

## MiR-492、IL-6 在肺炎支原体免疫发病机制的作用研究

邓建萍,周卫芳,孙旦,李玉琴,丁莹,骆亚丽

(苏州大学附属儿童医院感染科,江苏 苏州 215000)

**摘要:**目的 探讨 miRNA-492、IL-6 在肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)免疫发病机制中的作用。方法 ①以肺炎支原体膜脂蛋白(LAMPs)刺激单核巨噬细胞,用实时-定量 PCR 法在 6 h、12 h、24 h 检测单核巨噬细胞系统中的 miR-492 水平;②以不同菌落计数单位的支原体感染单核巨噬细胞,用 ELISA 法在 6 h、12 h、24 h 检测上清 IL-6 的浓度;③构建过表达 miR-492 的慢病毒载体,稳定共转染 THP-1 细胞,予 PMA 刺激诱导分化为单核巨噬细胞,用 ELISA 法检测其 IL-6 的表达。结果 ①LAMPs 刺激组在 6 h、12 h 时间点单核巨噬细胞 miR-492 表达水平均高于空白对照组,两者之间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),24 h 时间点差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。②不同菌落计数的支原体感染组在 12 h、24 h 时间点单核巨噬细胞 IL-6 表达均高于空白对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),6 h 时间点差异无统计学意义。③过表达 miR-492 慢病毒转染组的单核巨噬细胞 IL-6 分泌水平高于空载体对照组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。结论 MiR-492 可能通过调控单核巨噬细胞系统免疫炎症因子如 IL-6 的分泌在肺炎支原体感染和发病中起一定作用。

**关键词:**肺炎支原体;单核巨噬细胞系统;miRNA-492;白细胞介素-6

**中图分类号:** R563.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)05-0429-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.05.007

### Potential roles of miR-492 and IL-6 in the immune pathogenic mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*

Deng Jianping, Zhou Weifang, Sun Dan, Li Yuqin, Ding Ying, Luo Yali

(Department of Infection, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the potential roles of miRNA-492 and interleukin-6 (IL-6) in the immune pathogenic mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. **Methods** ①Real-time quantitative PCR was used to determine the miRNA-492 expression in mononuclear phagocyte system at different time points (6, 12 and 24 h) after being stimulated with *Mycoplasma pneumoniae* (MP) lipid associated membrane proteins (LAMPs). ②The IL-6 expression in the supernate was detected by ELISA at different time points (6, 12 and 24 h) after being infected with different colony-counting of MP. ③THP-1 cells were co-transfected by high-expression of miR-492 lentiviral vector, and the cells were induced to differentiate into mononuclear phagocytes, then the expressions of IL-6 of mononuclear phagocyte system were detected by ELISA. **Results** ①The expression of miR-492 in mononuclear phagocytes after being stimulated by LAMPs was higher than that of the blank control group at the time points of 6 h and 12 h, and there was significant difference between the blank control group and the LAMPs-stimulated group ( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference at 24 h time point ( $P > 0.05$ ). ②The expressions of IL-6 of mononuclear phagocytes after being infected with different colony-counting of MP were higher than those of the control group at 12 h and 24 h, and there were statistically significant

**基金项目:**苏州市科技计划项目(SS201535)

**第一作者简介:**邓建萍(1988-),女,硕士,住院医师,研究方向:儿科呼吸道感染,E-mail:dengjianping1988@163.com

**通信作者简介:**骆亚丽(1974-),女,硕士,主任医师,研究方向:儿科呼吸道感染,E-mail:szdx2006lyl@163.com

difference among different colony-counting of MP infected groups and blank control group ( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference at the time point of 6 hour ( $P > 0.05$ ). ③ The expression of IL-6 in the mononuclear phagocytes after being co-transfected by high-expression of miR-492 lentiviral vector was increased compared to the blank control group, there was statistically significant difference ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** MiR-492 plays a role in the mycoplasma pneumonia infection and disease attack by regulating the immune inflammatory factors such as the secretion of IL-6 in mononuclear phagocyte system.

