

本文引用:王玉,宋会杰,吴万方,等.益生菌对脓毒症患儿外周血淋巴细胞焦亡的影响及机制[J].新乡医学院学报,2023,40(6):523-529. DOI:10.7683/xyxyxb.2023.06.004.

【临床研究】

益生菌对脓毒症患者外周血淋巴细胞焦亡的影响及机制

王 玉，宋会杰，吴方方，杨中文，高 丽

(河南大学人民医院儿科,河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 观察益生菌对脓毒症患儿外周血淋巴细胞焦亡的影响,探讨益生菌的免疫调节作用机制。**方法** 选择 2019 年 1 月至 2020 年 12 月河南省人民医院儿童重症监护病房收治的 109 例脓毒症患儿为研究对象,按随机数字表法将患儿分为对照组($n=55$)和观察组($n=54$),对照组患儿采用常规治疗,观察组患儿在常规治疗的基础上给予复方嗜酸乳杆菌口服片。采集所有患儿的性别、年龄、小儿危重病例评分(PCIS)、序贯器官衰竭估计评分(SOFA)、原发病类型及发生严重脓毒症比例、脓毒症休克比例、血清白蛋白(ALB)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血肌酐(Scr)水平。治疗 8 d 后,取患儿外周血分离血浆和淋巴细胞,应用定量反转录聚合酶链反应法检测淋巴细胞焦亡相关分子 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、消皮素 D(GSDMD)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)mRNA 及微RNA-224-3p(miR-224-3p)表达水平,应用化学荧光法及流式细胞术检测淋巴细胞的焦亡活性及焦亡比例,应用酶联免疫吸附试验法检测患儿血浆中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)水平,记录 2 组患儿二次感染率、住院病死率、住院时间和机械通气时间,应用 Pearson 法分析淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平的相关性,应用 logistic 进行二次感染影响因素的多因素回归分析。**结果** 109 例患儿中有 4 例自动出院(对照组 1 例,观察组 3 例),最终纳入 105 例患儿。2 组患儿的性别、年龄、PCIS 评分、SOFA 评分、严重脓毒症比例、脓毒症休克比例、各类原发疾病比例及 ALB、ALT、Scr 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。观察组患儿淋巴细胞中 NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 及 miR-224-3p 水平显著低于对照组($P<0.05$)。观察组患儿淋巴细胞内绿色荧光强度显著低于对照组($P<0.05$)。观察组患儿外周血淋巴细胞的早期焦亡比例和晚期焦亡比例显著低于对照组($P<0.05$)。观察组患儿二次感染率显著低于对照组($\chi^2=4.543, P<0.05$);观察组与对照组患儿住院病死率、住院时间及机械通气时间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组患儿血浆中 IL-1 β 、IL-18 水平显著低于对照组($P<0.05$)。脓毒症患儿淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平呈正相关($r=0.623\ 7, P<0.05$)。淋巴细胞焦亡比例($OR=1.597, P<0.05$)和住院时间($OR=1.588, P<0.05$)是发生二次感染的独立危险因素。**结论** 脓毒症患儿外周血淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与其焦亡活性密切相关,益生菌可下调 miR-224-3p 水平,抑制免疫细胞焦亡,缓解全身炎症反应,改善临床预后。

关键词: 脓毒症;焦亡;微生态;儿童;免疫

中图分类号: R725 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)06-0523-07

Effect and mechanism of probiotics on pyroptosis of peripheral lymphocytes in children with sepsis

WANG Yu, SONG Huijie, WU Fangfang, YANG Zhongwen, GAO Li

(Department of Pediatrics, People's Hospital of Henan University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

Abstract: Objective To observe the effects of probiotics on pyroptosis of peripheral lymphocytes in children with sepsis, and to explore the immunoregulatory mechanism of probiotics. **Methods** A total of 109 septic children admitted to Pediatric Intensive Care Unit, People's Hospital of Henan University from January 2019 to December 2020 were selected as the research objects, and they were divided into control group ($n = 55$) and observation group ($n = 54$) according to random number table. The children in the control group was treated with regular therapy; the children in the observation group were given compound eosinophil-lactobacillus tablets on the basis of routine treatment. The gender, age, pediatric critical illness score (PCIS), sequential organ failure assessment (SOFA) score, primary disease ratio, severe sepsis ratio, sepsis shock ratio, and serum albumin (ALB), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine (Scr) levels of all children were collected. The plasma and lymphocytes were isolated from peripheral blood of children after 8 days of treatment, the expression levels of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), gasdermin-D (GSDMD), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1) mRNA and microRNA-224-3p (miR-224-3p) were detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. The pyroptotic activation and percentages of pyroptotic lymphocytes of children were detected by chemiluminescence and flow cytometry, respectively. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) in plasma were detected by enzyme

