

## 脓毒症患者连续性肾脏替代治疗后 Toll 样受体 4 的改变

王少东 张杏泉 吴学豪 曹刚 夏欣一 唐文杰

**【摘要】 目的** 观察脓毒症患者外周血单核细胞(PBMC)Toll 样受体 4(TLR4)及下游炎症介质的表达变化,以及持续性血液透析治疗对其调控的作用。**方法** 13 例脓毒症患者按预后分为好转组(7 例)和治愈组(6 例),另选 6 例健康志愿者为正常对照组。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 PBMC 中 TLR4 mRNA 的表达;用流式细胞仪检测 PBMC 表面 TLR4 的表达;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的浓度。**结果** 经过高容量血液滤过(HVHF)的连续性肾脏替代治疗(CRRT)以及其他综合治疗后,13 例患者的血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  明显降低( $P$  均 $<0.05$ ),临床症状趋向好转,且治愈组低于好转组,并接近正常对照组水平;同时 TLR4 的表达也有所降低,但其降低幅度滞后于 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的降低幅度,在好转期仍有高水平的 TLR4 表达。**结论** CRRT 所导致的单核细胞 TLR4 降低可能在脓毒症患者的治疗中具有重要的意义。

**【关键词】** Toll 样受体; 重症感染; 外周血单核细胞

**The change in expression of Toll-like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cell after continuous renal replacement therapy in patients with sepsis** WANG Shao-dong, ZHANG Xing-quan, WU Xue-hao, CAO Gang, XIA Xin-yi, TANG Wen-jie. Department of Emergency, Military General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210005, Jiangsu, China

**【Abstract】 Objective** To explore the change in Toll-like receptor 4 (TLR4) of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and the expression of cytokines in patients with sepsis, and to investigate the role of continuous renal replacement therapy (CRRT) in its modulation. **Methods** A clinical study was performed in 13 patients with sepsis which were divided into improved group ( $n=7$ ) and healing group ( $n=6$ ), according to their outcome. Another 6 healthy individuals served as normal control. The mRNA expression of TLR4 on PBMC was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the protein expression of TLR4 on PBMC was assayed with flow cytometry, the expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured by enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). **Results** TLR4 mRNA, IL-6, TNF- $\alpha$ , and TLR4 protein expressions were upregulated markedly in patients suffering from sepsis. The above parameters were decreased significantly after CRRT (all  $P<0.05$ ) and in the same time, the clinic condition turn up, in the meanwhile, the expression of TLR4 went down, but it still have some expression on monocyte in improved group. **Conclusion** The down regulation of TLR4 through CRRT may imply an important mechanism in the CRRT on patients with sepsis.

**【Key words】** Toll-like receptor; severe infection; peripheral blood mononuclear cell

在革兰阴性( $G^-$ )菌导致的脓毒症感染中,治疗无效的病死率为 50%,从而导致每年近 40 万北美人死亡<sup>[1]</sup>。由脂多糖(LPS)与 Toll 样受体 4(TLR4)的结合激活而导致炎症因子大量产生可能是其中一个中心事件<sup>[2-3]</sup>。据文献报道,连续性肾脏替代治疗(CRRT)中的高容量血液滤过(HVHF)对炎症介质有着较好的清除作用<sup>[4-5]</sup>。在本研究中我们对 CRRT 治疗前后白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )以及 TLR4 的表达进行了研究,以明确在全身炎症反应综合征(SIRS)的治疗中 CRRT 的作用及其可能的机制,同时探讨 TLR4 在炎症介质

产生中的可能作用。

### 1 资料与方法

**1.1 诊断标准:** 病例符合 1991 年美国胸科医师协会和危重病医学会联席会议制定的 SIRS 诊断标准以及 2001 年国际脓毒症会议制定的标准<sup>[6-7]</sup>: ①心率 $>90$  次/min; ②呼吸频率 $>20$  次/min 或动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>) $<32$  mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa); ③体温 $>38$  °C 或 $<36$  °C; ④白细胞计数 $>12 \times 10^9/L$  或 $<4 \times 10^9/L$ , 其中杆状核细胞 $>0.10$ 。凡符合以上条件 2 条或以上者即可明确诊断。**1.2 病例选择:** 选择 2006 年 7 月—2007 年 2 月入住我院急救医学科的感染患者 13 例,其中男 5 例,女 8 例;年龄 15~69 岁,平均(42.5 $\pm$ 25.8)岁;原发病:感染性心内膜炎 2 例,蛇毒咬伤并发感染 2 例,系统性红斑狼疮并发感染及慢性肾功能不全 3 例,

