

## 小儿脓毒症 Toll 样受体信号途径转导分子及调节因子的变化研究

杨卫国 李成荣 何颜霞 王国兵 祖莹

**【摘要】** 目的 探讨 Toll 样受体 (TLRs) 信号途径转导分子及调节因子在小儿脓毒症异常炎症免疫反应发病机制中的可能作用。方法 选择脓毒症患儿 10 例、严重脓毒症患儿 13 例及同期健康体检儿童 17 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time PCR) 检测前炎症细胞因子 (肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6)), 以及 TLRs 信号途径转导分子和调节因子的 mRNA 表达; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测前炎症细胞因子蛋白水平。结果 与健康对照组比较, 脓毒症组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达均增加, TLRs 信号途径转导分子 TLR2、TLR4、髓样细胞分化蛋白-88 (MyD88)、TNF 相关因子 6 (TRAF6)、IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4)、转化生长因子- $\beta$  活化激酶 1 (TAK1)、TAK1 结合蛋白 2 (TAB2) 的 mRNA 表达以及 TLRs 信号途径正性调节因子 TLR4 相关蛋白 (PRAT4B)、信号转换接头蛋白 2 (STAP2) 的 mRNA 表达均明显增高 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 且严重脓毒症组较脓毒症组升高更显著 ( $P$  均  $< 0.01$ )。脓毒症组 TLRs 信号途径负性调节因子 IL-1 受体相关激酶 3 (IRAK-M)、核转录因子- $\kappa$ B 抑制性锌指蛋白 (Triad3A) 的 mRNA 表达均明显增高 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 严重脓毒症组表达则明显低于脓毒症组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 TLRs 信号途径转导分子/调节因子异常表达可能是脓毒症时全身炎症反应的原因之一。

**【关键词】** 脓毒症; Toll 样受体信号途径; 转导分子; 调节因子; 全身炎症反应; 儿童

**Role of transduce molecules and modulatory factors of signal pathways of Toll-like receptor in inflammatory response of children with sepsis** YANG Wei-guo, LI Cheng-rong, HE Yan-xia, WANG Guo-bing, ZU Ying. Pediatric intensive care unit, Shenzhen Children Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong, China  
Corresponding author: LI Cheng-rong (Email: lichengrong@sina.com)

**【Abstract】** Objective To investigate the role of transduce molecules and modulatory factors of signal pathways of Toll-like receptors (TLRs) in aberrant inflammatory response in children with sepsis. Methods Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and serum were obtained from 10 children with sepsis, 13 children with severe sepsis and 17 age-matched healthy children as controls. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) were used to evaluate the mRNA expression levels of TLR2, TLR4, myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), TAK1-binding protein 2 (TAB2) transforming growth factor- $\beta$ -activating kinase 1 (TAK1), interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK-M), zinc finger protein inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B (Triad3A), protein associated with Tlr4 (PRAT4B) and signal-transducing adaptor protein-2 (STAP2), and the levels of mRNA expression and production of pro-inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6] were measured by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with the healthy control group, the levels of gene expression and protein of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6), the levels of gene expression of signal pathway molecules of TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, TRAF6, IRAK4, TAK1 and TAB2) and the levels of gene expression of positive modulators of TLRs pathways (PRAT4B and STAP2) were significantly increased in sepsis group and severe sepsis group (all  $P < 0.01$ ), and the levels in severe sepsis group were even higher than those in sepsis group (all  $P < 0.01$ ). The mRNA expression levels of negative modulators of TLRs pathways (IRAK-M and Triad3A) were significantly elevated in sepsis group compared with those in healthy control group (all  $P < 0.01$ ), but the mRNA expression levels of the negative modulators in severe sepsis group were significantly lowered compared with those in sepsis group (all  $P < 0.01$ ). Conclusion Aberrant expression of signal pathway molecules and the modulators in TLRs signaling might play an important role on production and development of abnormal inflammatory response in children with sepsis.

