

# 难治性肺炎支原体肺炎患儿血清长链非编码RNA肺腺癌转移相关转录因子1和烟酰胺核苷酸反义转氢酶RNA1检测的临床意义

冯 华<sup>a</sup>, 薛洪刚<sup>b</sup>, 徐玉秀<sup>c</sup> (辽宁省健康产业集团阜新矿总医院 a. 儿科; b. 呼吸内科; c. 检验科, 辽宁阜新 123000)

**摘要:** **目的** 探讨难治性肺炎支原体肺炎 (refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, RMPP) 患儿血清长链非编码核糖核酸 (long non-coding ribonucleic acid, LncRNA) 肺腺癌转移相关转录因子1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)、烟酰胺核苷酸反义转氢酶 RNA1 (nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1, NNT-AS1) 检测的临床意义。**方法** 选择2018年1月1日~2021年1月1日辽宁省健康产业集团阜新矿总医院收治的200例肺炎支原体肺炎患儿,其中43例为RMPP (RMPP组),157例为普通肺炎支原体肺炎 (普通肺炎组),另选择100例健康儿童为对照组。检测血清 LncRNA MALAT1 和 LncRNA NNT-AS1 表达水平以及炎症因子 [C反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、降钙素原 (procalcitonin, PCT)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )] 水平。分析血清 LncRNA MALAT1 和 LncRNA NNT-AS1 表达水平与炎症因子水平的相关性。收集临床资料,分析影响 RMPP 发病的影响因素,比较不同疗效 RMPP 患儿血清 LncRNA MALAT1 和 LncRNA NNT-AS1 表达水平的差异。**结果** RMPP组、普通肺炎组和对照组血清 LncRNA MALAT1 ( $3.26 \pm 0.85$ ,  $1.32 \pm 0.41$  和  $1.05 \pm 0.37$ ) 和 LncRNA NNT-AS1 ( $3.38 \pm 0.92$ ,  $1.41 \pm 0.40$  和  $1.06 \pm 0.39$ ) 水平比较差异均有统计学意义 ( $F=335.693$ ,  $335.828$ , 均  $P < 0.05$ ), 血清 CRP ( $45.24 \pm 2.01$  mg/L,  $19.02 \pm 3.27$  mg/L 和  $3.26 \pm 0.77$  mg/L), PCT ( $1.58 \pm 0.52$   $\mu$ g/L,  $0.82 \pm 0.16$   $\mu$ g/L 和  $0.31 \pm 0.09$   $\mu$ g/L), IL-8 ( $42.77 \pm 8.84$   $\mu$ g/L,  $26.35 \pm 5.91$   $\mu$ g/L 和  $13.02 \pm 3.79$   $\mu$ g/L) 和 TNF- $\alpha$  ( $9.22 \pm 2.61$   $\mu$ g/L,  $5.02 \pm 1.49$   $\mu$ g/L 和  $3.32 \pm 0.96$   $\mu$ g/L) 水平比较差异均有统计学意义 ( $F=4\ 207.164$ ,  $457.187$ ,  $410.300$ ,  $214.875$ , 均  $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析结果显示血清 LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1 表达水平均与 CRP, PCT, IL-8, TNF- $\alpha$  水平呈正相关 ( $r=0.715 \sim 0.922$ , 均  $P < 0.05$ )。Logistic 逐步回归分析结果显示肺大片实变影 [OR(95%CI)= $2.212(1.396 \sim 3.506)$ ]、CRP 高表达 [OR(95%CI)= $2.111(1.313 \sim 3.392)$ ]、LncRNA MALAT1 高表达 [OR(95%CI)= $1.826(1.189 \sim 2.805)$ ]、LncRNA NNT-AS1 高表达 [OR(95%CI)= $1.758(1.149 \sim 2.689)$ ] 是 RMPP 发病的危险因素 (均  $P < 0.05$ )。43 例 RMPP 患儿治疗有效 38 例 (有效组), 无效 5 例 (无效组), 有效组血清 LncRNA MALAT1 ( $3.16 \pm 0.24$ ) 和 LncRNA NNT-AS1 ( $3.29 \pm 0.20$ ) 表达水平低于无效组 ( $4.02 \pm 0.09$ ,  $4.06 \pm 0.10$ ), 差异有统计学意义 ( $t=7.869$ ,  $8.406$ , 均  $P < 0.05$ )。**结论** LncRNA MALAT1 和 LncRNA NNT-AS1 可能通过调节炎症反应参与 RMPP 发病, 检测 LncRNA MALAT1 和 LncRNA NNT-AS1 表达可为 RMPP 治疗疗效评估提供参考。

