

Toll 样受体 4 及下游炎性介质的检测在医院获得性肺炎中的临床应用

罗建华 李俏俏 李隆祥 邱继海

摘要 目的 分析 Toll 样受体 4 (TRL4) 及下游炎性介质的检测在医院获得性肺炎 (hospital acquired pneumonia, HAP) 中的临床价值。方法 30 例 HAP 患者按照数字表法随机分为干预组和实验组,另选取 15 例健康体检者作为对照组。3 组患者均采集静脉血,其中干预组血样中加入 TRL4 mAb 20 μ g,测定各患者外周血炎性因子水平,并提取外周血核细胞中总 RNA,检测 TLR4 mRNA 的表达,同时进行基因测序,分析确定基因型。结果 干预组和实验组各炎性因子水平组间比较差异无统计学意义,但均显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 组患者阳性表达率和相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。干预组阳性表达率和相对表达量均明显高于实验组和对照组,实验组也明显高于对照组,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TLR-4 阳性率与 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 等下游炎性因子浓度水平均呈正相关,决定系数分别为 0.732、0.714、0.695、0.753,具有显著相关性 ($P = 0.000$)。结论 医院获得性肺炎患者外周血中 TRL4 与下游炎性介质水平呈正相关,且 TRL4 阳性率和炎性介质水平均高于健康人群,对医院获得性肺炎发病机制的进一步研究具有重要意义。

关键词 Toll 样受体 4 炎性介质 医院获得性肺炎

中图分类号 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.036

Toll-like Receptor 4 and Downstream Mediators of Inflammation Detection in the Clinical Application of Hospital Acquired Pneumonia.

Luo Jianhua, Li Qiaoqiao, Li Longxiang, et al. Taizhou City Hospital Respiratory Medicine, Zhejiang 318000, China

Abstract Objective To analyze toll-like receptor 4 (TRL4) and downstream mediators of inflammation detection in hospital acquired pneumonia (hospital acquired root, HAP) of clinical value. **Methods** Thirty patients with HAP were divided into intervention group and experimental group according to the random number method. The other 15 cases were selected physical examination as a control. Three groups of patients were collected venous blood, of which the intervention group add 20 μ g TRL4 mAb. Blood samples were wed to determine the peripheral blood in patients with inflammatory factor levels, and total RNA of the nuclear cells in peripheral blood, was extracted to detect the expression of TLR4 mRNA, simultaneously gene sequencing and determine the genotype. **Results** The various inflammatory factors levels had no significant difference between groups of, but they were significantly higher than the control group, and the difference was statistically significant, ($P < 0.05$). Patients of the three groups with positive expression rate and relative expression had significant differences ($P < 0.05$). Positive expression rate and the relative expression of intervention group were significantly higher than those of the experimental group and the control group, and experimental group was significantly higher than the control group ($P < 0.05$). Statistics showed that TLR-4 positive rate and TNF alpha, IL-1, IL-6 and IL-10 downstream inflammatory factor levels all had positive correlation. Their determination coefficient were 0.732, 0.714, 0.695, 0.753 ($P = 0.000$). **Conclusion** Patients with hospital acquired pneumonia in the peripheral blood TRL4 and downstream level had a significant positive correlation. Inflammatory mediators and TRL4 positive rate and level of inflammatory medium were higher than healthy people. The hospital acquired pneumonia in the clinical diagnosis and condition prediction is of great significance.