DOI:10.7683/xxxyxyxb.2023.06.004

收稿日期:2022-01-12

基金项目:河南省医学科技攻关计划省部共建项目资助(编号:SBGJ202102018)。

作者简介:王 玉(1978-),女,河南郑州人,博士,主任医师,主要从事临床营养与危重症研究。

linked immunosorbent assay. And the incidence of secondary infection, hospital mortality rate, hospitalization stay and duration of ventilation of children in the two groups were also observed. The correlation between the miR-224-3p level in lymphocyte and caspase-1 mRNA level was analyzed by Pearson method. The influencing factor of secondary infection were analyzed by logistic multivariate regression analysis. **Results** Four patients left hospital voluntarily in 109 patients (1 case in the control group and 3 cases in the observation group). There was no significant difference in sex, age, PCIS score, SOFA score, severe sepsis ratio, sepsis shock ratio, primary disease ratio, levels of ALB, ALT and Scr of children between the two groups ($P > 0.05$). The expression levels of NLRP3, GSDMD, caspase-1 mRNA and miR-224-3p of children in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The green fluorescence intensity in lymphocytes of children in the observation group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The percentage of pyroptotic cells in early pyroptotic phase and later pyroptotic phase in peripheral lymphocytes of children in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The secondary infection rate of children in the observation group was significantly lower than that in the control group ($\chi^2 = 4.543, P < 0.05$); there were no statistically significant differences in the hospital mortality rate, hospitalization stay, duration of ventilation of children between the observation group and control group ($P > 0.05$). The levels of plasma IL-1 β and IL-18 of children in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). The level of miR-224-3p in lymphocytes of children with sepsis was positively correlated with the level of caspase-1 mRNA ($r = 0.6237, P < 0.05$). The percentage of pyroptotic lymphocyte ($OR = 1.597, P < 0.05$) and hospitalization stay ($OR = 1.588, P < 0.05$) were independent risk factors for secondary infection. **Conclusion** The levels of miR-224-3p were closely associated to pyroptotic activation of peripheral lymphocytes of septic children. Probiotics can decrease miR-224-3p levels, inhibit pyroptosis in immune cells, alleviate systematic inflammatory reaction, improve prognosis of the septic patients.

Key words: sepsis; pyroptosis; microbiota; child; immunology

免疫功能紊乱贯穿脓毒症的始终,对脓毒症的发展及预后起着关键作用^[1]。近年来虽然有关脓毒症免疫治疗的相关研究很多,但基本集中于免疫细胞凋亡方面^[2]。近期研究表明,焦亡作为一种新发现的促炎症细胞程序性死亡模式,其在免疫细胞中的过度激活是形成免疫紊乱的重要因素^[3]。微RNA(microRNA, miRNA)是一种参与基因表达和蛋白质翻译的进化保守的非编码小分子RNA,其在调控细胞焦亡中发挥着重要的介导作用^[4]。本课题组前期研究发现,将益生菌应用于脓毒症患者后,可以有效改善患儿的免疫功能及临床预后;而且经过高通量测序显示,脓毒症患儿的血浆 miR-224-3p 水平与对照组比较具有显著性差异^[5],但在脓毒症的治疗过程中是否涉及免疫细胞焦亡活性的改变,以及 miR-224-3p 与焦亡水平是否存在相关性,目前尚不清楚。因此,本研究通过观察脓毒症患者外周血淋巴细胞的焦亡活性及其相关因素的变化,探讨益生菌的免疫调节机制,旨在为进一步改善患儿预后提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月至 2020 年 12 月河南省人民医院儿童重症监护病房收治的 150 例脓毒症患者为研究对象。病例纳入标准:(1)符合《国际严重脓毒症与脓毒症休克治疗指南》中的儿童脓毒症诊断标准^[6];(2)符合危重症诊断标准^[7],即小儿危重病例评分(pediatric critical illness score, PCIS) ≤ 90 分。排除标准:(1)患有慢性肝肾功能不全、代谢性疾病、免疫缺陷病;(2)行放化疗的恶性肿瘤患儿;(3)近 3 个月内使用过糖皮质激素等免疫抑制

剂或调节剂的患儿;(4)近 3 个月内服用过益生菌的患儿;(5)肠造瘘及短肠综合征患儿;(6)住院期间采用血液透析或体外膜氧合治疗的患儿;(7)患儿家长拒绝签署知情同意书。最终 109 例患儿入选,按随机数字表法将患儿分为对照组($n = 55$)和观察组($n = 54$)。本研究经医院伦理委员会审核批准(编号:201609175),患儿的监护人均签署知情同意书。

1.2 治疗方法 所有患儿给予常规抗感染治疗及支持对症处理:(1)每例患儿给予头孢哌酮-舒巴坦(美国辉瑞制药有限公司,进口药品注册证号 H20022597) $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,静脉滴注,每日 3 次;(2)参照《儿童脓毒性休克(感染性休克)诊治专家共识(2015 版)》^[8],患儿入院后给予口服或鼻饲喂养,不能耐受或禁食者给予中心静脉营养,维持每日 $60 \sim 90 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的热量所需。在常规治疗的基础上,观察组患儿给予复方嗜酸乳杆菌口服片(吉林通化金马药业有限公司,国药准字 H1094114;每片含中国株和日本株嗜酸乳杆菌 5×10^6 个) 1 片,加入葡萄糖水中口服或予以鼻饲,每日 3 次,连用 8 d;对照组患儿服用外观、口感一致的等量葡萄糖水。研究期间对所有受试者进行随机分配隐藏,研究者和受试者对分组及检测结果均不清楚,直至试验结束。