**Key words:** mycoplasma pneumoniae; mononuclear phagocyte system; miRNA-492; interleukin-6

肺炎是儿科疾病中较为常见的一种,其中肺炎支原体肺炎占社区获得性肺炎的10%~30%<sup>[1]</sup>。肺炎支原体肺炎的发病机制尚不清楚。目前有研究表明肺炎支原体或脂蛋白诱导单核巨噬细胞过度免疫炎症反应在肺炎支原体肺炎尤其重症患儿的免疫病理损伤中具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。MicroRNAs(miR)是一种长约20~25 bp、具有调控功能的非编码RNA。最近的研究显示miR参与各种生物学功能调控,包括发育、增殖、凋亡、代谢等<sup>[4]</sup>。且miRNAs可以通过介导巨噬细胞功能而调控肺部病原菌的廓清和炎症反应<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究发现,miR-492在支原体肺炎患儿外周血表达水平明显高于健康对照组儿童<sup>[6]</sup>。进一步研究miR-492在肺炎支原体感染引起的免疫炎症机制中的参与过程,能更透彻理解miR-492在该病的发生及转归的作用,为探索肺炎支原体肺炎干预手段提供新的思路。本研究通过体外实验的方法初步论证,肺炎支原体感染机体后,miR-492可能通过调控单核巨噬细胞免疫炎症反应起重要作用,现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 PPLO肉汤,酵母粉,新生牛血清,MP菌株(M129株,ATCC 29342),THP-1细胞株,RPMI 1640培养基,新生胎牛血清,Triton X-114,BCA蛋白定量分析试剂盒,丙二醇甲醚醋酸酯(PMA),dNTP mixture,miRNA/mRNA实时荧光定量PCR试剂盒(灏勤生物),RNA抽提试剂盒,Elisa试剂盒(目录号:70-EK106C)、实时荧光定量PCR仪ViiA7(美国AB applied biosystems),NanoDrop 2000-C分光光度计(美国Thermo scientific),酶标仪(美国BioTek)等。

## 1.2 方法

1.2.1 肺炎支原体膜脂蛋白(LAMPS)刺激单核巨噬细胞后分泌miR-492的检测 将肺炎支原体菌株(M129株)进行复苏及扩增至对数期,提取LAMPS,并测定浓度置于冰箱备用。单核细胞系THP-1细胞使用100 nM PMA孵育24 h,使其诱导分化成为成熟单核巨噬细胞。将细胞悬液( $4 \times 10^5$ /孔)均匀铺于6

孔板中,再用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基调整体积,使每孔的体积为2 ml,细胞终浓度为 $2 \times 10^5$ 个/ml。本试验设置空白组和LAMPS刺激组,检测时间点为6 h、12 h和24 h,因此共需18孔,每组3孔。在LAMPS刺激组孔中加入适量LAMPS,使每孔终浓度为100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,空白组加入同体积的RPMI 1640培养基。在采取刺激后6 h、12 h和24 h时间点,收集细胞以RNA抽提试剂盒提取细胞RNA,采用RT-PCR方法,检测细胞中的miRNA-492水平。

1.2.2 肺炎支原体对单核巨噬细胞系统分泌IL-6的影响 以1 CFU/Cell、10 CFU/Cell、100 CFU/Cell的支原体感染成熟单核巨噬细胞系统(单核巨噬细胞培养及六孔板制备见1.2.1)。并设置空白对照组,在刺激6 h、12 h、24 h时间点,采集各孔培养基的上清液,并采用联科生物技术公司ELISA试剂盒检测上清液IL-6表达水平,具体操作方法按照说明书步骤严格进行。

1.2.3 过表达miR-492对单核巨噬细胞分泌IL-6的影响 构建过表达miR-492的慢病毒载体,稳定共转染THP-1细胞,以空载体稳定转染细胞为对照,予PMA刺激诱导分化为单核巨噬细胞。用real-time PCR验证miR-492过表达效果后,再用ELISA方法检测其单核巨噬细胞促炎因子IL-6分泌情况。

