

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.01.006

RMPP 患儿外周血 IL-6、淋巴细胞亚群及 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测意义*

郭步庆¹, 庞新丰², 乔 静^{3△}, 杨广平³, 李红芬³, 李小荣³, 伦瑞花¹, 李文刚³

焦作市妇幼保健院:1. 检验科;2. 输血科;3. 儿科, 河南焦作 454000

摘 要:目的 通过对 0~6 岁难治性肺炎支原体肺炎(RMPP)患儿进行外周血白细胞介素-6(IL-6)及淋巴细胞亚群检测,结合肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测,分析外周血 IL-6 水平及淋巴细胞亚群与 RMPP 相关情况。方法 肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测采用 PCR-Taqman 荧光探针技术,IL-6 检测方法为流式细胞法。结果 研究组肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组各年龄段肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),年龄越大,其突变比例也越高。研究组各年龄段 IL-6 水平及其异常情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 RMPP 患儿肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测可作为其诊断的常规项目,该检测结果为早期诊断 RMPP 提供依据。

关键词:肺炎支原体; 难治性肺炎支原体肺炎; 淋巴细胞亚群; 白细胞介素-6

中图法分类号:R725.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)01-0019-04

Significance of peripheral blood IL-6, lymphocyte subsets and 23SrRNA gene mutation site A2603G or (and) A2604G in children with RMPP*

GUO Buqing¹, PANG Xinfeng², QIAO Jing^{3△}, YANG Guangping³,

LI Hongfen³, LI Xiaorong³, LUN Ruihua¹, LI Wengang³

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Blood Transfusion; 3. Department of Pediatrics, Jiaozuo Maternal and Child Health Hospital, Jiaozuo, Henan 454000, China

Abstract: Objective To investigate the interleukin-6 (IL-6) and lymphocyte subsets in peripheral blood of 0—6 year old children with refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia (RMPP), combined with the detection of mutation sites A2603G or/and A2604G of 23SrRNA gene of Mycoplasma pneumoniae, and analyze the levels of IL-6 in peripheral blood and the correlation between lymphocyte subsets and RMPP. **Methods** Mutation sites A2603G or/and A2604G of Mycoplasma pneumoniae 23SrRNA gene were detected by PCR-Taqman fluorescence probe technique, and IL-6 was detected by flow cytometry. **Results** The mutation rate of mutation sites A2603G or/and A2604G of Mycoplasma pneumoniae 23SrRNA gene in the study group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The mutation rate of mutation sites A2603G or/and A2604G of Mycoplasma pneumoniae 23SrRNA gene of all age groups in the study group was significantly different ($P<0.05$), and the older the age, the higher the proportion of mutation. There was no significant difference in IL-6 levels and abnormal conditions among different age groups ($P>0.05$). **Conclusion** Detection of 23SrRNA mutation sites A2603G or/and A2604G of Mycoplasma pneumoniae in children with RMPP can be a routine item for diagnosis, and the detection results provide a basis for early diagnosis of RMPP.

Key words: Mycoplasma pneumoniae; refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia; lymphocyte subsets; interleukin-6

难治性肺炎支原体肺炎(RMPP)近年在儿童患者中发病率明显增高, RMPP 易累及心血管系统、消化

系统、神经系统等器官组织造成肺外感染, 引起严重并发症^[1]。RMPP 病理特点是由富含浆细胞的淋巴

* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20191360)。

作者简介: 郭步庆, 男, 主管技师, 主要从儿童呼吸道疾病病原体研究。△ 通信作者, E-mail: jzsfybjysxk@163.com。

本文引用格式: 郭步庆, 庞新丰, 乔静, 等. RMPP 患儿外周血 IL-6、淋巴细胞亚群及 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测意义[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(1): 19-22.