**关键词:** 难治性肺炎支原体肺炎; 长链非编码核糖核酸; 肺腺癌转移相关转录因子1; 烟酰胺核苷酸反义转氢酶 RNA1

中图分类号: R563.15; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-007-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.002

## Clinical Significance of Serum long Non-coding RNA Metastasis-associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1, Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase-antisense RNA1 in Children with Refractory *Mycoplasma Pneumoniae* Pneumonia

FENG Hua<sup>a</sup>, XUE Hong-gang<sup>b</sup>, XU Yu-xiu<sup>c</sup>

(a. Department of Pediatrics; b. Department of Respiratory Medicine; c. Department of Clinical Laboratory, Fuxin Mine General Hospital of Liaoning Health Industry Group, Liaoning Fuxin 123000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the clinical significance of detecting serum long non-coding ribonucleic acid (LncRNA)

基金项目: 2019年辽宁省自然科学基金指导计划 (2019034017)。

作者简介: 冯华 (1984-), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 儿内科临床, E-mail: fhdoctorxmz@163.com。

metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase- antisense RNA1 (NNT-AS1) in children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia (RMPP). **Methods** A total of 200 children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia who were admitted to Fuxin Mine General Hospital of Liaoning Health Industry Group from January 1, 2018 to January 1, 2021 were selected. Among them, 43 cases were RMPP (RMPP group), 157 cases were common *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia (common pneumonia group), another 100 healthy children were selected as the control group. The expression levels of serum LncRNA MALAT1 and LncRNA NNT-AS1 and the levels of inflammatory factors [C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] were detected. The correlation between the expression levels of serum LncRNA MALAT1 and LncRNA NNT-AS1 and the levels of inflammatory factors were analyzed. The clinical data were collected, the influencing factors of the incidence of RMPP were analyzed. The expression levels of serum LncRNA MALAT1 and LncRNA NT-AS1 in children with RMPP with different therapeutic effects were compared. **Results** There were significant differences in the levels of serum LncRNA MALAT1 ( $3.26 \pm 0.85$ ,  $1.32 \pm 0.41$  and  $1.05 \pm 0.37$ ), LncRNA NNT-AS1 ( $3.38 \pm 0.92$ ,  $1.41 \pm 0.40$  and  $1.06 \pm 0.39$ ) in RMPP group, common pneumonia group and control group ( $F=335.693$ ,  $335.828$ , all  $P<0.05$ ), and there were significant differences in the levels of serum CRP ( $45.24 \pm 2.01$  mg/L,  $19.02 \pm 3.27$  mg/L and  $3.26 \pm 0.77$  mg/L), PCT ( $1.58 \pm 0.52$   $\mu$ g/L,  $0.82 \pm 0.16$   $\mu$ g/L and  $0.31 \pm 0.09$   $\mu$ g/L), IL-8 ( $42.77 \pm 8.84$   $\mu$ g/L,  $26.35 \pm 5.91$   $\mu$ g/L and  $13.02 \pm 3.79$   $\mu$ g/L), TNF- $\alpha$  ( $9.22 \pm 2.61$   $\mu$ g/L,  $5.02 \pm 1.49$   $\mu$ g/L and  $3.32 \pm 0.96$   $\mu$ g/L) in RMPP group, common pneumonia group and control group ( $F=4207.164$ ,  $457.187$ ,  $410.300$ ,  $214.875$ , all  $P<0.05$ ). Pearson correlation analysis showed that the expression levels of serum LncRNA MALAT1 and LncRNA NNT-AS1 were positively correlated with CRP, PCT, IL-8 and TNF- $\alpha$  ( $r=0.715 \sim 0.922$ , all  $P<0.05$ ). Logistic stepwise regression analysis showed that large lung consolidation [OR(95%CI)= $2.212(1.396 \sim 3.506)$ ], high expression of CRP [OR(95%CI)= $2.111(1.313 \sim 3.392)$ ], high expression of LncRNA MALAT1 [OR(95%CI)= $1.826(1.189 \sim 2.805)$ ], and high expression of LncRNA NNT-AS1 [OR(95%CI)= $1.758(1.149 \sim 2.689)$ ] were risk factors for incidence of RMPP (all  $P<0.05$ ). Among the 43 children with RMPP, 38 cases (effective group) were treated effectively, and 5 cases (ineffective group) were treated effectively. The expression levels of serum LncRNA MALAT1 ( $3.16 \pm 0.24$ ) and LncRNA NT-AS1 ( $3.29 \pm 0.20$ ) in effective group were lower than that in ineffective group ( $4.02 \pm 0.09$ ,  $4.06 \pm 0.10$ ), the differences were statistically significant ( $t=7.869$ ,  $8.406$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** LncRNA MALAT1 and LncRNA NNT-AS1 may be involved in the incidence of RMPP by regulating the inflammatory response, detection of the expression of LncRNA MALAT1 and LncRNA NNT-AS1 can provide reference for the treatment efficacy of RMPP.

