.07-),女,硕士,主要从事儿童呼吸系统感染与免疫性疾病研究,E-mail:2449419195@qq.com。
**通讯作者**:陈正荣(1980.10-),男,博士,副主任医师,主要从事儿童呼吸系统感染与免疫性疾病研究,E-mail:chen_zheng_rong@163.com。

州大学附属儿童医院外科择期手术(腹股沟斜疝)住院的患儿31例作为对照组,近4周内均无感染性疾病史且未使用过任何药物,无家族及个人过敏性疾病及其他变态反应性疾病史。MPP组所有入选病例均符合MP感染标准:以鼻咽抽吸物(NPA)中MP-DNA $>1.0\times10^4$ copies/mL或血清MP-IgM >1.1判断为MP感染。本研究得到苏州大学附属儿童医院伦理委员会批准同意,患儿家属同意抽血检查并签署知情同意书。

87例MPP患儿,男40例,女47例,年龄(52±4)月;31例对照组患儿,男16例,女15例,年龄(45±3)月。两组患儿年龄、性别比较差异无统计学意义($P$均>0.05)。

### 1.2　方法

1.2.1　标本采集　外周血标本的采集:MPP患儿入院后24 h内及出院前24 h内,外科择期手术患儿术前,分别抽取静脉血2~3 mL,置于无菌EDTA抗凝管中,4 ℃、2 500 r/min离心5 min,分离上层血浆,-80 ℃保存。鼻咽分泌物标本的采集:患儿在入院24 h内采用无菌负压吸痰法采集鼻咽分泌物。将塑料吸痰管经患儿鼻腔插入7~8 cm咽部以下,诱导吸取1~2 mL鼻咽分泌物移入装有无菌生理盐水的试管中,振荡混匀后30 min内送检。

1.2.2　实时荧光定量PCR法检测鼻咽分泌物中MP-DNA　鼻咽分泌物标本振荡、离心,去上清液,加入裂解液提取DNA,进行PCR扩增,引物及探针购自广州达安基因股份有限公司。探针结合序列位于上游引物与下游引物之间。在特异性杂交荧光探针的5′端结合荧光发光基团(FAM),在3′端结合荧光吸收基团(TAMRA)。将样品(标本和质控品)上清液2 μL或直接加入阳性定量参考品于反应管中,12 000 r/min离心300 s,放入Icycleriq荧光定量PCR仪样品槽(美国BIO-RAD公司)。PCR反应条件:93 ℃预变性2 min;93 ℃变性45 s,55 ℃退火60 s,10个循环;93 ℃变性30 s,55 ℃退火45 s,30个循环。荧光采集点设置为55 ℃退火45 s阶段。荧光定量PCR的结果以Ct值显示,结果判定:(1)Ct值<38.0为阳性;(2)Ct值38.0~38.9需复测;(3)Ct值≥39.0为阴性。

1.2.3　半定量法检测血清MP-IgM　患儿入院当天采集非抗凝静脉血1~2 mL,离心,取血清10 μL加入抗原包被的微孔板中。室温(18~25 ℃)孵化30 min后加入100 μL过氧化物酶标记的抗人IgM抗体,室温孵育30 min后加入100 μL色原/底物液避光温育15 min,加入100 μL终止液至每一微孔。酶标仪450 nm波长处测吸光度D值,计算样本D值与标准品D值的比值,判定MP-IgM结果:<0.8为阴性,0.8~1.1为可疑,>1.1为阳性;第1次MP-IgM检测为可疑者,1~2周后复查,如增高1.5倍或以上也可诊断为MP急性感染。

1.2.4　检测患儿血浆sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF水平　在入院时(急性期)和出院时(恢复期)分别从患儿血浆样本中检测sB7-H1和细胞因子水平。将样本立即离心并在-80 ℃下保存以用于随后的测定。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测所有细胞因子。用ELISA试剂盒(B&D公司,美国)进行sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF测定。