细胞浸润支气管,淋巴细胞在 RMPP 发病机制中起着重要的作用^[2]。婴幼儿肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变导致大环内酯类药物治疗婴幼儿肺炎支原体感染过程发生治疗无效,也可导致婴幼儿 RMPP^[3];CD4⁺辅助性 T 细胞参与了 RMPP 的免疫病理过程,CD4⁺辅助性 T 细胞决定疾病的严重程度和对感染的抵抗力,而 CD8⁺T 淋巴细胞则参与抑制这些炎症反应^[4]。外周血白细胞介素-6(IL-6)是一种多功能的炎症因子,可以作用于 T 淋巴细胞,促使炎症反应的发生,对 RMPP 发生及进展有鉴别作用,IL-6 在抗感染的免疫反应中与机体损伤有关^[5]。患者外周血 IL-6、淋巴细胞亚群异常情况 & 肺炎支原体耐药基因位点成为 RMPP 近年来研究的热点^[6]。本研究旨在对 0~6 岁 RMPP 患儿进行肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测结合外周血 IL-6、淋巴细胞亚群异常情况,采用 Logistic 回归方程对 RMPP 发生的危险因素进行分析,为早期诊断 RMPP 提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 6 月 1 日至 2020 年 5 月 31 日在焦作市妇幼保健院儿童呼吸病区住院的 RMPP 婴幼儿 45 例(研究组)作为研究对象,年龄为 0~6 岁;45 例普通单纯肺炎支原体感染患儿作为对照组,对照组符合单纯肺炎支原体感染诊断标准^[7],年龄 0~6 岁;两组年龄、体质量、性别比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入标准:(1)经大环内酯类抗菌药物正规治疗超过 7 d,仍持续发热 38℃ 以上;(2)临床症状加重、出现肺外合并症;(3)病程延长并伴随影像学异常。排除标准:(1)先天性支气管发育异常,先天性肺功能不全;(2)先天性免疫缺陷,继发性免疫缺陷;(3)严重的肝肾心功能障碍,影响检测结果。研究通过焦作市妇幼保健院伦理委员会审核(批准编号 jzfy-2020-1360),患者享有知情权、选择权。

1.2 方法 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测采用 PCR-Taqman 荧光探针技术,外周血淋巴细胞亚群采用流式细胞分析仪进行 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞百分比检测。参考中国不同年龄及性别的健康儿童外周血淋巴细胞亚群参考值范围^[8],患儿淋巴细胞亚群结果不在正常范围内即为异常;IL-6 检测方法为化学发光法,仪器选用深圳新产业生物 MAGLUMI 2000 Plus 型全自动化学发光仪,0~6 岁人群 IL-6>7 pg/mL 为 IL-6 水平异常。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较行 t 检验;计数资料行 χ^2 检验;将单因素分析中差异有统计学意义的指标纳入多因素 Logistic 回归分析;绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析 RMPP 患者联合指标的诊断价值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变情况 研究组肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);研究组各年龄段肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),年龄越大,其突变比例也越高。见表 1。

2.2 研究组各年龄段 IL-6 水平及其异常情况比较 研究组各年龄段 IL-6 水平及其异常情况比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 各组肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变情况			
组别	<i>n</i>	突变数(<i>n</i>)	突变率(%)
对照组	45	8	17.8
研究组	45	31	68.9
0~<6 个月	11	5	45.5
6~<12 个月	20	13	65.0
1~6 岁	14	13	92.9

表 2 研究组各年龄段 IL-6 水平及其异常情况比较			
组别	<i>n</i>	IL-6 水平($\bar{x}\pm s$, pg/mL)	IL-6 水平异常[<i>n</i> (%)]
研究组	45	21.2±4.6	34(75.5)
0~<6 个月	11	18.9±2.8	7(63.6)
6~<12 个月	20	23.5±1.9	15(75.0)
1~6 岁	14	20.2±3.0	12(85.7)
对照组	45	7.0±2.9	3(6.67)