Key words Toll-like receptor 4; Inflammatory mediators; Hospital-acquired pneumonia

医院获得性肺炎 (HAP) 是指患者入院时不存在、也不处感染潜伏期,而于入院 48h 后受细菌、真

菌、支原体、病毒等病原体感染引起的各种类型的肺炎实质炎症^[1]。调查显示,笔者医院近几年医院获得性肺炎 (HAP) 发生率约 3% ~ 5%,占院内感染的 60% 以上^[2]。该病好发于呼吸科、神经内科、重症监护科,发生 HAP 患者通常病程迁延,预后不佳,病死率高,严重危害住院患者的健康^[3]。目前国内有关 TRL4 mRNA 表达在 HAP 发病中的干预调控作用的

基金项目:台州市椒江区科技计划项目 (132057)

作者单位:318000 台州市医院呼吸内科 (罗建华、李俏俏、李隆祥),感染科 (邱继海)

通讯作者:罗建华,副主任医师,电子信箱:doctqjh1977@163.com

研究并不多,本研究探讨了 TLR4 及下游炎性介质的检测在 HAP 中的临床价值,通过分析实验组和干预组 TLR4 mRNA 的表达与炎性介质释放之间的相互关系,进一步阐释了 TLR4 在 HAP 发病中的分子机制,对临床治疗、预防 HAP、病情预测有着重要的意义。现将研究结果报道如下。

资料与方法

1. 临床资料:收集 2013 年 1 月~2015 年 6 月在笔者医院呼吸科、神经内科以及重症监护病房中发生医院获得性肺炎(HAP)的患者,筛选得到革兰阴性细菌感染的 HAP 样本 30 例,采用数字表法将其随机分为两组,即实验组和干预组,另选择 15 例健康体检者作为对照组。干预组男 9 性例,女性 6 例,患者年龄

38~65 岁,平均年龄为 54.5 ± 9.8 岁;实验组男性 8 例,女性 7 例,患者年龄 40~64 岁,平均年龄为 53.5 ± 11.4 岁;对照组男性 9 例,女性 6 例,患者年龄 41~66 岁,平均年龄为 55.1 ± 10.3 岁。3 组患者病例数、性别比例、平均年龄等基本资料差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例纳入标准^[4]:①患者经相关检查确诊为 HAP,经痰培养或支气管镜检证实为革兰阴性细菌感染;②根据 NYHA 心功能分级标准,患者术前心功能为Ⅲ~Ⅳ级;③凝血功能正常;④签署知情同意书;⑤获得伦理委员会批准。病例排除标准:①合并严重心、肝、肾等严重脏器损伤;②既往肺炎病史;③严重认知障碍者;④孕妇及妊娠期女性;⑤不能按规定配合者。

表 1 一般临床资料比较

组别	干预组	实验组	对照组	F	P
例数(男性/女性)	9/6	8/7	9/6	0.182	0.321
平均年龄(岁)	54.5 ± 9.8	53.5 ± 11.4	55.1 ± 10.3	0.311	0.403
体重(kg)	64.4 ± 5.9	65.8 ± 6.6	67.6 ± 6.8	0.472	0.253
平均动脉压(mmHg)	87.9 ± 6.8	86.2 ± 7.1	85.7 ± 6.4	0.552	0.370
心率(次/分)	73.8 ± 4.2	74.2 ± 5.1	74.1 ± 4.8	0.206	0.128
心功能分级(Ⅲ/Ⅳ)	9/6	9/6	7/8	0.464	0.225

2. 研究方法:选取笔者医院收治的 30 例 HAP 患者,按照随机数字法分为干预组和实验组,另选取 15 例健康体检者作为对照组(表 1)。3 组患者均采集静脉血,测定各患者外周血肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)等炎性因子水平。另外采集静脉血 5ml,其中干预组血样中加入 TLR4 mAb(Toll 样受体单克隆抗体)20 μ g,分离外周血单个核细胞,提取总 RNA,测定其中 TLR4 mRNA 的表达情况,对其扩增产物进行基因测序,分析确定基因型。最终分析测定结果,比较各组患者炎性因子水平、TLR-4 表达情况,统计 TLR-4 阳性率与下游炎性因子的相关性。

3. 下游炎性因子的测定:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 等炎性介质的表达水平。

4. 外周血中单个核细胞 TLR4 mRNA 表达的检测^[5]:采用反转录-聚合酶链法(RT-PCR)测定 TLR4 mRNA 的表达,以 β -actin 的扩增作为内参照,TLR4 引物序列:上游引物 5'-TCATCAGTGTATCG-