1.3 一般临床资料采集 记录所有入组患儿的性别、年龄、PCIS 评分、序贯器官衰竭估计评分(sequential organ failure assessment, SOFA)、原发病类型及发生严重脓毒症患者所占比例、发生脓毒症休克患儿所占比例、血清白蛋白(albumin, ALB)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、血

肌酐 (serum creatinine, Scr) 水平;并观察其院内二次感染^[9]发生率、住院病死率、住院时间及机械通气时间。

1.4 外周血血浆及淋巴细胞分离 治疗后 8 d,采集患儿上肢静脉血 3 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝管中,3 000 r·min⁻¹离心 5 min,吸取上层血浆,置于-80 ℃冰箱保存备用。于离心后剩余的血细胞中加入等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solation, PBS)吹打混匀,用滴管将稀释后的血细胞缓慢叠加于 Ficoll 分离液上;室温下 2 000 r·min⁻¹离心 15 min,收集白色淋巴细胞层,与 2 mL PBS 混匀后 1 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清液,留取管底细胞;再次加入 PBS 2 mL 混匀离心,弃去上清液,重复 2 次后即得淋巴细胞,调整细胞浓度为(3~5)×10⁹ L⁻¹备用。

1.5 定量反转录聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)法检测淋巴细胞焦亡相关分子 mRNA 表达水平 采用 qRT-PCR 法检测淋巴细胞焦亡相关分子 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、消皮素 D (gasdermin-D, GSDMD)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, caspase-1) mRNA 及 miR-224-3p 表达水平。应用 RNA 抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)将淋巴细胞裂解并转移至纯化柱内,经反复洗涤得到纯化 RNA,应用分光光度计测定 RNA 浓度。NLRP3、GSDMD 及 caspase-1 使用 mRNA 反转录试剂盒(德国 Qiagen 公司)进行反转录,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,使用荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)进行 cDNA 扩增;miR-224-3p 使用茎环法反转录试剂盒(美国 EZBio-science 公司)进行反转录,使用 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)进行 cDNA 扩增,以 U6 为内参。各指标均按照说明书配置反转录体系,设定反转录条件:25 ℃ 10 min 变性,37 ℃ 60 min 延伸,70 ℃ 10 min 终止反应,将反转录产物加 80 μL 灭菌注射用水混匀并置于-20 ℃冰箱保存。随后采用 ABI Q5 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行定量 PCR 检测,PCR 引物由武汉擎科生物科技有限公司设计合成, NLRP3 上游引物序列:5'-GC-CGAAGTGGGGTTCAGATA-3',下游引物序列:5'-GCAGTCGTGTGTAGCGTTTG-3'; GSDMD 上游引物序列:5'-GAGTGCCTGGTGTTCCTC-3',下游引物序列:5'-CTTGTGCTGCGTTTCACTCA-3'; caspase-1 上游引物序列:5'-GTGCAGGACAACCCAGCTAT-3',下游引物序列:5'-TGCGGCTTGACTTGTCCATT-3'; miR-224-3p 上游引物序列:5'-GGCAAATGGTGC-

CCTAGTG-3',下游引物序列:5'-ACTGCAGGGTC-CGAGGTATT-3'。实时荧光定量 PCR 条件:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,68 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。

1.6 化学荧光法检测淋巴细胞的焦亡活性 使用 FAM-FLICA caspase-1 检测试剂盒(美国 ITC 公司)检测淋巴细胞中活化的 caspase-1。取 290 μL 淋巴细胞混悬液加入 10 μL 30×FLICA,于 37 ℃ 避光孵育 1 h;加入 Hoechst 33344(体积分数 0.5%),对细胞核进行染色,于 37 ℃ 下孵育 10~20 min;加入 1×Apoptosis Wash Buff,清洗细胞 2 次;再加入 1.5 μL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI),将细胞洗涤后,取部分细胞备存,用于流式细胞仪检测。另取部分细胞,置于 Leica DMI8 荧光显微镜(德国 Leica 公司)下进行观察,其中与活化的 caspase-1 结合的 FLICA 显示为绿色,代表焦亡细胞;Hoechst 33342 标记的活细胞呈蓝色荧光;PI 标记的死亡细胞呈红色荧光。使用 Image J 软件分析淋巴细胞内的绿色荧光强度,绿色荧光强度越高,说明 caspase-1 的活化程度越高,代表淋巴细胞的焦亡活性越强。

1.7 流式细胞术检测淋巴细胞的焦亡比例 将“1.3.4”项留取的细胞用 Fixative 固定,将样本置于 2~8 ℃ 下避光保存,使用 FACS calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)和 flowjoe-v10 软件分析淋巴细胞的焦亡比例。