**Keywords:** refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia; long non-coding ribonucleic acid; metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1; nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1

肺炎支原体肺炎是小儿常见的呼吸系统感染性疾病,该病具有自限性,大多数患儿病情轻,经大环内酯类抗生素治疗后可痊愈。但是有少部分患儿经足够疗程治疗后临床症状仍未见好转甚至加重,属于难治性肺炎支原体肺炎(refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, RMPP)<sup>[1-2]</sup>。RMPP如若不积极治疗可发展为肺不张、胸腔积液、坏死性肺炎,延长患儿住院时间,增加医疗负担,严重者可导致死亡<sup>[3-4]</sup>。早期识别RMPP有助于规范临床治疗,避免不必要的抗生素暴露,减少严重并发症的发生。现有研究显示RMPP与机体过度炎症反应有关<sup>[5]</sup>。长链非编码核糖核酸(long non-coding ribonucleic acid, LncRNA)是一类长度超过200nt,自主转录的非编码RNA,主要作用为表观遗传、调控转录及转录后基因表达,现有研究显示LncRNA肺腺癌转移相关转录因子1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)可抑制乳腺癌易感基因1(breast cancer susceptibility gene 1,

BRCA1)表达促使中性细胞迁移浸润,诱导炎症因子释放,加重炎症反应<sup>[6]</sup>。LncRNA烟酰胺核苷酸反义转氢酶RNA1(nicotinamide nucleotide transhydrogenase-antisense RNA1, NNTAS1)可通过miR-582-5p/FBXO11信号通路诱导慢性阻塞性肺疾病炎症反应<sup>[7]</sup>。然而,LncRNA MALAT1, LncRNA NNTAS1异常表达是否与RMPP发病有关尚不清楚,本研究拟探讨LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1在RMPP患儿中的表达情况,并分析其与RMPP发病以及治疗疗效的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2018年1月1日~2021年1月1日辽宁省健康产业集团阜新矿总医院收治的200例肺炎支原体肺炎患儿,其中43例为RMPP(RMPP组),男性27例,女性16例;年龄1~12( $6.02 \pm 2.16$ )岁。157例为普通肺炎支原体肺炎(普通肺炎组),男性89例,女性68例,年龄2~12( $6.11 \pm 2.45$ )岁。纳入标准:①病原学检查确认

为肺炎支原体感染;②符合第8版《诸福棠实用儿科学》中肺炎支原体肺炎诊断标准<sup>[8]</sup>;③CT提示肺部感染病灶。排除标准:①并发其它病原菌感染;②并发呼吸道感染、哮喘、慢性肺疾病、免疫性疾病;③肺炎支原体肺炎反复住院者,呼吸伪影干扰CT检查者,病历资料缺失者。RMPP判定标准<sup>[9]</sup>:规律应用大环内酯类抗生素治疗7天及以上仍有发热、咳嗽等临床症状,C反应蛋白(CRP)>40mg/L,肺部影像学加重。另选择同期于辽宁省健康产业集团阜新矿总医院体检健康的100例儿童为对照组,其中男性55例,女性45例,年龄2~10(6.33±2.11)岁。三组受试儿童一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),本研究获得辽宁省健康产业集团阜新矿总医院伦理学委员会批准,患儿监护人均知情同意并签署同意书。

**1.2 仪器与试剂** Trizol试剂(美国Thermo Fisher公司),M-MLV逆转录酶(Epicentre公司),7500型qRT-PCR仪(美国ABI公司)。酶联免疫吸附试验检测试剂盒(美国R&D公司),仪器为瑞士Hamilton FAME全自动酶联免疫分析仪;罗氏Cobas e601型全自动电化学发光免疫分析仪及其配套试剂盒(上海恒斐生物科技有限公司)。