GTGGTC-3', 5'-TITCATCTGGATTCAAGGCT-3', 内参照物 β -actin 引物:上游引物为 5'-ACTGCCG-CATGGTGTTCCTG-3',下游引物为 5'-AAGCACTT-GCATGGTGCACGA-3'。RT-PCR 产物经凝胶电泳观察,凝胶成像系统成像,通过目的基因与内参对照物比对,进行半定量分析。

5. 基因序列测定及分析^[6]:对 RT-PCR 扩增产物进行基因测序,通过 GenBank 基因库进行 BLAST 比对分析,确定 TLR4 基因型以及是否存在突变基因。

6. 统计学方法:本次研究所有数据均采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,计量资料采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 下游炎性因子测定比较:干预组和实验组各炎性因子水平组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但均显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。表明 HAP 患者下游炎性因子水平均明显高于健康体检者,详见表 2。

表 2 下游炎症因子测定结果比较

组别	<i>n</i>	TNF- α (pg/ml)	IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
干预组	15	268.8 $\pm$ 31.4	109.5 $\pm$ 8.2	173.8 $\pm$ 31.0	99.5 $\pm$ 10.2
实验组	15	272.4 $\pm$ 34.6	107.6 $\pm$ 9.7	169.6 $\pm$ 27.1	96.9 $\pm$ 13.8
对照组	15	64.4 $\pm$ 27.3	14.8 $\pm$ 4.1	93.8 $\pm$ 17.8	35.5 $\pm$ 6.7
<i>F</i>	—	12.092	10.827	9.279	7.552
<i>P</i>	—	0.000	0.000	0.000	0.000

2. TLR-4 表达情况:3 组患者阳性表达率和相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。干预组阳性表达率和相对表达量均明显高于实验组和对照组,实验组也明显高于对照组 ($P < 0.05$),组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表 3。

表 3 TLR-4 表达情况

组别	<i>n</i>	阳性表达率 (%)	相对表达量 (TLR-4/ β -actin)
干预组	15	71.8 $\pm$ 12.4	0.51 $\pm$ 0.14
实验组	15	53.4 $\pm$ 11.6	0.36 $\pm$ 0.12
对照组	15	26.4 $\pm$ 7.9	0.15 $\pm$ 0.07
<i>F</i>	—	8.492	6.627
<i>P</i>	—	0.006	0.014

3. TLR-4 阳性率与下游炎症因子的相关性:统计显示,TLR-4 阳性率与 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 等下游炎症因子浓度水平均呈正相关,相关系数分别为 0.732、0.714、0.695、0.753,差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。

讨 论

Toll 样受体 (TLRs) 是一类天然模式识别受体,可识别病原体相关分子模式,并引发信号转导,进而导致炎症介质的释放^[7,8]。目前已发现的 Toll 样受体有 13 个,其中的 Toll 样受体 4 (TLR4) 主要分布于单核细胞、多形核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞以及肺、心、脑、肝等组织。由于 TLR4 的外源性配体主要是革兰阴性细菌细胞壁外膜的主要成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),而 TLR4 主要介导 LPS 信号从细胞外至细胞内的跨膜转导,引起下游的炎症反应^[9-11]。TLR4 作为 LPS 的模式识别受体,在革兰阴性菌 LPS 引起的医院获得性肺炎发生中起着重要的作用。其可能的机制途径是 TLR4 启动的胞内信号转导最终激活核因子- κ B (NF- κ B),其通过调控编码细胞因子 (如 IL-1、IL-2、IL-6、TNF- α)、黏附分子、急性期蛋白和多种酶类 (如诱导型一氧化氮合成酶、环氧化酶) 基因的表达,进而参与炎症反应的放大^[12,13]。TLR4mAb 是 Toll 样受体单克隆抗体,它