1.8 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血浆白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)水平 加入 50 μL 待测血浆至样本孔中,按照 ELISA 检测试剂盒说明书步骤操作,应用酶标仪(美国 BIO RAD 公司)在波长 450 nm 处检测各样本孔的吸光度值,代入标准品直线回归方程,计算患儿血浆中 IL-1β、IL-18 水平。

1.9 统计学处理 应用 STATA 软件进行统计学分析;正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;非正态分布的计量资料以中位数(四分位数)表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料以例数及百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平的相关性检验采用 Pearson 相关分析,应用 logistic 回归分析影响二次感染发生率的危险因素;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患儿一般临床特征比较 结果见表 1。109 例患儿中有 4 例自动出院(对照组 1 例,观察组 3 例),最终纳入 105 例患儿,其中男 62 例,女 43

例;年龄 3.0 ~ 13.5 (4.8 ± 2.4) 岁;原发病类型:呼吸系统疾病 49 例 (46.7%), 颅内疾病 37 例 (35.2%), 腹部疾病 12 例 (11.4%), 心血管疾病 4 例 (3.8%), 其他 (术后及创伤) 3 例 (2.9%), 严重脓毒症及脓毒症休克患儿分别为 39 例 (37.1%) 和 23 例 (21.9%)。2 组患儿之间性别、年龄、PCIS 评分、SOFA 评分、严重脓毒症比例、脓毒症休克比例、各类原发疾病比例及 ALB、ALT、Scr 水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 2 组脓毒症患儿一般临床特征比较

Tab.1 Comparison of general clinical features of children between the two groups

临床特征	对照组 (n = 54)	观察组 (n = 51)	χ^2/t	P
性别				
男/例 (%)	32(59.3)	30(58.8)	0.002	0.964
女/例 (%)	22(40.7)	21(41.2)	0.002	0.964
年龄/岁	4.5 ± 2.1	4.8 ± 2.4	0.458	0.650
PCIS 评分	72.9 ± 3.6	73.2 ± 4.1	0.396	0.695
SOFA 评分	3.19 ± 1.1	3.24 ± 1.2	0.491	0.624
原发病				
呼吸道疾病/例 (%)	24(44.4)	25(49.0)	0.221	0.640
颅内疾病/例 (%)	21(38.9)	16(31.4)	0.649	0.420
腹部疾病/例 (%)	5(9.3)	7(13.7)	0.517	0.472
心血管疾病/例 (%)	2(3.7)	2(3.9)	0.003	0.954
其他/例 (%)	2(3.7)	1(2.0)	0.098	0.754
严重脓毒症/例 (%)	20(37.0)	19(37.3)	0.001	0.982
脓毒症休克/例 (%)	12(22.2)	11(21.6)	0.007	0.935
ALB/(g · L ⁻¹)	36.6 ± 5.5	37.7 ± 5.3	0.624	0.537
ALT/(U · L ⁻¹)	35(27,44)	32(20,57)	0.284	0.778
Scr/(μmol · L ⁻¹)	41(32,65)	36(28,56)	0.269	0.789

2.2 2 组患儿淋巴细胞中 NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 及 miR-224-3p 水平比较 结果见表 2。观察组患儿淋巴细胞中 NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 及 miR-224-3p 水平显著低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 2 组患儿淋巴细胞中 NLRP3、GSDMD、caspase-1 mRNA 及 miR-224-3p 水平比较

Tab.2 Comparison of levels of NLRP3, GSDMD, caspase-1 mRNA and miR-224-3p of children between the two groups

组别	n	NLRP3	GSDMD	caspase-1	miR-224-3p ($\bar{x} \pm s$)
对照组	54	3.58 ± 0.66	1.53 ± 0.42	1.75 ± 0.55	3.00 ± 0.51
观察组	51	2.83 ± 0.59	0.95 ± 0.24	1.01 ± 0.28	2.40 ± 0.54
t		3.775	5.332	5.356	3.589
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 2 组患儿淋巴细胞焦亡活性及焦亡比例比较

结果见图 1。荧光显微镜观察显示,对照组和观察组患儿淋巴细胞内绿色荧光强度分别为 12.6 ± 3.0、8.1 ± 1.7;观察组患儿淋巴细胞内绿色荧光的强度显著低于对照组,差异有统计学意义 ($t = 4.502, P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示,对照组患儿淋巴细胞发生早期焦亡的比例为 (6.87 ± 3.53)%, 发生晚期焦亡的比例为 (5.01 ± 1.69)% ;观察组患儿淋巴细胞发生早期焦亡的比例为 (3.24 ± 1.53)%, 发生晚期焦亡的比例为 (1.95 ± 1.16)% ;观察组患儿淋巴细胞的早期焦亡比例和晚期焦亡比例显著低于对照组,差异有统计学意义 ($t = 2.401、3.024, P < 0.05$)。