**1.3 方法** 所有患儿于入院后(对照组体检当日)第2天抽取空腹静脉血3ml注入干燥试管,待血液自然凝固后离心10min(3000r/min,半径10cm)取上清液上机检测。Trizol法提取RNA,M-MLV逆转录酶将 $A_{260nm}/A_{280nm}$ 比值位于1.9~2.1的RNA逆转录为cDNA,反应体系20 $\mu$ l,反应条件:16℃15min,42℃5min,95℃30s。qRT-PCR仪检测血清LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1相对表达量,取2 $\mu$ l cDNA样品加入qRT-PCR体系,除cDNA样品外还包括SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(2 $\times$ )12.5 $\mu$ l,dNTP1.6 $\mu$ l,Taq DNA聚合酶1 $\mu$ l,上下游引物10 $\mu$ mol/L各1 $\mu$ l,反应缓冲液5.9 $\mu$ l。反应条件:95℃预变性10min,95℃变性10s,60℃退火20s,72℃延伸10s,一共做40个循环。引物合成及序列测定由上海基康生物技术有限公司完成,引物序列:LncRNA MALAT1,上游:5'-CTCCCCACACAAGCAACTTCTC-3',下游:5'-TTCAACCCACCAAAGACCTC-3';LncRNA NNT-AS1,上游:5'-TGAAGTTTTCAGGGACACAT-3',下游:5'-TTTAGACCTGTTTCTTTGTT-3'; $\beta$ -actin,上游:5'-TGCGTGACATTAAGGAGAA-3',下游:5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGT-3'。以 $\beta$ -actin RNA为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1相对表达量。另取血清样品,采用酶联免疫吸附试验检测血清白细胞介素-8(interleu-

kin-8,IL-8)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )水平。采用罗氏Cobas e601型全自动电化学发光免疫分析仪检测血清CRP,降钙素原(procalcitonin,PCT)水平。

收集并整理所有患儿的临床资料,包括性别、年龄、发病季节、热程、体温、病程、血细胞检测指标(白细胞计数、中性粒细胞计数)、影像学特点(受累肺部范围、有无肺大片实变影、有无胸腔积液)、肺外并发症(食欲不振、嗜睡、呕吐、心率加快等)。

临床治疗以及疗效评价:按照《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版)》<sup>[9]</sup>治疗原则给予退热、止咳、平喘等支持治疗,并给予米诺环素口服治疗,首剂顿服4mg/kg,后2mg/(kg·d),12h/次,连续治疗5天。同时增加甲泼尼龙1~2mg/(kg·d)静脉点滴治疗,疗程3~5天,后改为口服1mg/(kg·d)治疗5~7天。呼吸道黏液阻塞患儿给予支气管镜治疗。疗效标准<sup>[10]</sup>:显效:治疗后体温恢复正常,咳嗽症状消失,肺喘鸣音及啰音消失,胸片或CT示阴影消失;有效:治疗后体温基本恢复正常,咳嗽症状缓解,肺部喘鸣音及啰音明显减少,胸片或CT显示阴影吸收;无效:治疗后体温、咳嗽症状、肺部喘鸣音及啰音无明显改善或加重,胸片或CT示阴影无明显变化或明显加重。以显效和有效为有效,43例RMPP患儿治疗有效38例(有效组),无效5例(无效组)。

**1.4 统计学分析** SPSS 25.0进行数据分析。K-S法检验计量资料拟合优度,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示正态分布计量资料,以中位数( $P_{25},P_{75}$ )[M( $Q_1,Q_3$ )]表示偏态计量资料,分别采用单因素方差分析(两两对比采用LSD- $t$ 检验),Wilcoxon秩和检验。以率(%)表示计数资料,采用 $\chi^2$ 检验。Pearson相关系数描述血清LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1表达与炎症因子之间的相关性。Logistic逐步回归分析RMPP发生的影响因素。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 三组血清LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1及炎症因子水平比较** 见表1。RMPP组血清LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1及CRP,PCT,IL-8,TNF- $\alpha$ 水平高于普通肺炎组( $t=21.087,20.704,50.002,15.858,14.366,13.653$ ,均 $P=0.000$ )和对照组( $t=21.356,21.235,180.879,23.716,28.244,19.777$ ,均 $P=0.000$ ),差异均有统计学意义。普通肺炎组血清LncRNA MALAT1,LncRNA NNT-AS1及CRP,PCT,IL-8,TNF- $\alpha$ 水平高于对照组,差异均有统计学意义( $t=5.343,6.905,47.336,29.067$ ,

20.071, 10.143, 均  $P=0.000$  )。

2.2 血清 LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1 表达与炎症因子的相关性 RMPP 组血清 LncRNA

MALAT1, LncRNA NNT-AS1 表达水平与 CRP, PCT, IL-8, TNF- $\alpha$  水平均呈正相关 ( $r=0.922, 0.823, 0.786, 0.821; 0.873, 0.715, 0.804, 0.812$ , 均  $P=0.000$  )。