**【Key words】** sepsis; Toll-like receptor signal pathway; transduce molecule; regulatory factor; systemic inflammatory response; child

作者单位: 518026 中国医科大学附属深圳儿童医院 PICU

通讯作者: 李成荣, 主任医师, Email: lichengrong@sina.com

作者简介: 杨卫国 (1971-), 男 (汉族), 湖北省人, 医学硕士, 主治医师, Email: replicater@163.com.

以脓毒症、脓毒性休克及多器官功能障碍综合征(MODS)的发病机制中,前炎症细胞因子级联反应居重要地位<sup>[1-3]</sup>。已发现 Toll 样受体(TLRs)可识别病原微生物外源性或内源性配体<sup>[4-5]</sup>,并通过其信号转导途径激活核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),诱导前炎症细胞因子基因表达,并参与机体全身性炎症反应;在脓毒症患者中 TLR2 和 TLR4 呈高表达<sup>[6-7]</sup>,表明 TLRs 信号途径异常活化与人类脓毒症有关。本研究中探讨 TLRs 信号途径转导分子和调节因子表达与前炎症细胞因子表达的关系,进一步了解全身性感染炎症反应的发病机制。

### 1 资料与方法

**1.1 研究对象:**选择 2006 年 3 月—2007 年 1 月本院收治的脓毒症患者 10 例、感染性休克及 MODS 患儿 13 例为研究对象,男 14 例,女 9 例;年龄 4 个月~15 岁,平均(3.0±0.9)岁。诊断依据中华医学会儿科学分会急救学组 2005 年制定的《儿科感染性休克(脓毒性休克)诊疗推荐方案》<sup>[8]</sup>,并依此方案将上述患者分为脓毒症组和严重脓毒症组(包括脓毒性休克和 MODS)。以同期儿童保健科 17 例体检的健康儿童作为对照,男 10 例,女 7 例;年龄 6 个月~12 岁,平均(3.5±0.6)岁。

#### 1.2 检测指标及方法

**1.2.1 外周血单核细胞(PBMC)总 RNA 的提取:**患儿入院即抽取肝素钠抗凝外周静脉血,用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂生产)分离 PBMC, RNA 试剂(美国 Gentra 公司)提取 PBMC 的 RNA,置于 -80℃ 备用,具体操作参照试剂盒说明书进行。

**1.2.2 逆转录合成 cDNA:**按试剂盒(美国 MBI 公司,编号:K1632)说明,经逆转录合成 cDNA。取 1  $\mu$ l cDNA 为模板,聚合酶链反应(PCR)扩增 30~40 个循环,PCR 引物序列自行设计,由上海基康生物技术有限公司合成;将 10  $\mu$ l 扩增产物在质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶中用 90 V 电流 30 min,回收纯

化,由上海基康生物技术有限公司进行测序,结果与 Genbank 中目的基因 mRNA 序列完全一致。

**1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中前炎症细胞因子水平:**分离外周血血浆检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )以及白细胞介素-6(IL-6)的蛋白水平,用 Anthon 型酶标仪比色,按 ELISA 试剂盒(深圳晶美公司)说明书要求操作。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测前炎症细胞因子水平及 TLRs 途径转导分子和调节因子的 mRNA 表达:**用 SYBGreen 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)及罗氏 LightCycler 型荧光定量 PCR 仪检测,应用 Relative Quantification Software Ver 1.0 软件进行分析,结果以待测基因(TLR2/4)与  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的比值表示,具体操作参照试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学分析:**用 SPSS 10.0 软件包进行分析,检测结果以均数±标准差( $\bar{x}$ ±s)表示,经方差齐性检验后,各组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