1.3 统计学方法 统计学数据分析采用SPSS 17.0软件包,符合正态分布的连续计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LAMPS诱导下单核巨噬细胞系统miRNA-492表达情况 与空白对照组[表达水平为 $(1.75 \pm 0.20)$ ]相比,LAMPS刺激组在6 h和12 h时间点的miRNA-492表达水平[分别为 $(2.49 \pm 0.57)$ 、 $(2.72 \pm 0.55)$ ]均显著上升( $t = -2.284, P = 0.026$ ;  $t = -2.895, P = 0.016$ ),而在24 h[表达水平为 $(1.83 \pm 0.29)$ ]时,表达水平恢复正常( $t = -0.421, P = 0.681$ )。见图1。

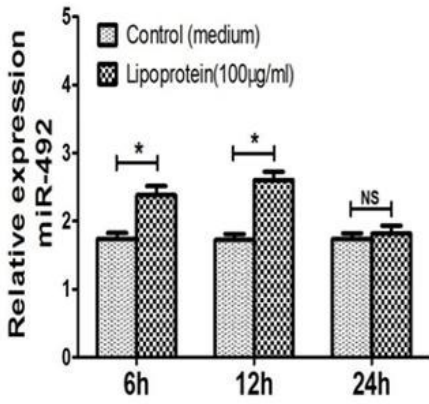


图 1 LAMPS 刺激单核巨噬细胞系统高表达 miRNA-492  
注: \*  $P < 0.05$ , NS  $P > 0.05$

2.2 不同菌落计数的肺炎支原体诱导单核巨噬细胞系统产生炎症因子 IL-6 水平 与对照组相比结果显示:各个实验组在 6 h 时间点的 IL-6 表达正常;在 12 h 和 24 h 时间点的 IL-6 表达均上升,且差异具有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1、图 2。

表 1 各实验组和对照组在不同时间点 IL-6 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

组别	n	6 h	12 h	24 h
1 CFU/Cell 组	3	39.10 ± 6.42	62.75 ± 7.95 <sup>a</sup>	110.49 ± 23.95 <sup>d</sup>
10 CFU/Cell 组	3	41.15 ± 5.86	60.01 ± 5.94 <sup>b</sup>	100.36 ± 9.32 <sup>e</sup>
100 CFU/Cell 组	3	41.53 ± 6.03	59.78 ± 7.36 <sup>c</sup>	93.93 ± 7.57 <sup>f</sup>
对照组	3	41.89 ± 6.70	43.48 ± 6.08	59.58 ± 9.32

注:与对照组比较, a:  $t = -3.649, P = 0.008$ ; b:  $t = -4.156, P = 0.002$ ; c:  $t = -3.518, P = 0.004$ ; d:  $t = -4.526, P = 0.003$ ; e:  $t = -6.497, P < 0.001$ ; f:  $t = -6.868, P < 0.001$

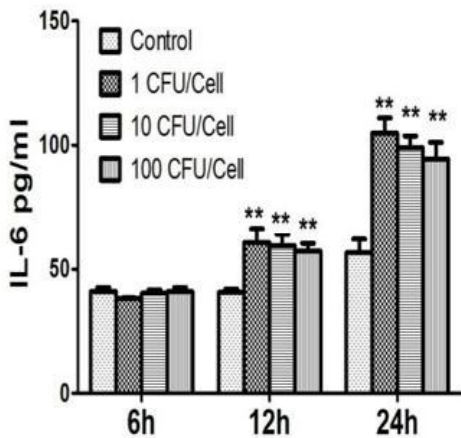


图 2 不同菌落计数肺炎支原体刺激单核巨噬细胞系统高表达 IL-6  
注: \*\*  $P < 0.01$

2.3 过表达 miRNA-492 对单核-巨噬细胞分泌 IL-6

水平的影响 实验结果显示过表达的 miR-492 慢病毒转染组 [ $n = 3$ , IL-6 表达水平为  $(194.75 \pm 11.41)$  pg/ml] 的 IL-6 分泌水平明显高于空白转染组 [ $n = 3$ , IL-6 表达水平为  $(148.62 \pm 12.21)$  pg/ml], 两组差异有统计学意义 ( $t = -5.602, P < 0.001$ )。见图 3。