表 1 三组血清 LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1 及炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	RMPP 组 ( $n=43$ )	普通肺炎组 ( $n=157$ )	对照组 ( $n=100$ )	F 值	P 值
LncRNA MALAT1	3.26 $\pm$ 0.85	1.32 $\pm$ 0.41	1.05 $\pm$ 0.37	335.693	0.000
LncRNA NNT-AS1	3.38 $\pm$ 0.92	1.41 $\pm$ 0.40	1.06 $\pm$ 0.39	335.828	0.000
CRP (mg/L)	45.24 $\pm$ 2.01	19.02 $\pm$ 3.27	3.26 $\pm$ 0.77	4 207.164	0.000
PCT ( $\mu$ g/L)	1.58 $\pm$ 0.52	0.82 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.09	457.187	0.000
IL-8 ( $\mu$ g/L)	42.77 $\pm$ 8.84	26.35 $\pm$ 5.91	13.02 $\pm$ 3.79	410.300	0.000
TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	9.22 $\pm$ 2.61	5.02 $\pm$ 1.49	3.32 $\pm$ 0.96	214.875	0.000

2.3 RMPP 发病的影响因素 RMPP 组热程、体温、病程、白细胞计数、中性粒细胞计数、肺受累范围  $\geq 2/3$  肺叶人数占比、肺大片实变影人数占比、肺外并发症发生率均大于普通肺炎组, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 两组在年龄、性别、发病季节、有无胸腔积液方面比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 见表 2。以是否患 RMPP 为因变量, 以 LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1, CRP,

PCT, IL-8, TNF- $\alpha$ , 热程、体温、病程、白细胞计数、中性粒细胞计数、受累肺部范围、肺大片实变影、肺外并发症为自变量纳入 Logistic 逐步回归分析, 向后逐步法排除无关变量, 结果显示肺大片实变影、CRP 高表达、LncRNA MALAT1 高表达、LncRNA NNT-AS1 高表达是 RMPP 发病的危险因素 (均  $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 RMPP 组和普通肺炎组临床资料比较 [ $\bar{x} \pm s$ ,  $n(\%)$ ,  $M(Q_1, Q)$ ]

类别	RMPP 组 ( $n=43$ )	普通肺炎组 ( $n=157$ )	$t/z/\chi^2$ 值	P 值
年龄 (岁)	6.02 $\pm$ 2.16	6.11 $\pm$ 2.45	0.219	0.827
性别				
男	27 (62.79)	89 (56.69)	0.516	0.473
女	16 (37.21)	68 (43.31)		
热程 (天)	9.05(6,12)	5.14(3,7)	14.673	0.000
体温 ( $^{\circ}\text{C}$ )	38.85 $\pm$ 0.72	38.21 $\pm$ 0.63	5.719	0.000
病程 (天)	13.15 $\pm$ 2.60	10.05 $\pm$ 2.55	7.034	0.000
发病季节				
春夏	20 (46.51)	70 (44.59)	0.051	0.822
秋冬	23 (53.49)	87 (55.41)		
白细胞计数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )	13.22(10,15)	8.87(7,10)	10.217	0.000
中性粒细胞计数 (%)	81.05(77,91)	74.69(65,83)	5.872	0.000
受累肺部范围				
$< 2/3$ 肺叶	16 (37.21)	101 (64.33)	10.228	0.001
$\geq 2/3$ 肺叶	27 (62.79)	56 (35.67)		
肺大片实变影				
有	28 (65.12)	40 (25.48)	23.635	0.000
无	15 (34.88)	117 (74.52)		
胸腔积液				
有	6 (13.95)	30 (19.11)	0.608	0.436
无	37 (86.05)	127 (80.89)		
肺外并发症				
有	33 (76.74)	46 (29.30)	31.795	0.000
无	10 (23.26)	111 (70.70)		



表3 RMPP发病影响因素的 Logistic 逐步回归分析

变量	$\beta$	SE	Wald $\chi^2$	OR(95%CI)	P 值
肺大片实变影	0.794	0.235	11.415	2.212 ( 1.396 ~ 3.506 )	0.000
LncRNA MALAT1 高表达	0.602	0.219	7.556	1.826 ( 1.189 ~ 2.805 )	0.003
LncRNA NNT-AS1 高表达	0.564	0.217	6.755	1.758 ( 1.149 ~ 2.689 )	0.005
CRP 高表达	0.747	0.242	9.528	2.111 ( 1.313 ~ 3.392 )	0.000

2.4 不同疗效 RMPP 血清 LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1 表达水平比较 有效组血清 LncRNA MALAT1 (  $3.16 \pm 0.24$  ), LncRNA NNT-AS1 (  $3.29 \pm 0.20$  ) 表达水平低于无效组 (  $4.02 \pm 0.09, 4.06 \pm 0.10$  ), 差异有统计学意义 (  $t=7.869, 8.406$ , 均  $P < 0.05$  )。