2.3 两组 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞水平及异常情况比较 两组 CD4⁺T 淋巴细胞百分比、CD4⁺T 淋巴细胞异常数、CD4⁺T 淋巴细胞/CD8⁺T 淋巴细胞异常数比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 RMPP logistic 回归模型分析 通过多因素 Logistic 分析 RMPP;肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变、IL-6 水平异常是 RMPP 发生的独立危险因素。见表 4。

2.5 联合指标诊断 RMPP 的 ROC 曲线分析 IL-6 水平异常诊断 RMPP 的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.844(95% CI: 0.758~0.931);肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变诊断 RMPP 的 AUC 为 0.756(95% CI: 0.652~0.859);肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变、IL-6 水平异常联合指标诊断预测 RMPP 的 AUC 为 0.927(95% CI: 0.870~0.984),对比单一因素诊断 RMPP 具有较高价值,见图 1。

表 3 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞水平及异常情况比较

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 百分比(%)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 百分比(%)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 异常数(<i>n</i>)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 异常数(<i>n</i>)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞/CD8 ⁺ T 淋巴细胞异常数(<i>n</i>)
研究组	45	37.2±5.5	27.2±3.6	32	34	21
对照组	45	25.3±7.6	26.9±4.0	19	29	11
<i>t</i> / <i>χ</i> ²		8.51	0.37	7.68	1.32	4.85
<i>P</i>		<0.001	0.709	0.006	0.250	<0.001

表 4 RMPP 多因素 Logistic 分析

项目	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	自由度	<i>P</i>	<i>Exp</i> (<i>B</i>)	95% <i>CI</i>	
							下限	上限
A2603G 或(和)A2604G 突变	3.060	0.868	12.428	1	<0.001	21.338	3.892	116.981
IL-6 水平异常	4.023	0.865	21.640	1	<0.001	55.890	10.260	304.463
CD4 ⁺ T 淋巴细胞异常	−0.513	0.773	0.441	1	0.507	0.599	0.132	2.722
CD8 ⁺ T 淋巴细胞异常	1.692	0.723	0.456	0	0.672	0.623	0.269	2.693
CD4 ⁺ T 淋巴细胞/CD8 ⁺ T 淋巴细胞异常	1.373	0.760	3.266	1	0.071	3.948	0.890	17.506
常数	−3.030	0.752	16.251	1	<0.001	0.048	—	—

注：—表示无数据。

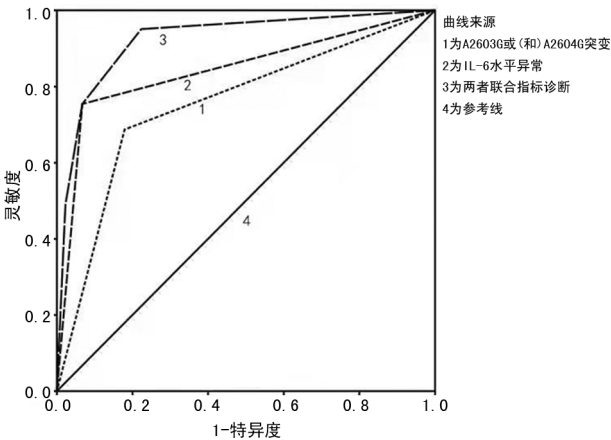


图 1 A2603G 或(和)A2604G 突变、IL-6 水平异常联合指标诊断 RMPP 的 ROC 曲线

3 讨 论

RMPP 具有发热时间长、病情进展快的临床特点,容易发生肺实质病变,造成胸腔积液和肺不张等合并症,严重病例可发展成坏死性肺炎。病原体感染类型可以为单纯肺炎支原体、混合型病原体感染。RMPP 以肺炎支原体引起的肺炎感染及肺外损伤为病理特点,肺炎支原体 A2063、A2064 核苷酸突变,可引起核糖体结合抗菌药物的亲和力下降,从而使肺炎支原体产生耐药性^[9]。0~6 岁 RMPP 患儿通常出现炎症因子变化剧烈、气管平滑肌痉挛、呼吸困难及肺外器官如心脏、肝脏损伤,造成病情加重^[10]。