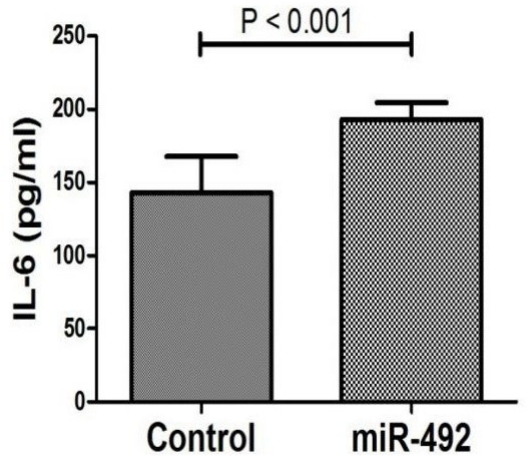


图 3 过表达 miRNA-492 慢病毒转染组及空载体转染组的 IL-6 表达对比

### 3 讨论

儿童支原体肺炎,又称原发性非典型肺炎,是由肺炎支原体感染引起,以学龄儿童较为多见,婴幼儿也不少。临床以发热、厌食、畏寒、头痛、咽痛、咳嗽等为主要表现<sup>[7-8]</sup>。重症支原体肺炎患儿可伴发多系统、多器官损害<sup>[9]</sup>。肺炎支原体感染后引起病情轻重不一,重症及难治性支原体肺炎多见于年长儿,这与宿主免疫系统活化能力有关。宿主年龄越大,免疫系统发育越成熟,当肺炎支原体通过呼吸道飞沫传播进入机体后,宿主通过调动单核巨噬细胞系统活化免疫系统产生炎症因子廓清病原菌,然而过度的免疫应答分泌过多的炎症因子则可引起器官损伤。

miRNA 是一组微小非编码 RNA,在多种生物学进程,例如细胞增殖、迁移、分化及凋亡发挥重要作用<sup>[4]</sup>。本实验组前期实验发现<sup>[6]</sup>,支原体肺炎患儿外周血的 miRNA-492 的表达高于健康儿童,因此可以推测 miRNA-492 参与调控肺炎支原体肺炎的发生发展。miRNA-492 位于 12q22 染色体上,在转移性肝母细胞瘤、直肠癌、宫颈癌、胰腺癌组织中均发现其表达上调,与这些肿瘤的发生和转移有关<sup>[10-13]</sup>。亦有文献报道<sup>[14]</sup>miRNA-492 可作为生物标记物,用于疾病的诊断中。

IL-6 是由淋巴细胞(T 细胞、B 细胞)及非淋巴细胞(成纤维细胞、巨噬细胞等)分泌的糖肽,其分泌受多

种因素的调节。IL-6 是肺炎支原体炎症反应中的重要细胞因子,在免疫应答的早期即发挥重要作用<sup>[15]</sup>。且 IL-6 与肿瘤、哮喘、溃疡性结肠炎等多种疾病也具有相关性<sup>[16-18]</sup>。支原体肺炎患儿外周血中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  和 IL-10 等多种炎症因子较健康儿童升高,可用于临床肺炎支原体肺炎患儿早期诊断、病程发展及预后转归的监测<sup>[19-20]</sup>。本实验通过体外实验发现,肺炎支原体感染单核巨噬细胞系统 12 h 后 IL-6 浓度即高于对照组,且差异有统计学意义,进一步证明 IL-6 参与支原体肺炎的发生发展过程,此结论与外周血实验结果一致。