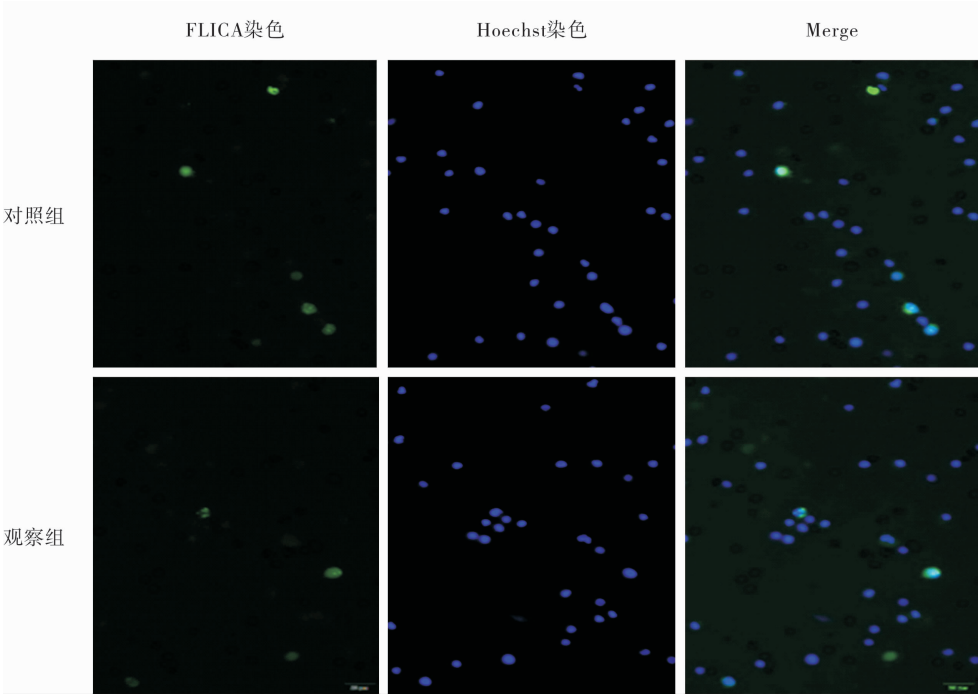
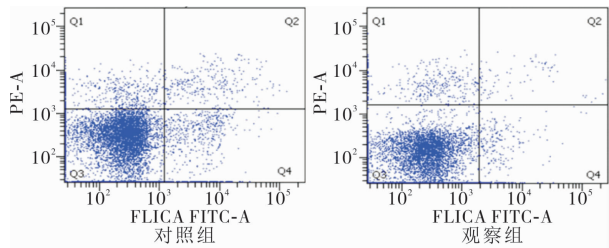


图 1 2 组患儿淋巴细胞焦亡情况

Fig.1 Manifestation of pyroptotic lymphocytes of children in the two groups



Q1:死亡细胞;Q2:发生焦亡且死亡的细胞(晚期焦亡);Q3:活细胞;
Q4:发生焦亡但未死亡的细胞(早期焦亡)。

图2 2组脓毒症患儿淋巴细胞的焦亡比例

Fig.2 Percentage of pyroptotic lymphocyte of children in the two groups

2.4 2组患儿二次感染率、住院病死率、住院时间、机械通气时间及血浆 IL-1β、IL-18 水平比较 结果

表3 2组患儿二次感染率、住院病死率、住院时间、机械通气时间及血浆 IL-18、IL-1β 水平比较

Tab.3 Comparison of incidence of nosocomial infection,hospital mortality rate,hospitalization stay,duration of ventilation and serum IL-18,IL-1β levels of children between the two groups

组别	n	二次感染/例(%)	住院病死率/例(%)	住院时间/d	机械通气时间/h	IL-18/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)
对照组	54	9(16.67)	5(9.26)	7.5±2.6	82.5±10.4	130.97±38.2	43.3±15.6
观察组	51	2(3.92)	3(5.88)	6.9±2.5	79.2±12.7	98.80±18.8	24.3±6.9
χ ² /t		4.543	0.425	1.072	0.847	3.999	5.882
P		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

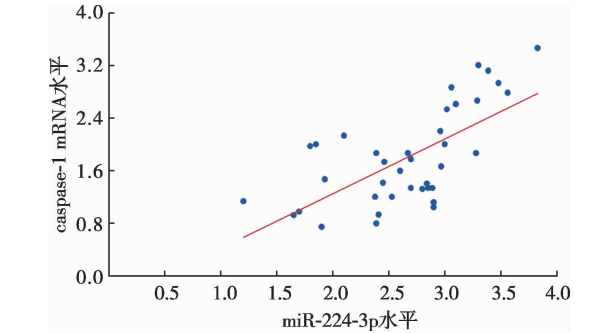


图3 脓毒症患儿淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平的相关性

Fig.3 Association of miR-224-3p level and caspase-1 mRNA level in lymphocytes of septic children