本研究结果提示,肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 产生耐药性可能是肺炎支原体肺炎转为 RMPP 的重要原因,耐药性导致大环内酯类药物对于儿童患者无效或者效果减低^[11],而常规用于成人治疗肺炎支原体的药物对于儿童是慎

用的,普通治疗方案不能控制病情,造成病程增加,病情加重。本研究结果显示,研究组各年龄段肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变率比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),年龄越大,其突变比例也越高。提示肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 的检测可以作为 RMPP 诊断指标^[12]。

IL-6 作为临床常用一种的炎症指标,可以反映炎症感染程度及肺部实质病变指标,单纯肺炎支原体感染造成的感染程度有限,且合并症较少^[12-13]。本研究结果证实了 IL-6 可以作为 RMPP 诊断指标。与文献^[14-15]报道结果一致。

肺炎支原体感染可导致淋巴细胞多克隆活化,淋巴细胞亚群发生改变,淋巴细胞亚群变化与肺炎支原体感染导致的肺炎进展密切相关^[16]。有学者认为辅助性 T 细胞参与了肺部感染肺炎支原体的免疫病理过程,而 CD8⁺T 淋巴细胞则抑制了肺部免疫反应,CD4⁺辅助性 T 细胞与肺炎的严重程度有关^[17-18]。本研究结果显示,两组 CD4⁺T 淋巴细胞百分比、CD4⁺T 淋巴细胞异常数、CD4⁺T 淋巴细胞/CD8⁺T 淋巴细胞异常数比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变、IL-6 水平异常是 RMPP 发生的独立危险因素。肺炎支原体基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 突变、IL-6 水平异常联合指标诊断对比单一因素诊断 RMPP 具有较高价值。

综上所述,肺炎支原体 23SrRNA 基因突变位点 A2603G 或(和)A2604G 检测可作为 RMPP 诊断的常规项目,该检测结果可以为早期诊断 RMPP 提供

依据。

参考文献

[1] 王建,丁圣刚,侯舒,等.不同年龄阶段儿童的难治性肺炎支原体肺炎临床特点[J].临床肺科杂志,2019,24(9):1614-1617.

[2] WANG X,ZHONG L J,CHEN Z M,et al. Necrotizing pneumonia caused by refractory Mycoplasma pneumonia pneumonia in children[J]. World J Pediatr,2018,14(4):344-349.

[3] 许姜姜,舒林华.儿童难治性肺炎支原体肺炎临床特征分析[J].中国当代儿科杂志,2018,20(1):37-42.

[4] LEE Y C,CHANG C H,LEE W J,et al. Altered chemokine profile in refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia infected children[J]. J Microbiol Immunol Infect,2021,54(4):673-679.

[5] 鲍茹,陈莹,张鹃鹃,等.儿童难治性肺炎支原体肺炎早期发病风险预测因子分析[J].临床军医杂志,2020,48(8):970-972.

[6] 刘俐嫔,侯佳,王莹,等.儿童难治性肺炎支原体肺炎常规免疫指标的年龄依赖性变化分析[J].中国实用儿科杂志,2020,35(5):373-378.

[7] ZHAO J L,WANG X,WANG Y S. Relationships between Th1/Th2 cytokine profiles and chest radiographic manifestations in childhood Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Ther Clin Risk Manag,2016,12(1):1683-1692.

[8] 杨志允,李学明,廖志辉.淋巴细胞亚群绝对计数与难治性肺炎支原体肺炎患儿的早期预测关系分析[J].临床肺科杂志,2020,25(11):80-84.

[9] 甄波,胡国斌,曾艳.难治性肺炎支原体肺炎患儿血清炎症细胞因子水平变化及意义[J].山东医药,2015,55(44):73-75.