### 1.3　治疗

MPP患儿急性期均给予阿奇霉素(希舒美,辉瑞制药有限公司)10 mg/kg口服,每日1次,连用5 d,同时给予止咳化痰药物对症处理。治疗后患儿临床症状(热程、气促、吸气三凹征等)较急性期明显好转。治疗中有3例出现腹痛,2例出现恶心,给予相应治疗后症状即消失。

### 1.4　统计学方法

应用SPSS 21.0软件。计数资料以率表示,采用$\chi^2$检验,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用$t$检验,$P$<0.05为差异有统计学意义。相关性分析采用Pearson直线相关分析。

## 2　结果

### 2.1　MPP患儿血浆sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF表达水平变化

MPP急性期患儿血浆中sB7-H1、IL-36α、GM-CSF水平高于恢复期及对照组($P$均<0.05),恢复期与对照组比较差异无统计学意义($P$>0.05);MPP急性期及恢复期患儿血浆中IFN-γ、IL-17水平均高于对照组($P$均<0.05),急性期和恢复期比较差异无统计学意义($P$>0.05);MPP急性期患儿血浆IL-4水平低于恢复期及对照组($P$<0.05)。见表1、图1。

**表1　MPP患儿血浆sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF水平比较**　pg/mL

| 指标 | 急性期(87例) | 恢复期(63例) | 对照组(31例) | $t$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|
| sB7-H1 | 1 045±356.50 | 200.10±265.99* | 294.16±218.33* | 115.378 | <0.01 |
| IFN-γ | 2 931.44±1 173.15 | 2 606.75±1 161.91 | 2 015.60±849.25*# | 16.038 | <0.01 |
| IL-4 | 614.08±201.59 | 644.65±128.92* | 685.38±127.93* | 4.221 | <0.05 |
| IL-17 | 351.10±78.86 | 327.04±100.10 | 298.63±46.14*# | 8.751 | <0.05 |
| IL-36α | 345.29±86.86 | 303.07±56.32* | 288.51±62.01* | 8.44 | <0.05 |
| GM-CSF | 10 309±5 053.88 | 8 018.94±3 892.30* | 6 226.57±3 328.28* | 23.606 | <0.01 |

注:*与急性期比较,$P$<0.05;#与恢复期组比较,$P$<0.05

### 2.2　MPP患儿急性期血浆sB7-H1与IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF表达水平的相关性分析

MPP患儿急性期血浆中sB7-H1与IL-36α呈正相关($P$<0.05),而与IFN-γ、IL-4、IL-17、GM-CSF的表达水平无显著相关性($P$>0.05)。见图2。

## 3　讨论

MPP是一种炎症性疾病,其发病率有逐年升高的趋势,但MP的致病机制及如何发展成MPP仍不完全清楚[5]。可能机制为:MP通过与宿主的细胞表面受体结合,产生细胞毒素,对宿主造成直接损害;MP可能通过

受损的细胞表面进入血液引起支原体血症；MP 侵入宿主后，通过诱发一系列的免疫反应，引起机体免疫功能的紊乱，导致细胞因子过度表达，引起免疫损伤。其中免疫反应尤其是炎性细胞因子在发病中起着重要作用。在固有免疫方面，MP 侵入宿主后，可通过与固有免疫细胞（中性粒细胞、巨噬细胞等）表面的 Toll 受体结合，活化后释放多种酶，引起机体过度炎症反应，导致肺部损伤[6]。在细胞免疫方面，MPP 中存在着 Th1/Th2、CD4/CD8 比例的失衡，且病情越严重，比例失衡越明显，进而说明细胞免疫在免疫损伤中发挥一定作用[7]。在体液免疫方面，MP 感染后可刺激机体产生特异性抗 MP 抗体，形成免疫复合物，导致宿主免疫功能损害，抗体水平越高，免疫损害越严重。且人体内多器官存在与 MP 抗原部分相同的抗原结构，易引起交叉免疫，导致多种肺外并发症的产生[8]。此外，MP 表面抗原易突变、机体免疫清除能力有限，导致患儿反复感染支原体及长期携带。MP 侵入人体导致多种促炎症细胞因子分泌，引起机体的过度免疫反应，在肺炎形成过程中发挥重要作用。本研究旨在探讨过度免疫反应中共刺激因子及细胞因子在 MPP 中的可能作用机制。