2.6 影响脓毒症患儿二次感染发生率的多因素回归分析 结果见表4。将淋巴细胞焦亡比例、住院时间、机械通气时间及 PCIS 作为自变量,脓毒症儿童二次感染发生率为因变量,纳入多因素 logistic 回归分析,结果显示,淋巴细胞焦亡比例($OR = 1.597, P < 0.05$)和住院时间($OR = 1.588, P < 0.05$)是发生二次感染的独立危险因素。

表4 脓毒症患儿二次感染发生率的多因素回归分析

Tab.4 Multivariate regression analysis for nosocomial infection occurrence in septic children

因素	OR	标准误	Z	P	95%置信区间	
					下限	上限
淋巴细胞焦亡比例	1.597	0.294	2.541	0.011	1.114	2.291
住院时间	1.588	0.340	2.159	0.031	1.044	2.416
机械通气时间	7.727	8.155	1.944	0.053	0.977	61.141
PCIS	1.186	0.192	1.062	0.291	0.864	1.628

见表3。观察组患儿的二次感染率显著低于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.543, P < 0.05$);观察组患儿的住院病死率、住院时间、机械通气时间与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组患儿血浆 IL-1β、IL-18 水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 脓毒症患儿淋巴细胞 miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平的相关性 结果见图3。脓毒症患儿淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与 caspase-1 mRNA 水平呈正相关($r = 0.6237, P < 0.05$)。

3 讨论

脓毒症是重症监护病房中常见的严重感染性疾病,其并发症多,病死率高^[8],一直是重症领域的研究热点。近年许多学者试图从调节免疫细胞方面寻求脓毒症的治疗靶点,至今未发现安全有效的免疫调节剂^[10]。肠道作为引发脓毒症的始动器官之一,具有重要的免疫调节作用,尤其是肠道菌群与免疫细胞之间存在着密切的联系^[11]。当脓毒症发生时儿童的肠道菌群更容易受到干扰和破坏,可导致严重的免疫紊乱^[12];而维持肠道菌群平衡可起到免疫提升作用。本课题组前期研究显示,脓毒症儿童肠道菌群的多样性下降,结构稳定性差,机会致病菌增加,添加益生菌后可以有效维护菌群平衡,改善免疫球蛋白水平及患儿危重症评分、住院时间等指标。益生菌辅助治疗技术易操作,不良反应小,但机制不详,尚未广泛开展^[5,13]。近期研究表明,在肠道菌群干预心肌、脑及肺组织免疫活性的过程中,焦亡信号通路可能是一个潜在重要的免疫调控途径^[14-16]。因此,本研究通过观察脓毒症患儿淋巴细胞内焦亡相关分子的表达和炎症因子水平,以及焦亡活性及焦亡比例的变化情况,并对比益生菌组与对照组之间的差异,以期进一步探讨益生菌的免疫调节机制。

焦亡是一种新发现的依赖 caspase 激活的程序性细胞死亡。当某种病原体及其毒素侵入机体后,即被细胞模式识别受体识别,进而诱导 NLRP3 组装和激活,活化 caspase-1,促进 IL-18 和 IL-1β 前体的

成熟及释放,加重炎症反应。此外 caspase-1 还可以裂解焦亡执行蛋白 GSDMD,在细胞膜上造孔,使细胞破裂溶解,诱发焦亡。Caspase-1 是焦亡信号通路中的主要效应因子,其激活水平也能很好地反映细胞的焦亡活性^[17]。敲除脓毒症小鼠的 caspase-1 基因后发现,小鼠生存率提高,提示 caspase-1 基因敲除对自身组织具有良好的保护作用^[18]。虽然焦亡可以破坏受感染细胞,促使病原体释放而被免疫细胞吞噬及杀灭,以保护机体抵御病原体感染,但焦亡过度激活可在释放大量促炎因子的同时引起免疫功能瘫痪,是脓毒症患者后期罹患二次感染、诱发机体损伤甚至多器官功能衰竭的重要因素^[19-20]。

本研究发现,在脓毒症患者治疗中添加益生菌后,可使其淋巴细胞内 NLRP3、GSDMD 及 caspase-1 水平显著下调;免疫荧光检测也证实,观察组患儿淋巴细胞中 caspase-1 的活化程度显著低于对照组;这提示调整肠道菌群可通过抑制焦亡信号通路中的关键分子 caspase-1,降低其下游分子活性,有效控制淋巴细胞的焦亡水平。此外,本研究结果显示,观察组患儿淋巴细胞发生焦亡尚未死亡(早期焦亡)的比例及发生焦亡并已死亡(晚期焦亡)的比例均显著低于对照组,而且观察组焦亡相关炎症因子的水平显著低于对照组,这说明添加益生菌从整体上抑制了淋巴细胞焦亡的发生率,进而减轻了脓毒症引发的免疫细胞数量下降,同时还可以缓解焦亡过程中引发的过度炎症反应,起到全面的免疫保护作用。目前研究较多的焦亡干预药物还有中药制剂,以作用靶点多为特点,抑制细胞焦亡,保护心脏功能;然而中药成分复杂,剂量与逆转焦亡的效果并非呈简单的正比关系,应用时不易掌握^[21];而益生菌与焦亡水平的量效关系如何,是否存在一个最佳的应用范围,还需要进一步探讨。