能特异性阻断 TLR4 后,可以降低 IL-1、TNF、IFN 等炎症介质的表达,并存在一定的剂量依赖性。因此对 HAP 患者体内 TLR4 表达量的检测可能有助于预测 HAP 的病情发展及预后,用分子生物学手段,在 TLR4 水平阻断激活的信号转导,使 TLR4 适度的表达,可以对 LPS 导致的 HAP 患者进行适当干预。

在 HAP 发病过程中起主要作用的下游炎症介质有 IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 等,其中 TNF- α 、IL-1、IL-6 都是促炎因子,IL-10 是抑炎因子。TNF- α 可通过 NF- κ B 途径参与炎症反应,在肺部相关炎症疾病处于起始部位,可引发瀑布反应^[14]。IL-1 是一种热原质成分,具有致热和介导炎症的作用,在细胞免疫激活中发挥重要调节作用。研究显示,监测 IL-1 的释放有助于了解机体的免疫调节能力,TLR4 与 IL-10 的升高可促进 IL-1 β 的表达而促进炎症反应,因此扰乱 TLR4 通路可明显减轻炎症反应,IL-1 的测定也可作为疾病的诊断、疗效及预后判断等提供可靠参考^[15,16]。IL-6 具有调节细胞生长分化、免疫应答及造血功能等多种作用。IL-6 在多种疾病时有明显改变,一般发病时 IL-6 水平增高,其上升的水平与疾病的活动期、肿瘤的发展变化、排斥反应程度以及治疗效果都密切相关,因此,对患者外周血中 IL-6 水平的检测可反映患者的病情变化。IL-10 是一种多功能负性调节因子,可拮抗 TNF- α 等炎症介质。研究显示,IL-10 的抗炎作用可能是通过调节 TLR4 信号通路实现,可降低 TLR4 及相关炎症因子的表达,对于 HAP 而言,IL-10 的偏低可在一定程度上表明该组患者病情更严重。总体而言,上述炎症因子与 TLR4 的相互调节在 HAP 发病机制中起着重要作用^[17-19]。

本研究显示,干预组和实验组各炎症因子水平组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但均显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时,3 组患者阳性表达率和相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。干预组阳性表达率和相对表达量均明显高于实验组和对照组,实验组也明显高于对照组组间

比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外,统计显示,TLR-4 阳性率与 $\text{TNF}-\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10 等下游炎症因子浓度水平平均呈正相关,相关系数分别为 0.732、0.714、0.695、0.753,具有显著相关性 ($P = 0.000$)。Armstrong 等^[20]研究显示,正常人外周血单个核细胞在给予 LPS 刺激后,其 TLR4 mRNA 表达即明显升高。Tsujimoto 等^[21]亦发现腹腔感染的脓毒症患者外周血单个核细胞 TLR4 表达较正常人明显升高。Clett 等^[22]证实,鲍曼不动杆菌造成的 HAP 也是通过 LPS 刺激患者单个核细胞使 TLR4 信号传递,引起炎症的级联反应。这些研究表明,在临床上可通过测定 HAP 患者体内 TLR4 表达量来预测 HAP 病情发展及预后。这与本研究结果一致,总体而言,HAP 患者外周血中 TLR4 阳性率和炎性介质水平均高于健康人群,表明 TLR4 阳性率的测定和 $\text{TNF}-\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10 等介质浓度对于疾病的诊断具有重要意义,对临床治疗、预防 HAP 有着重要的指导作用。综上所述,HAP 患者外周血中 TLR4 与下游炎性介质水平呈正相关,且 TLR4 阳性率和炎性介质水平均高于健康人群,对医院获得性肺炎发病机制的进一步研究具有重要意义,值得临床推广。当然本研究选取病例数有限,有待于今后扩大样本量进一步验证。