### 3 讨论

肺炎支原体肺炎是儿童社区获得性肺炎最常见的形式之一, 虽然肺炎支原体感染通常具有自限性, 但仍有部分病例在大环内酯类抗生素治疗 7 天或更长时间后仍未得到缓解。难治性肺炎支原体肺炎 (RMPP) 的发病原因复杂, 与大环内酯类耐药、并发其它病原体感染和免疫紊乱等有关。RMPP 与普通性肺炎支原体肺炎具有相似临床症状, 发病早期难以鉴别, 当 RMPP 确诊时患儿可能已经出现严重的肺部损伤和肺外并发症, 延误治疗时机, 加之抗生素滥用、耐药以及糖皮质激素的不规范使用, 导致治疗难度大大增加。因此亟需找到可早期诊断 RMPP 发生的指标。近年来国内外研究普遍认为细胞免疫介导的炎症反应与 RMPP 有关, 炎症因子的过度合成和释放被认为是引起 RMPP 的主要相关因素<sup>[5,11]</sup>。

LncRNA 是具有高度组织特异性的 RNA, 人类和哺乳动物大多数基因组产物以 LncRNA 形式存在, LncRNA 可调节绝大多数生理和病理过程, 具有调控表观遗传、转录后调节基因表达、调控微小 RNA, 基因结构重塑、组蛋白修饰等多种生物学功能<sup>[12]</sup>。现有研究显示多种 LncRNA 参与炎症反应调节过程, 在急性痛风性关节炎、慢性阻塞性肺疾病、溃疡性结肠炎等炎症性疾病中发挥重要作用<sup>[13-15]</sup>。

LncRNA MALAT1 是最早被鉴定的与人类疾病相关的 LncRNA 之一, 已知其参与多种恶性肿瘤的进展和转移过程<sup>[16]</sup>。近期发现 LncRNA MALAT1 在炎症疾病中也起着重要的调节作用, LncRNA MALAT1 通过调控 miR146a/核因子  $\kappa$  B (NF  $\kappa$  B) 促炎信号通路参与脂多糖诱导的急性肾损伤发病过程<sup>[17]</sup>。LncRNA MALAT1 还可通过 miR149 / 髓样分化因子 88 (MyD88) / NF  $\kappa$  B 轴调控炎症因子 TNF- $\alpha$ , 白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 -6 释放, 在脂多糖诱导的急性肺损伤中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。LncRNA MALAT1 是否参与 RMPP 发病尚不清

楚, 本研究发现 RMPP 组血清 LncRNA MALAT1 表达水平明显上调, LncRNA MALAT1 表达水平与炎症因子 CRP, PCT, IL-8, TNF- $\alpha$  水平均呈正相关, Logistic 逐步回归分析结果表明 LncRNA MALAT1 高表达是 RMPP 发病的危险因素, 说明 LncRNA MALAT1 可能通过调控炎症因子表达参与 RMPP 发病。CAO 等<sup>[19]</sup> 人研究结果显示 LncRNA MALAT1 过表达可通过 miR181c5p/ 高迁移率族 1 (HMGB1) 轴加剧缺血性脑组织炎症反应, 敲低 LncRNA MALAT1 可下调 HMGB1 表达, 抑制炎症反应, 说明 LncRNA MALAT1 在炎症疾病中发挥促炎作用机制, 支持本研究结论。推测 LncRNA MALAT1 参与 RMPP 发病的机制为: NF  $\kappa$  B 参与肺炎支原体肺炎的炎症反应过程<sup>[20]</sup>, LncRNA MALAT1 异常表达依赖 NF  $\kappa$  B, LncRNA MALAT1 通过与 NF  $\kappa$  B 相互作用参与炎症反应调节过程<sup>[21]</sup>, 因此 LncRNA MALAT1 可能通过调节 NF  $\kappa$  B 活化来调节炎症反应, 诱导 RMPP 发生。

LncRNA NNT-AS1 是一种新发现的细胞质 LncRNA, 定位于人类 5 号染色体, 通过与 miRNA 竞争性影响多种信号通路调控大量下游基因表达参与恶性肿瘤发生和发展<sup>[22]</sup>。MEI 等<sup>[7]</sup> 人发现 LncRNA NNT-AS1 通过调节 miR-582-5p / FBXO11 信号促使气道炎症反应和重塑, 提示 LncRNA NNT-AS1 具有炎症调节作用。本研究发现 LncRNA NNT-AS1 在 RMPP 组表达水平明显上调, LncRNA NNT-AS1 高表达是 RMPP 发病的危险因素之一, 说明 LncRNA NNT-AS1 与 RMPP 发病有关。MEI 等<sup>[7]</sup> 人报道显示 LncRNA NNT-AS1 在香烟烟雾提取物处理的 16HBE 细胞中表达上调, 敲低 LncRNA NNT-AS1 表达可抑制消除香烟烟雾提取物介导的气道炎症反应, 说明 LncRNA NNT-AS1 在气道炎症疾病中发挥促炎作用, 该作用与 LncRNA NNT-AS1/miR-582-5p/FBXO11 信号轴调控作用有关。本研究相关性分析结果显示 LncRNA NNT-AS1 表达水平与炎症因子 CRP, PCT, IL-8, TNF- $\alpha$  水平呈正相关, 推测 LncRNA NNT-AS1 过表达可能通过促进炎症反应, 诱导和扩大肺部炎症反应, 参与 RMPP 发病过程。本研究 Logistic 逐步回归分析显示 CRP 高表达、肺大片实变影与 RMPP 发病也密