已有研究表明,人体内肠道菌群的多种生理功能主要是通过改变菌群代谢产物而实现的^[22],然而,有人认为 miRNA 也可作为肠道菌群的重要作用介质,进一步对焦亡等细胞活动产生影响^[23]。本课题组在前期研究中发现,对脓毒症患者给予益生菌后,共有 7 种血浆外泌体 miRNA 水平具有显著性差异,根据功能预测软件提示,miR-224-3p 与细胞的程序性死亡密切相关。miR-224-3p 属于 miR-224 家族成员之一,其可以通过与靶基因的 3'UTR 结合,阻止翻译的完成,调节机体的炎症反应及细胞凋亡;此外,还可以通过抑制自噬相关蛋白 LC3 的表达,参与细胞自噬的调控,间接对细胞的增殖分化起到下调作用^[24]。由于血浆外泌体具有携带 miRNA 并将其传递给靶向组织的功能^[25],其对外周血淋巴

细胞也会存在潜在的影响。因此,本研究对淋巴细胞中 miR-224-3p 的表达水平进行了检测,结果显示,观察组患儿 miR-224-3p 表达水平较对照组显著降低,而且其与淋巴细胞内 caspase-1 水平呈正相关。这说明随着 miR-224-3p 水平的上升,淋巴细胞的焦亡活性也会相应增加;而益生菌可以通过减少 miR-224-3p 水平,下调淋巴细胞的焦亡活性,从而发挥免疫调理作用。这不仅进一步证实了 miRNA 在肠道菌群调控免疫中的介导作用,成为研究肠道菌群作用机制的新线索,而且为干预细胞焦亡活性提供了新的作用靶点。

据报道,脓毒症患者继发二次感染的危险因素有危重症评分、机械通气及住院时间等^[26];而本研究的多因素回归分析结果显示,除此之外,淋巴细胞焦亡比例同样是二次感染发生的独立危险因素。因此,如果患儿住院时间越长,病情越危重且应用呼吸机辅助治疗,则患儿再次感染的概率就会随之增加;但如果这些因素不易改变,那么从调节淋巴细胞焦亡、改善自身免疫着手,也可以降低脓毒症患者罹患二次感染的概率,且具有更加积极的临床意义。同时,本研究也发现,观察组患儿的二次感染率较对照组显著降低,然而 2 组患儿的住院病死率比较差异无统计学意义,这可能与住院病死率的影响因素较为复杂有关。如果进一步按照患者的病因、年龄及危重程度分层分析,形成系统性的量化标准,可能会更客观地反映出淋巴细胞焦亡对住院病死率的影响以及益生菌的干预效果,这需要今后设计更为合理、规模更大的临床试验予以验证。

综上所述,脓毒症患者外周血淋巴细胞中 miR-224-3p 水平与其焦亡活性密切相关,给予益生菌可下调 miR-224-3p 水平,抑制免疫细胞焦亡,缓解全身炎症反应,改善临床预后。这一发现为在临床实践中探寻更为有效合理的免疫调理措施提供了理论依据,但脓毒症患者淋巴细胞中 miR-224-3p 调控细胞焦亡的具体机制仍未完全明确,还有待今后进一步验证。

参考文献:

- [1] VAN DER POLL T, SHANKAR-HARI M, WIERSINGA W J. The immunology of sepsis[J]. *Immunity*, 2021, 54(11): 2450-2464.
- [2] NEDEVA C. Inflammation and cell death of the innate and adaptive immune system during sepsis[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 1011.
- [3] 姜洁, 吕菁君, 魏捷. 细胞焦亡途径以及细胞焦亡对脓毒症免疫反应的潜在影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(5): 655-658.
- JIANG J, LYU Q J, WEI J. The cell pyroptosis pathway and its po-