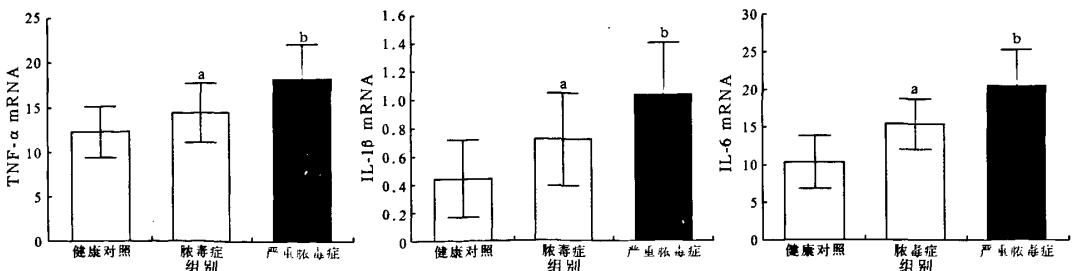
### 2 结果

**2.1 脓毒症前炎症细胞因子表达(表 1,图 1):**以 real-time PCR 和 ELISA 检测,结果显示,与健康对照组比较,脓毒症组前炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 和蛋白表达均明显增高,且严重脓毒症组较脓毒症组升高更加明显,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。

表 1 ELISA 检测各组血浆脓毒症前炎症细胞因子蛋白水平( $\bar{x}$ ±s) pg/L

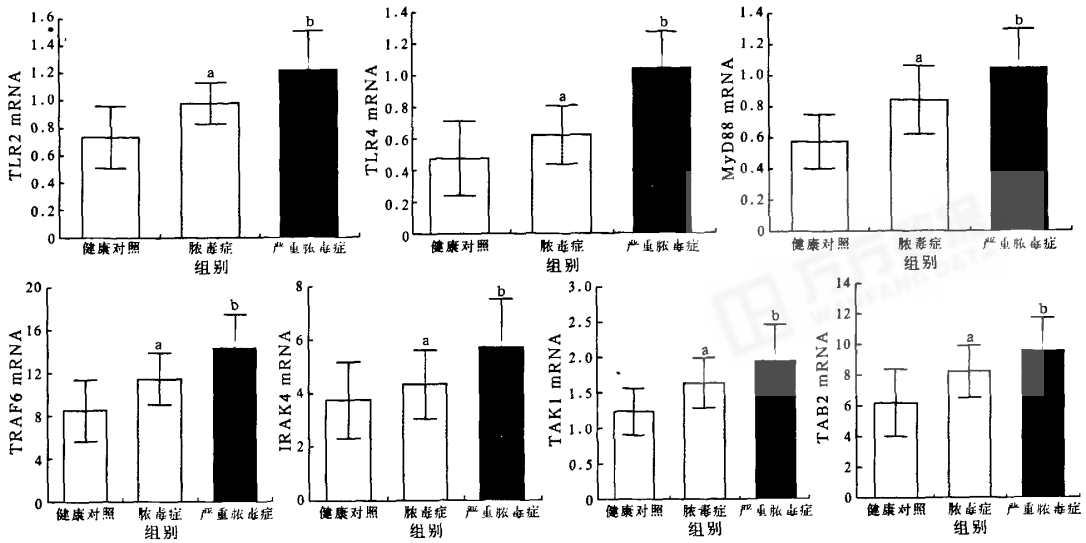
组别	例数	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
健康对照组	17	122.1±389.1	460.7±149.9	336.3±136.7
脓毒症组	10	684.7±433.5 <sup>a</sup>	2224.9±465.7 <sup>a</sup>	1442.4±654.6 <sup>a</sup>
严重脓毒症组	13	3326.1±930.5 <sup>b</sup>	3200.7±1005.5 <sup>b</sup>	2893.1±795.1 <sup>b</sup>

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$



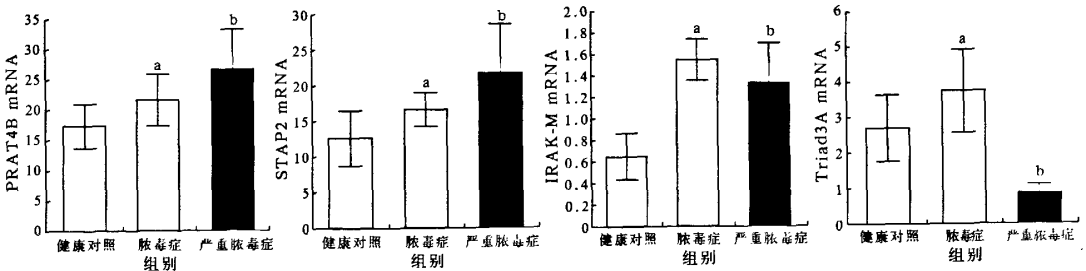
注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与脓毒症组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 Real-time PCR 检测各组血浆脓毒症前炎症细胞因子 mRNA 表达结果