(上接第 18 页)

[5] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[M].北京:中国医药科技出版社,2002:219-220.

[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] 韦瑞含,罗晶丹,王毅.小儿肺炎支原体肺炎发病机制与血清免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 水平相关性研究[J].临床军医杂志,2018,46(4):454-455.

[8] 徐艳丽.儿童肺炎支原体感染应用阿奇霉素联合头孢类抗生素及布地奈德雾化吸入治疗的效果研究[J].国际儿科学杂志,2016,43(5):417-419.

[9] 赵爱利.吉他霉素治疗小儿肺炎支原体肺炎的疗效及对血清相关炎症细胞因子的影响[J].中国妇幼保健,2017,32(19):4713-4716.

[10] 周小程,段舞云,曾珊.吉他霉素联合大剂量维生素 C 治疗小儿支原体肺炎的疗效观察[J].中国妇幼保健,2017,32(19):4724-4727.

[10] XU X F,SHENG Y J,YANG L,et al. Immunological features of pediatric interstitial pneumonia due to Mycoplasma pneumoniae[J]. Front Pediatr,2020,20(9):651-656.

[11] GONG H,SUN B J,CHEN Y,et al. The risk factors of children acquiring refractory Mycoplasma pneumonia pneumonia:a meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore),2021,100(11):e24894.

[12] 乔静,庞新丰,张凌波,等.23SrRNA 基因突变点位 A2603G/A2604G 与婴幼儿 PMPP 相关性分析[J].中国优生与遗传杂志,2020,28(9):1042-1043.

[13] 王建,丁圣刚,侯舒,等.不同年龄阶段儿童的难治性肺炎支原体肺炎临床特点[J].临床肺科杂志,2019,24(9):1614-1617.

[14] 刘新锋,赵志妙,张中平.儿童难治性肺炎支原体肺炎危险因素分析[J].河北医学,2017,23(5):780-783.

[15] XU B P,PENG X X,YAO Y,et al. Low-dose versus high-dose methylprednisolone for children with severe Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MCMP): study protocol for a randomized controlled trial[J]. Pediatr Investig,2018,2(3):176-183.

[16] 曲百娜,迟磊,朱紫薇,等.儿童难治性肺炎支原体肺炎的临床特征及高危因素分析[J].中国中西医结合儿科学,2019,11(2):144-148.

[17] JONES H P,TABOR L,SUN X,et al. Depletion of CD8⁺ T cells exacerbates CD4⁺ Th cell-associated inflammatory lesions during murine mycoplasma respiratory disease[J]. J Immunol,2002,168(7):3493-3501.

[18] 朱影,王婧.儿童难治性肺炎支原体肺炎高危因素 logistic 回归分析[J].河北医学,2018,24(5):760-763.

(收稿日期:2021-05-12 修回日期:2021-11-02)

[11] 陆丽骏,乔晓辉,李保法,等.阿奇霉素联合转移因子口服溶液治疗小儿支原体肺炎的疗效及对肺功能的影响研究[J].中华医院感染学杂志,2018,28(7):1100-1103.

[12] 靳玉红,付存稚.阿奇霉素联合转移因子口服溶液治疗小儿肺炎支原体肺炎的临床疗效及对 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的影响[J].中国妇幼保健,2018,33(6):1310-1312.

[13] 李燕,蒋刚,林庆,等.恩替卡韦联合转移因子治疗慢性乙肝的效果观察[J].西南国防医药,2016,26(3):261-263.

[14] 宋明,赵芝娜,徐慰倬.肺炎支原体感染实验室检测的研究进展[J].中国感染控制杂志,2016,15(11):887-893.

[15] 陈玲,覃军,胡荆江.抗生素序贯疗法和转移因子治疗儿童急性下呼吸道感染疗效、症状及实验室指标观察[J].河北医药,2017,39(11):1627-1629.

(收稿日期:2021-05-19 修回日期:2021-11-01)