基金项目:南京军区南京总医院科研发展基金(200652)

作者单位:210005 江苏南京,南京军区南京总医院急救医学科

作者简介:王少东(1968-),女(汉族),江苏省人,医学博士,副主任医师(Email:zhxqsd2002@yahoo.com.cn)。

肠梗阻或不全性肠梗阻 3 例,外伤后出现急性肾功能不全合并感染 3 例。根据患者的预后分为治愈组和好转组。另设 6 例健康志愿者为正常对照组。各组性别、年龄等一般情况经统计学处理差异无统计学意义,有可比性。

**1.3 血浆 IL-6、TNF- $\alpha$  的检测:**在患者行 CRRT 前及治愈或好转后出院前采集患者空腹外周静脉血,离心分离血清后, -80  $^{\circ}$ C 保存。IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自德国 U-cytech Biosciences 公司, TNF- $\alpha$  试剂盒购自奥地利 Bended 公司,操作按试剂盒说明书进行。除空白孔外,加入标本或不同浓度标准品各 100  $\mu$ l 至相应孔中, 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min;洗板后每孔依次加入生物素抗体和酶结合物 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 各孵育 60 min 和 30 min;加显色剂,避光孵育 10~25 min,终止液终止,即刻测量波长 450 nm 处的吸光度(A)值,并根据标准曲线查出其浓度。

**1.4 外周血单核细胞(PBMC)的分离及 tRNA 的提取:**于上述时间点同时抽取患者肘静脉血 2 ml,肝素抗凝血,与等量 Hank's 液混匀,用 Ficoll 细胞分离液(美国 Pharmacia)分离出 PBMC。加入 0.5 ml TRIzol 溶液(美国 Invitrogen),充分混匀,按说明书要求抽提总 RNA 至异丙醇沉淀, -80  $^{\circ}$ C 保存。

**1.5 PBMC 中 TLR4 mRNA 表达的测定:**用紫外分光光度计(Du-640,美国 Beckman)测定 tRNA 纯度及含量,经过电泳证实 28S6 亚基是 18S 亚基的 2 倍,而且波长 260/280 nm 处的 A 值比值  $\geq 1.8$ 。取 RNA 2  $\mu$ l,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TLR4 mRNA 表达。用三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的扩增产物作为内参照。引物序列和扩增片断长度见表 1。每个反应体系取扩增产物 10  $\mu$ l,于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳结果与 GAPDH 的电泳结果相对照,得出 TLR4 表达的相对强度。

表 1 TLR4 mRNA 引物的序列和扩增片断长度

Table 1 Primer sequence of TLR4 mRNA and its amplified fragment length

引物名称	引物序列	产物长度
TLR4	5'-AGGATGATGCCAGGATGATGTC-3'	150 bp
	5'-AGAAATTCAGCTCCATGCATTGAT-3'	
GAPDH	5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT-3'	130 bp
	5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'	

**1.6 TLR4 表达的流式细胞仪检测:**取 100  $\mu$ l 抗凝血加入藻红蛋白(PE)抗人 TLR4(美国 eBioscience 公司)10  $\mu$ l,黑暗处室温下孵育 30 min。另取抗凝血

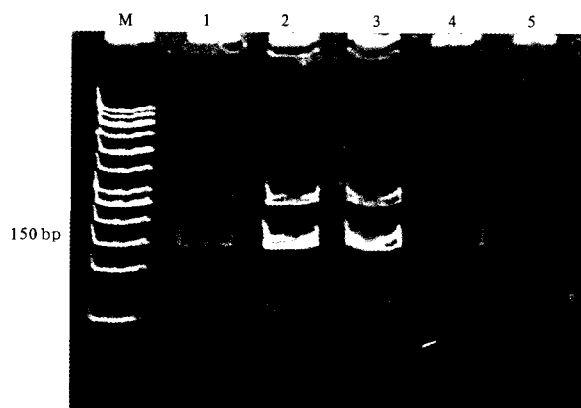
100  $\mu$ l,加入小鼠 IgG2 $\alpha$ -PE 10  $\mu$ l 作为同型对照。加入 0.5 ml 溶血剂(购自美国 BD 公司),置室温下反应 10 min,旋涡振荡器振荡, 400  $\times$ g 离心 5 min,用 0.01 mol/L、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。在 FACS Calibur 型流式细胞仪、CellQuest 软件(BD 公司)488 nm 激发光线,获取  $1.0 \times 10^4$  个细胞,检测单核细胞 TLR4-PE 荧光强度(FMI)。