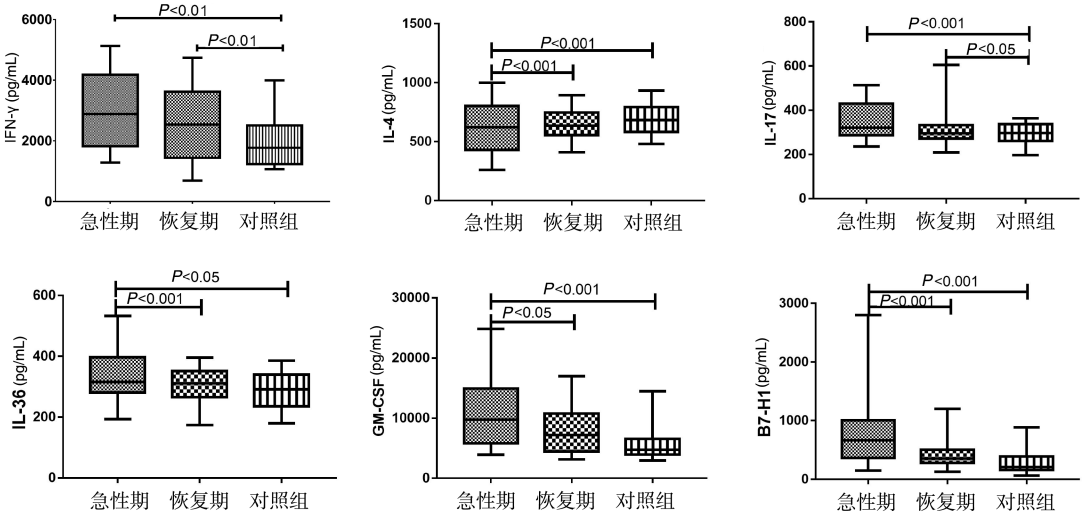


图 1　MPP 患儿血浆 sB7-H1、IFN-γ、IL-4、IL-17、IL-36α、GM-CSF 水平比较

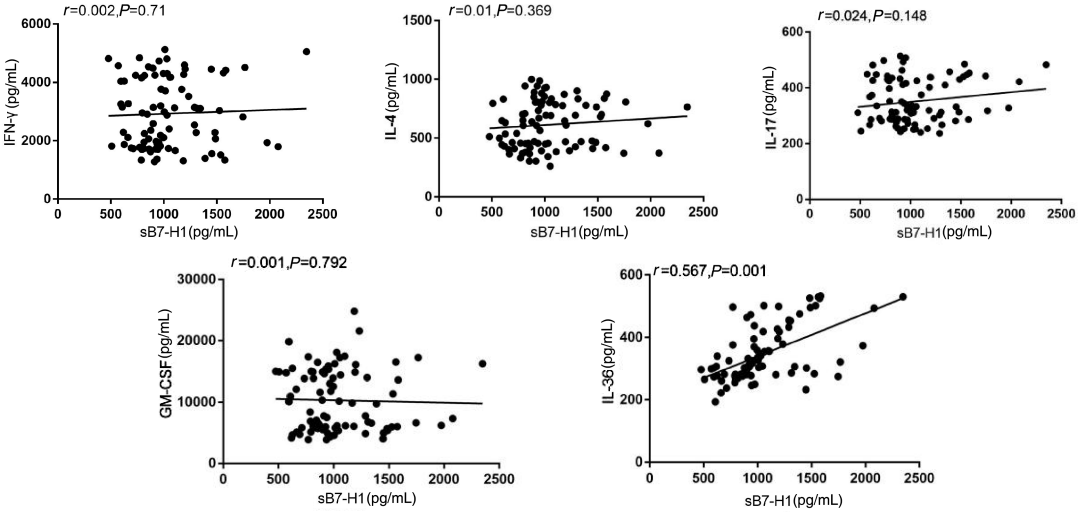


图 2　MPP 患儿血浆 sB7-H1 水平与 IFN-γ、IL-17、IL-36α、TGF-β、GM-CSF 的相关性

本研究通过对 MPP 患儿急性期与恢复期血浆固有免疫、Th1、Th2 及 Th17 型细胞因子及协同共刺激分子 sB7-H1 的测定，了解各型细胞因子及 sB7-H1 在 MPP 患儿体内免疫失衡中的作用。结果显示，MPP 患儿血浆中 sB7-H1、IL-36α、GM-CSF 水平显著高于健康儿童；IL-4 在 MPP 患儿血浆中急性期显著降低；sB7-H1 在 MPP 患儿急性期明显升高，经治疗后明显降低，与 IL-36α 水平呈正相关。提示 sB7-H1 可能通过调节固有免疫，从而参与了 MPP 的发生发展。

B7-H1 是共刺激分子 B7 家族的成员，是 T 细胞的辅助性刺激因子。B7-H1 存在 mB7-H1、sB7-H1 两种表达形式，人外周血中的 sB7-H1 为角质形成细胞、支气管上皮细胞、单核-巨噬细胞和 T 淋巴细胞的 mB7-H1 在金属蛋白酶剪切作用下脱落形成。研究认为 sB7-H1 不仅对 T 细胞介导的免疫应答起重要的调节作用，在固有免疫反应中也有一定作用[9-10]。这与本课题研究结果一