参考文献

- 1 蒋莉,周京国,青玉凤,等. Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 及其信号通路在原发性痛风性关节炎发病机制中作用的研究[J]. 中华风湿病学杂志,2011,15(5):300-304
- 2 李艳,李波,姚秀娟,等. Toll 样受体 11~13 在肥大细胞上的表达[J]. 首都医科大学学报,2013,34(2):251-257
- 3 Sainz J, Salas-Alvarado I, López-Fernández E, et al. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2010,23(2):423-436
- 4 Zou YF, Wang F, Feng XL, et al. Association of NF- κ B1-94ins/de- Δ TTG promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis[J]. Tissue Antigens,2011,77(1):9-17
- 5 邱丽莉. TLR4 基因多态性与社区获得性肺炎易感性及预后的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(4):319-320
- 6 朱秋皎,刘继贤. 呼吸道合胞病毒肺炎患儿 TLR4 及 IFN- γ 临床观察[J]. 天津医药,2012,40(7):738-739
- 7 王云,黄升海,吴璇,等. 呼吸道合胞病毒合并肺炎克雷伯菌感染所致肺炎与 TLR4-NF- κ B 信号通路关系的初步研究[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(9):1252-1258
- 8 梅雪,李建生,张艳霞,等. 毒素清对肺炎痰热证大鼠肺组织

- TLR4、NF- κ B 的影响[J]. 时珍国医国药,2012,23(7):1693-1694
- 9 康丽菲,朱桂云,欧阳琴,等. TLR4 和核因子- κ B 在胆固醇性肺炎中的表达[J]. 中华病理学杂志,2015,44(11):790-791
- 10 周洲,杨科,陈丽丽,等. 肺炎嗜衣原体热休克蛋白 10 经 TLR2 及 TLR4 调控 THP-1 分泌 $\text{TNF}-\alpha$ [J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2012,32(11):983-988
- 11 季正华,张学兰,朱秋皎,等. 婴幼儿呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎 Toll 样受体 4(TLR4)的检测及分析[J]. 放射免疫学杂志,2012,25(3):289-291
- 12 Yang WS, Kim HW, Lee JM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes ADAM10-dependent ectodomain shedding of TNF receptor 1 in vascular smooth muscle cells[J]. Mol Pharmacol, 2015, 87(3):533-542
- 13 沈启英,方磊,吴惠梅,等. Toll 样受体 2 在七氟醚抑制哮喘小鼠气道炎症中的作用[J]. 中华医学杂志,2016,96(2):138-141
- 14 Li J, Iorga A, Sharma S, et al. Intralipid, a clinically safe compound, protects the heart against ischemia-reperfusion injury more efficiently than cyclosporine-A[J]. Anesthesiology, 2012, 117(4):836-846.265
- 15 常红,刘秀琴,张秋业,等. 紫癜性肾炎患儿外周血单核细胞 Toll 样受体 3 和 Toll 样受体 4 表达的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(5):347-350
- 16 Kankaanranta H, Ilmarinen P, Zhang X, et al. Tumour necrosis factor- α regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF- κ B and AP-1[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e90298-e90298
- 17 蒋鹏,黄祥君,赵明,等. 盐酸右美托咪定对缺血-再灌注损伤大鼠心肌 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路的作用[J]. 临床麻醉学杂志,2014,30(3):294-296
- 18 熊梅梅,吕柳青,肖红波,等. 高糖和血管紧张素 II 对人肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 信号表达及炎性和纤维化因子的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2016,32(1):43-49
- 19 赵一萍,白东义,李蓓,等. 马 Toll 样受体表达水平 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(2):220-227
- 20 Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, et al. Differential expression of Toll-like receptor TLR-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(17):312-319
- 21 Tsujimoto H, Ono S, Majima T, et al. Neutrophil elastase MIP-2 and TLR4 expression during human and experimental sepsis[J]. Shock, 2005, 23(6):39-44
- 22 Clett E, Olga L, Moncayo N, et al. Acinetobacter baumannii lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling[J]. J Med Microbiol, 2007,56(2):165-171

(收稿日期:2016-05-17)

(修回日期:2016-07-01)