LAMPS 可以诱导单核巨噬细胞高表达 miR-492,而且肺炎支原体感染单核巨噬细胞可以导致培养上清促炎因子 IL-6 分泌增加,且 IL-6 的分泌增加滞后于 miR-492 的高表达。我们推测 miR-492 可能是通过一定的途径达到调控单核巨噬细胞炎症反应分泌过多的炎症因子例如 IL-6,从而在肺炎支原体感染的发生发展过程中起重要作用。此外通过构建高表达 miR-492 的慢病毒载体,并转染进入单核巨噬细胞后检测 IL-6 水平,分析检测结果提示 miR-492 的过度表达可增加单核巨噬细胞系统促炎因子 IL-6 的分泌,进一步论证上述观点。分析 miR-492 对其他相关炎症因子分泌水平及其下游靶基因的影响,研究 miR-492 参与的肺炎支原体感染病理过程,有利于明确肺炎支原体肺炎中过度免疫炎症发生的具体机制。

#### 参考文献:

[1] Wu PS, Chang LY, Ling HC, et al. Epidemiology and clinical manifestations of children with macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Taiwan[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2013, 48(9):904-911.

[2] Lee KY. Pediatric respiratory infections by *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6: 509-521.

[3] Lai JF, Zindl CL, Duffy LB, et al. Critical role of macrophages and their activation via MyD88-NF $\kappa$ B signaling in lung innate immunity to *Mycoplasma pneumoniae* [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e14417.

[4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116:281-297.

[5] Foster PS, Plank M, Collison A, et al. The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung[J]. *Immunol Rev*, 2013, 253(1): 198-215.

[6] 丁莹,雷小丽,孙旦,等.肺炎支原体肺炎外周血 miRNAs

差异表达谱的筛选与验证[J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(2):90-93.

- [7] Donenko FV, Kabieva AO, Efferth T. Tumor-specific blood serum factors as determinants of tumor growth [J]. *Klin Lab Diagn*, 2014, 10(2):241-243.
- [8] Eghtesad S, Nurminskaya MV. Binding of pro-migratory serum factors to electrospun PLLA nano-fibers[J]. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2013, 2417(4):112-113.
- [9] 胡忠腾,朱虹.肺炎支原体感染 2098 例临床分析[J]. *右江民族医学院学报*, 2014, 36(6):846-847.
- [10] Gaedcke J, Grade M, Camps J, et al. The rectal cancer microRNAome-microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18):4919-4930.
- [11] 段永恒,周灵丹,高建,等. miR-658 和 miR-492 的差异表达与宫颈鳞状细胞癌盆腔淋巴结转移的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2016, 43(8):699-703.
- [12] von Frowein J, Pagel P, Kappler R, et al. MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):833-842.
- [13] Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, et al. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(12):1609-1622.
- [14] Yang Z, Xie L, Han L, et al. Circular RNAs: Regulators of Cancer-Related Signaling Pathways and Potential Diagnostic Biomarkers for Human Cancers[J]. *Theranostics*, 2017, 7(12):3106-3117.
- [15] Tsujimoto H, Takahata R, Nomura S, et al. Predictive value of pleural and serum interleukin-6 levels for pneumonia and hypo-oxygenations after esophagectomy[J]. *J Surg Res*, 2013, 182(2):e61-67.
- [16] 万艳芳,周建亮,鲁小慧.炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 水平与儿童哮喘严重程度的相关性研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2016, 27(21):4075-4076.
- [17] 王少鑫,浦江,刘超群,等.炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-4 在溃疡性结肠炎中的表达及临床意义[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2015, 24(1):104-106.
- [18] 刘微,朱波,林治华. IL-6 信号通路与肿瘤[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(3):353-355.
- [19] 李容汉,李琼珍,邓群娣,等.儿童支原体肺炎血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 和 IL-10 浓度临床研究的意义[J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2014, 5(5):32-35.
- [20] 曾志奇,刘文宽,陈德晖,等.广州地区儿童呼吸道合胞病毒与肺炎支原体流行病学分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(22):1701-1704.

收稿日期:2018-08-13;修回日期:2018-10-15