切相关,翟佳羽等<sup>[23]</sup>报道也指出肺部影像学表现加重是识别RMPP的影像学指标,血清CRP水平升高是RMPP的独立危险因素,提示血清CRP水平、肺大片实变影也可作为鉴别普通肺炎支原体肺炎和RMPP的依据,临床可结合患儿肺部CT及血清CRP, LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1检测进行综合评估。本研究无效组血清LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1表达高于有效组,提示血清LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1表达与RMPP临床治疗疗效也存在密切关系,可作为评估临床疗效的指标。

综上, RMPP患儿血清LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1均呈高表达,且LncRNA MALAT1, LncRNA NNT-AS1与RMPP发病、机体炎症反应以及临床治疗效果均有关。

#### 参考文献:

- [1] 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]. Respiratory Research, 2019, 20(1): 193.
- [2] 屠昌明, 田园. 支原体肺炎患儿外周血Th17, Treg细胞亚群和细胞因子表达及CRP, PCT水平的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 108-111.  
TU Changming, TIAN Yuan. Expression of Th17 and Treg cell subsets and cytokines in peripheral blood of children with *Mycoplasma pneumoniae* and study on CRP and PCT levels [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 108-111.
- [3] 刘宇焱, 张晗, 尚云晓. 难治性肺炎支原体肺炎患儿肺泡灌洗液中肺炎支原体-DNA载量检测在病情评估中的临床意义[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(6): 447-451.  
LIU Yuhan, ZHANG Han, SHANG Yunxiao. Clinical significance of *Mycoplasma pneumoniae*-DNA load detection in alveolar lavage fluid of children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Chinese Pediatric Emergency Medicine, 2020, 27(6): 447-451.
- [4] 秦文卿, 张慧, 陈刚, 等. 难治性肺炎支原体肺炎患儿血清炎性细胞因子变化的临床意义及其危险因素分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(17): 3301-3304.  
QIN Wenqing, ZHANG Hui, CHEN Gang, et al. Clinical significance of changes in serum inflammatory cytokines and its risk factors in children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2020, 20(17): 3301-3304.
- [5] 周朋, 周旭, 张葆青. 儿童难治性支原体肺炎发病机制研究进展[J]. 山东医药, 2016, 56(42): 103-105.  
ZHOU Peng, ZHOU Xu, ZHANG Baoqing. Research progress on the pathogenesis of refractory *Mycoplasma pneumoniae* in children [J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(42): 103-105.
- [6] YONG Hui, WU Gangming, CHEN Jingyuan, et al. LncRNA MALAT1 accelerates skeletal muscle cell apoptosis and inflammatory response in sepsis by decreasing BRCA1 expression by recruiting EZH2 [J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2020, 19: 97-108.
- [7] MEI Jingjing, ZHANG Yuan, LU Shuangshuang, et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 regulates proliferation, apoptosis, inflammation and airway remodeling of chronic obstructive pulmonary disease via targeting miR-582-5p/FBXO11 axis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 129(5): 110326.
- [8] 江载芳, 申昆玲, 沈颖. 诸福棠实用儿科学 [M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1280-1282.  
JIANG Zaifang, SHEN Kunling, SHEN Ying. Zhu Futang practical pediatrics [M]. 8th Ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2015: 1280-1282.
- [9] 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 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.  
Respiratory Branch of Chinese Pediatric Society of Chinese Medical Association, Editorial Board of *Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics*. Expert consensus on diagnosis and treatment of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children (2015) [J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [10] 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(试行)(上) [J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(2): 83-90.  
Respiratory Branch of Chinese Pediatric Society of Chinese Medical Association, Editorial Committee of *Chinese Journal of Pediatrics*. Guidelines for management of childhood community acquired pneumonia (for trial implementation) (I) [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2007, 45(2): 83-90.
- [11] 张巧, 符州, 田代印. 儿童难治性肺炎支原体肺炎发病机制及治疗研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(6): 61-63.  
ZHANG Qiao, FU Zhou, TIAN Daiyin. Mechanism and treatment of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children [J]. Journal of Pediatric Pharmacy, 2019, 25(6): 61-63.
- [12] TANG Qing, HANN S S. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in human cancer [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 47(3): 893-913.
- [13] ZHANG Xifeng, ZOU Ying, ZHENG Jiangxia, et al. LncRNA-MM2P downregulates the production of pro-inflammatory cytokines in acute gouty arthritis [J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(3): 2227-2234.