- tential effects on immunological reaction in sepsis [J]. *Chin J Emerg Med*, 2019, 28(5): 655-658.
- [4] 邹琪,赵士兵,吴强,等. 脓毒症患者外周血淋巴细胞中微小RNA-126 表达量与细胞凋亡及预后的相关性分析[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(8): 938-942.
- ZOU Q, ZHAO S B, WU Q. Correlation analysis of microRNA-126 expression in peripheral blood lymphocytes with apoptosis and prognosis in patients with sepsis [J]. *Chin Crit Med*, 2020, 32(8): 938-942.
- [5] WANG Y, GAO L, ZHANG Y H, et al. Efficacy of probiotic therapy in full-term infants with critical illness [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2014, 23(4): 575-580.
- [6] LALITHA A V, SATISH J K, REDDY M, et al. Sequential organ failure assessment score as a predictor of outcome in sepsis in pediatric intensive care unit [J]. *J Pediatr Intensive Care*, 2021, 10(2): 110-117.
- [7] 罗永田,孙慧,蒋支贵. 小儿危重病例评分法对儿童重症监护病房患儿的评估效果[J]. 中国医药, 2022, 17(1): 80-83.
- LUO Y T, SUN H, JIANG Z G. Evaluation effect of pediatric critical illness score on children in pediatric intensive care unit [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 80-83.
- [8] 中华医学会儿科学分会急救学组, 中华医学会急诊医学分会儿科学组, 中国医师协会儿童重症医师分会. 儿童脓毒性休克(感染性休克)诊治专家共识(2015 版) [J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(8): 576-580.
- CHINESE MEDICAL ASSOCIATION PEDIATRIC BRANCH EMERGENCY GROUP, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION PEDIATRIC EMERGENCY BRANCH PEDIATRIC GROUP, CHINESE MEDICAL DOCTOR ASSOCIATION PEDIATRIC INTENSIVIST BRANCH. Expert consensus on diagnosis and treatment in pediatric sepsis shock (infectious shock) (2015 edition) [J]. *Chin J Pediatr*, 2015, 53(8): 576-580.
- [9] MART M F, GIRARD T D, THOMPSON J L, et al. Nutritional risk at intensive care unit admission and outcomes in survivors of critical illness [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40(6): 3868-3874.
- [10] MILLER D R, CRAMER S D, THORBURN A. The interplay of autophagy and non-apoptotic cell death pathways [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2020, 352: 159-187.
- [11] ZHOU C B, ZHOU Y L, FANG J Y. Gut microbiota in cancer immune response and immunotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(7): 647-660.
- [12] BROKATZKY D, MOSTOWY S. Pyroptosis in host defence against bacterial infection [J]. *Dis Model Mech*, 2022, 15(7): dmm049414.
- [13] 王玉,杨中文,程艳波,等. 脓毒症儿童的肠道菌群特征及益生菌的干预作用[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2021, 41(6): 440-447.
- WANG Y, YANG Z W, CHENG Y B, et al. Characteristics of gut microbiota in children with sepsis and influence of probiotic supplementation [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2021, 41(6): 440-447.
- [14] LUO Q, SHI R, LIU Y, et al. Histamine causes pyroptosis of liver by regulating gut-liver axis in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3710.
- [15] ZHANG L M, ZHANG D X, ZHENG W C, et al. CORM-3 exerts a neuroprotective effect in a rodent model of traumatic brain injury via the bidirectional gut-brain interactions [J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113683.
- [16] BILLIAR T R, ZHANG L M, LI Q. Mechanical ventilation exacerbates poly (I : C) induced acute lung injury; central role for caspase-11 and gut-lung axis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 693874.
- [17] WANG L, SHARIF H, VORA S M, et al. Structures and functions of the inflammasome engine [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(6): 2021-2029.
- [18] ZHAO S, CHEN F, YIN Q, et al. Reactive oxygen species interact with NLRP3 inflammasomes and are involved in the inflammation of sepsis; from mechanism to treatment of progression [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 571810.
- [19] ZHENG D P, LIWINSKI T, ELINAV E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease [J]. *Cell Res*, 2020, 30(6): 492-506.
- [20] SOCHA-BANASIAK A, PAWLOWSKA M, CZKWIANIANC E, et al. From intrauterine to extrauterine life-the role of endogenous and exogenous factors in the regulation of the intestinal microbiota community and gut maturation in early life [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 696966.
- [21] 国现旭,郭兆安,岳桂华. 中医药干预心肌细胞焦亡研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(5): 92-96.
- GUO X X, GUO Z A, YUE G H. The research progress of intervention of Chinese medicine on myocardial pyroptosis [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2021, 40(5): 92-96.
- [22] ZHANG T, LI J, LIU C P, et al. Butyrate ameliorates alcoholic fatty liver disease via reducing endotoxemia and inhibiting liver gasdermin D-mediated pyroptosis [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10): 873.
- [23] ZHAO S, TAN Y, QIN J, et al. MicroRNA-223-3p promotes pyroptosis of cardiomyocyte and release of inflammasome factors via downregulating the expression level of SPI [J]. *Toxicology*, 2022, 476: 153252.
- [24] SADRI NAHAND J, SALMANINEJAD A, MOLLAZADEH S, et al. Virus, exosome, and microrna: new insights into autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1401: 97-162.
- [25] KHALYFA A, ERICSSON A, QIAO Z, et al. Circulating exosomes and gut microbiome induced insulin resistance in mice exposed to intermittent hypoxia; effects of physical activity [J]. *EBioMedicine*, 2021, 64: 103208.
- [26] 朱瑾,胡星星,张晓震,等. 脓毒症继发二次感染的危险因素分析[J]. 内科急危重症杂志, 2019, 25(4): 328-330.
- ZHU J, HU X X, ZHANG X Z, et al. Analysis of risk factors for secondary infections in sepsis patients [J]. *J Crit Car Inter Med*, 2019, 25(4): 328-330.

(本文编辑:李胜利)