**1.7 统计学处理:**试验数据以均数士标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 预后:**13 例患者中好转 7 例,治愈 6 例。

**2.2 PBMC 中 TLR4 mRNA 的表达(图 1):**正常对照组中可见少量 TLR4 mRNA 表达。13 例患者入院后 TLR4 mRNA 表达均升高;在行 CRRT 后好转组 TLR4 持续增高;治愈组 TLR4 mRNA 表达接近正常对照组表达水平。



M:Marker;1:正常对照组;2:CRRT 治疗前; 3:CRRT 好转组;4:CRRT 治愈组;5:空白对照组

图 1 PBMC 中 TLR4 mRNA 表达情况

Figure 1 Expression of TLR4 mRNA on PBMC

**2.3 血清 IL-6、TNF- $\alpha$  的检测(表 2):**13 例患者行 CRRT 治疗前 IL-6、TNF- $\alpha$  均显著增高,在行 CRRT 治疗后 IL-6、TNF- $\alpha$  均降低,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );且治愈组低于好转组。

表 2 各组血清 IL-6、TNF- $\alpha$  及 PBMC 表面 TLR4 表达的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Change of expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and TLR4 on PBMC in serum( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数(例)	IL-6(ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	TLR4(FMI)
CRRT 治疗前	13	162.90 $\pm$ 26.60 $\Delta$	15.77 $\pm$ 3.49 $\Delta$	364.99 $\pm$ 120.60 $\Delta$
CRRT 好转组	7	21.88 $\pm$ 2.67*	9.29 $\pm$ 1.86*	116.47 $\pm$ 26.81*
CRRT 治愈组	6	2.35 $\pm$ 1.08*	1.15 $\pm$ 0.98*	20.21 $\pm$ 5.82*
正常对照组	6	2.63 $\pm$ 1.24	1.14 $\pm$ 0.69	15.67 $\pm$ 3.49

注:与正常对照组比较; $\Delta P < 0.05$ ;与 CRRT 治疗前比较;\* $P < 0.05$

2.4 PBMC 上 TLR4 的蛋白表达(表 2):在本试验中用流式细胞仪检测 PBMC 上的 TLR4 表达,结果显示,正常对照组和患者组都有一定的 TLR4 蛋白表达;在 CRRT 好转组其表达的 FMI 继续增高;治愈患者组表达水平接近正常对照组。

### 3 讨论

最初在脓毒症的病理生理机制研究中,宿主和微生物相互作用后激活细胞因子网络是一个重要的过程。TNF- $\alpha$  是机体受到创伤或感染后最早产生和最起核心作用的炎症介质,可诱发 IL-1、IL-6、IL-8 以及继发性炎症介质的释放;TNF- $\alpha$  还可激活凝血及补体系统,促进黏附分子、前列腺素 E<sub>2</sub>、血小板活化因子、糖皮质激素等的表达和释放<sup>[8]</sup>。在脓毒症病理生理过程中,细胞因子和炎症介质失控性释放可引起组织损伤、器官功能紊乱,从而导致多器官功能障碍综合征(MODS),故炎症因子 TNF- $\alpha$  被认为在脓毒症的病理发展过程中与其临床预后密切相关<sup>[9]</sup>。IL-6 是机体创伤和修复过程中重要的急性期反应介质,能激活中性粒细胞,延迟吞噬细胞对衰老和丧失功能的中性粒细胞的吞噬,促进炎症介质的产生。血中 IL-6 水平与脓毒症严重程度相关,已经证明 IL-6 可以作为评价脓毒症严重程度的替代指标<sup>[10]</sup>。汪洋等<sup>[11]</sup>的研究表明,急性弥漫性腹膜炎患者 TLR4 mRNA 表达显著增高,与下游炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  呈平行关系,且 SIRS 组较非 SIRS 组升高显著。可以认为,就感染患者的临床表现和预后而言,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达变化是一个中心事件。