- Research & Therapy, 2020, 11(1): 260.
- [15] JEYARAM A, JAY S M. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications[J]. The AAPS Journal, 2017, 20(1): 1.
- [16] YUAN Ping, DING Lu, CHEN Huili, et al. Neural stem cell-derived exosomes regulate neural stem cell differentiation through miR-9-Hes1 axis[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 601600.
- [17] ZHANG Lei, GAO Jianyi, CHEN Tianyan, et al. Microvesicles derived from human embryonic neural stem cells inhibit the apoptosis of HL-1 cardiomyocytes by promoting autophagy and regulating AKT and mTOR via transporting HSP-70[J]. Stem Cells International, 2019, 2019: 6452684.
- [18] ZHONG Dong, CAO Yong, LI Chengjun, et al. Neural stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis[J]. Experimental Biology and Medicine (Maywood), 2020, 245(1): 54-65.
- [19] 张玮, 唐卉凌, 王筠, 等. 大鼠大脑皮质神经元原代培养不同培养体系及纯化方法的比较研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1043-1046.
- ZHANG Wei, TANG Huiling, WANG Jun, et al. Comparative study on cortical neuron primary culture system and purification in two groups of rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(6): 1043-1046.
- [20] WU Zhiming, WANG Huang, FANG Sunyang, et al. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury in HepG2 cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 18(5): 4163-4174.
- [21] WANG Xueqin, HE Xuemei, DENG Xian, et al. Roles of miR-4463 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(3): 3242-3252.
- [22] 马大亮, 崔红莉, 荣卫江, 等. 柴胡皂苷 A 减轻脑缺血再灌注大鼠海马神经元损伤[J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(5): 569-574.
- MA Daliang, CUI Hongli, RONG Weijiang, et al. Saikosaponin A attenuates hippocampal neuron damage in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2021, 39(5): 569-574.

收稿日期: 2021-09-06

修回日期: 2021-11-21

(上接第12页)

- [14] LI Nannan, LIU Yuan, CAI Jingfen. LncRNA MIR155HG regulates M1/M2 macrophage polarization in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 117(24): 109015.
- [15] GENG Hua, BU Hengfu, LIU Fangyi, et al. In inflamed intestinal tissues and epithelial cells, interleukin 22 signaling increases expression of H19 long noncoding RNA, which promotes mucosal regeneration[J]. Gastroenterology, 2018, 155(1): 144-155.
- [16] SUN Yutong, MA Li. New insights into long non-coding RNA MALAT1 in cancer and metastasis[J]. Cancers, 2019, 11(2): 216.
- [17] DING Ying, GUO Feng, ZHU Tao, et al. Mechanism of long non-coding RNA MALAT1 in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury is mediated by the miR-146a/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(1): 446-454.
- [18] LIANG Weijun, ZENG Xiaoyuan, JIANG Shali, et al. Long non-coding RNA MALAT1 sponges miR-149 to promote inflammatory responses of LPS-induced acute lung injury by targeting MyD88[J]. Cell Biology International, 2020, 44(11): 317-326.
- [19] CAO Dingwei, LIU Manman, DUAN Rui, et al. The lncRNA MALAT1 functions as a ceRNA to contribute to berberine-mediated inhibition of HMGB1 by sponging miR-181c-5p in poststroke inflammation[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2020, 41(1): 22-33.
- [20] 李勇, 潘秋亚, 朱寿华. 儿童支原体肺炎患者血清中 NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  的表达及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(5): 87-89, 93.
- LI Yong, PAN Qiuya, ZHU Shouhua. Expression and its significance of serum NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5): 87-89, 93.
- [21] ZHAO Gui, SU Zhenyi, SONG Dan, et al. The long noncoding RNA MALAT1 regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF- $\kappa$ B[J]. FEBS Letters, 2016, 590(17): 2884-2895.
- [22] ZHOU Cao, DUAN Shiwei. The role of long non-coding RNA NNT-AS1 in neoplastic disease[J]. Cancers, 2020, 12(11): 3086.
- [23] 翟佳羽, 林烈桔, 麦朗君, 等. 难治性肺炎支原体肺炎患儿临床特点及危险因素分析[J]. 临床儿科杂志, 2017, 35(8): 569-574.
- ZHAI Jiayu, LIN Liejie, MAI Langjun, et al. Clinical characteristics and risk factors of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children [J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2017, 35(8): 569-574.

收稿日期: 2021-08-11

修回日期: 2021-09-23