致,即 sB7-H1 可以调控机体内 IL-36α 的分泌,诱导 $CD4^+$T 分泌多种细胞因子[11],在免疫炎症反应中发挥重要作用,且与 T 细胞免疫反应特别是与 $CD8^+$T 细胞的活化有关。近两年本课题组研究显示,MPP 患儿血浆中 sB7-H3 水平较健康儿童有所升高,且在 MPP 炎性损害中起作用[12]。sB7-H1 与 sB7-H3 属于同一家族,由此猜测 sB7-H1 在 MPP 炎症反应中也起到一定作用。其他相关研究显示,sB7-H1 在被感染的细胞上呈现高表达,使 T 淋巴细胞功能减退,清除被感染细胞的能力减弱,而阻断 PD-1/PD-L1 信号通路可以恢复 T 细胞的免疫功能[13-14]。研究小鼠的移植瘤模型发现,随着 PD-L1 蛋白在小鼠体内表达量增高,其体内的肿瘤特异性 T 细胞凋亡也随之增加[13]。这些研究均表明 sB7-H1 参与成人及儿童疾病的免疫调节,但 sB7-H1 在 MP 感染后的机体免疫损伤以及与 MPP 发生、进展是否有关联目前尚不明确。

IL-36 是 IL-1 家族新成员,是新发现的促炎细胞因子,可由单核细胞、T 淋巴细胞、角质细胞等多种细胞产生,与人体 DC 细胞上的 IL-36R 结合,通过激活 MAPK 和 NF-κB 信号传导途径,产生大量炎症介质,在固有免疫中发挥重要作用,参与慢性炎症和自身免疫性疾病的病理发生过程。固有免疫是人体的第一道免疫防线,相关文献报道,在机体感染胞内菌,IL-36 与 IL-36R 结合,激活信号转导途径,诱导Ⅰ型免疫应答发生[15]。值得注意的是,有文献报道 IL-36R 在人类 T 细胞中不表达[16],这说明了 IL-36 在固有免疫调节中具有重要作用。研究发现,感染铜绿假单胞菌或者鼻病毒感染后的支气管上皮细胞,会增加胞内的 IL-36α 和 IL-36γ mRNA 的表达[17-18],表明 IL-36 在感染性疾病的发生发展中起到有一定作用。本研究发现,在 MPP 中 sB7-H1 与 IL-36α 表达增加,且两者有相关性,可推测 sB7-H1 在炎症反应中有一定作用。