TLR 为 I 类跨膜受体,属病原相关分子模式受体,对微生物及其组织成分识别有明显选择性。人类 TLR 有 12 个成员,其中 TLR4 主要介导 G<sup>-</sup>菌感染 LPS 的信号转导,导致核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和转录因子-1(AP-1)转位,与 DNA 分子上炎症反应调节基因中启动子区域底 NF- $\kappa$ B 结合位点相结合,启动细胞因子 IL-6、IL-1、TNF- $\alpha$  以及组织因子、黏附分子和辅助刺激因子 CD80 的转录、翻译,最终大量释放多种具有扩大免疫炎症反应、增强杀菌作用的细胞因子。因此,TLR4 可能在脓毒症的病理发展中具有重要作用。

本试验中发现,经过 HVHF 的 CRRT 以及其他综合治疗后,好转患者 IL-6 和 TNF- $\alpha$  明显降低,临床症状趋向好转,同时 TLR4 表达也有所降低,但其降低幅度滞后于 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的降低

幅度,且仍有高水平 TLR4 表达;在 TLR4 mRNA 表达上也证实了同样的结果。Peng 等<sup>[12]</sup>报道,烧伤患者使用固化了多黏菌素 B 的 0.6 m<sup>2</sup> AN69 透析柱后,可将血浆中超过致死剂量的内毒素含量在 1 h 内迅速降低 70%,60 h 后可达 98%。由于 TNF- $\alpha$  在循环中是具有生物学活性的三聚体,分子质量为 54 ku,IL-6 的分子质量为 26 ku,均难以通过透析柱膜孔,因而,这两个细胞因子降低可能是由于透析柱的吸附作用所致,说明 CRRT 并不能直接降低 TLR4 表达,但是随着内毒素、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的清除,会逐步下调 TLR4 表达,这可能是 TLR4 表达下调的原因之一。但进一步深入研究 TLR4 在脓毒症中的作用有待关注。

### 参考文献:

- 1 Tsuchida K, Yoshimura R, Nakatani T, et al. Blood purification for critical illness: cytokines adsorption therapy[J]. *Thera Apher Dial*, 2006, 10(1): 25-31.
- 2 黑建成, 马远征, 周宝桐, 等. 创伤性脓毒症外周血中性粒细胞及组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA 表达的变化[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(1): 28-31.
- 3 章云涛, 丁国娟, 方强. 重症脓毒症患者血清脂多糖结合蛋白及其受体变化的临床研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2): 78-81.
- 4 张军, 陶立坚, 宁建平, 等. 高容量血液滤过对多器官功能障碍综合征患者肿瘤坏死因子及其受体的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2): 81-84.
- 5 刘辉, 赵庆, 侯秀妮. 血液吸附联合血流透析治疗重度烧伤临床观察[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(9): 568-569.
- 6 American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. *Crit Care Med*, 1992, 20(6): 864-874.
- 7 Levy M M, Fink M P, Marshall J C, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4): 1250-1256.
- 8 van der Poll T, Lowry S F. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense [J]. *Shock*, 1995, 3(1): 1-12.
- 9 Debets J M, Kampmeijer R, van der Linden M P, et al. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients [J]. *Crit Care Med*, 1989, 17(6): 489-494.
- 10 Jansen M J, Hendriks T, Voges M T, et al. Inflammatory cytokines in an experimental model for the multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24 (7): 1196-1202.
- 11 汪洋, 熊京, 吴河水, 等. 急性弥漫性腹膜炎 SIRS 患者 Toll 样受体及炎症介质的表达变化[J]. *中国急救医学*, 2005, 25(6): 399-401.
- 12 Peng Y, Yuan Z, Li H. Removal of inflammatory cytokines and endotoxin by veno-venous continuous renal replacement therapy for burned patients with sepsis [J]. *Burns*, 2005, 31(5): 623-628.

(收稿日期: 2007-03-31 修回日期: 2007-06-01)

(本文编辑: 李银平)