综上所述,MPP 患儿急性期血浆中 sB7-H1、IL-36α、GM-CSF 均呈高表达,经抗 MP 感染及感染后炎症反应治疗后均有所降低;而 IL-4 则相反,在急性期较健康儿童降低,经过治疗后有所升高。sB7-H1 可能在 MPP 中起重要作用,特别是可能促进机体内 IL-36α 的释放。以此推测 sB7-H1 可能通过调节固有免疫,参与 MP 感染后免疫反应,从而导致了 MPP 的发生发展。

**参考文献:**


[1] 李萍, 严永东, 孙秋凤, 等. 苏州地区住院儿童下呼吸道感染的病原菌分布[J]. 儿科药学杂志, 2014, 20(9):33-36.

[2] VERVLOET L A, MARGUET C, CAMARGOS P A. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias [J]. Braz J Infect Dis, 2007, 11(5): 507-514

[3] LOMBARDI V, SINGH A K, AKBARI O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma [J]. International archives of allergy & immunology, 2010, 151(3): 179-189.

[4] SINGH A K, STOCK P, AKBARI O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma [J]. Allergy, 2011, 66(2): 155-162.

[5] 张新星, 季伟, 顾文婧, 等. 儿童难治性肺炎支原体肺炎临床及实验室检查特征分析[J]. 儿科药学杂志, 2018, 24(2): 7-11.

[6] CHEN Z R, SHAO X J, DOU X W, et al. Role of the *Mycoplasma pneumoniae*/interleu kin-8/neutrophil axis in the pathogenesis of pneumonia [J]. PLoS One, 2016, 11(1): 0146377.

[7] 刘爱琳,李利. 支原体肺炎患儿自身免疫功能的检测及分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(4): 301-303.

[8] NARITA M. Classification of estrapulmonary manifestations due to *Mycoplasma pneumoniae* infection on the basis of possible pathogenesis [J]. Front Microbiol, 2016, 7(1): 23.

[9] DONG H, CHEN X. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses [J]. Cell Mol Immunol. 2006, 3(3): 179-187.

[10] WAISMAN A, YOGEV N. B7-H1 and $CD8^+$ Treg: The enigmatic role of B7-H1 in peripheral tolerance [J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 1448-1451. doi: 10.1002/eji.200939541.

[11] VIGEN S, PALMER G, LAMACCHIA C, et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells [J]. Blood, 2011, 118(22): 5813-5823.

[12] CHEN Z R, ZHANG G B, WANG Y Q. et al. Soluble B7-H3 elevations in hospitalized children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(4): 362-366.

[13] MCALEES J W, LAJOIE S, DIENGER K, et al. Differential control of $CD4^+$ T-cell subsets by the PD-1PD-L1 axis in a mouse model of allergic asthma [J]. European journal of immunol, 2015, 45(4): 1019-1029.

[14] BARBER D L, WHERRY E J, MASOPUST D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection [J]. Nature, 2006, 439(7077): 682-687.

[15] 舒丹, 晋红中. 泛发性脓疱性银屑病 IL36RN 突变研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2014, 43(9): 531-535.

[16] 张亚南, 吴闽枫, 金性秀, 等. 泛发性脓疱型银屑病易感基因研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, 30(7): 751-752.

[17] BOCHKOV Y A, HANSON K M, KELES S, et al. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma [J]. Mucosal immunology, 2010, 3(1): 69-80.

[18] VOS J B, STERKENBURY M, RABE K F, et al. Transcriptional response of bronchial epithelial cells to Pseudomonas aeruginosa:identification of early mediators of host defense [J]. Physiological genomics, 2005, 21(3): 324-336.


(编辑:曾敏莉)

(收稿日期:2018-03-25　修回日期:2018-05-31)