注:与健康对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与脓毒症组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

图 2 Real-time PCR 检测各组血浆脓毒症 TLRs 信号途径转导分子 mRNA 表达结果



注:与健康对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与脓毒症组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

图 3 Real-time PCR 检测各组血浆脓毒症 TLRs 信号途径调节因子 mRNA 表达结果

**2.2 脓毒症 TLRs 信号途径转导分子表达(图 2):** 用 real-time PCR 检测,脓毒症组信号途径转导分子 TLR2、TLR4、髓样细胞分化蛋白-88(MyD88)、TNF 相关因子 6 (TRAF6)、IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4)、转化生长因子- $\beta$  活化激酶 1 (TAK1) 及 TAK1 结合蛋白 2 (TAB2) mRNA 表达较健康对照组明显升高,严重脓毒症组较脓毒症组表达更高,差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.3 脓毒症 TLRs 信号途径调节因子表达(图 3):** real-time PCR 检测,脓毒症组 PBMC TLRs 信号转导途径正性调节因子 TLR4 相关蛋白 (PRAT4B) 和信号转换接头蛋白 2 (STAP2) 及负性调节因子 IL-1 受体相关激酶 3 (IRAK-M) 及核转录因子- $\kappa$ B 抑制性锌指蛋白 (Triad3A) 的 mRNA 表达明显高于健康对照组,严重脓毒症组较脓毒症组正性调节因子显著增高,负性调节因子显著降低,差异均有统计学

意义( $P$  均  $< 0.01$ )。

### 3 讨论

研究已证实 TLRs 信号途径通过激活 NF- $\kappa$ B 调控前炎症细胞因子基因转录<sup>[9]</sup>。本研究表明,脓毒症患儿 TLR4 和 TLR2 异常活化,进一步观察其 TLRs MyD88 依赖性途径主要相关分子 TRAF6、IRAK4、TAK1、TAB2 的 mRNA 表达也明显增加,且随病情加重增加更明显,证实脓毒症存在 TLRs 信号途径的异常活化;同时观察到前炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 和蛋白水平随病情严重程度增加亦增加,这种改变与 TLRs 信号途径转导分子表达相一致。提示 TLRs 信号途径异常活化参与了脓毒症患儿炎症反应的发生发展。

新近研究发现多种调节因子对 TLRs 信号途径形成正性或负性反馈回路,参与调控 TLRs 信号途径活化过程。正性调节因子 PRAT4B 与 TLRs 的糖

基化修饰及蛋白成熟有关,抑制 PRAT4B 表达可导致单核/巨噬细胞(MΦ)表面 TLR4 表达减少<sup>[10]</sup>, STAP2 可与 MyD88 和 IK 激酶 α/β(IKK-α/β) 结合,增强 NF-κB 的活性,诱导前炎症细胞因子基因表达<sup>[11]</sup>;负性调节因子 IRAK-M 和 IRAK/MyD88 结合形成复合物,阻止 IRAK1/IRAK4 从 MyD88 解离,从而阻止 IRAK-1-TRAF6 复合物形成<sup>[12]</sup>。Triad3A 是一种 E3 泛素连接酶,催化 TLR4 蛋白降解而减弱 TLR4 的信号转导<sup>[13]</sup>。上述几种正性或负性调节因子可从不同环节调控 TLRs 信号转导途径,控制前炎症细胞因子表达和产生,维持适当的炎症免疫反应。

导致脓毒症 TLRs 信号转导途径调控失衡的机制仍不清楚。我们在观察了不同阶段脓毒症患儿正性调节因子和负性调节因子变化后发现,随病情加重,正性调节因子 PRAT4B 和 STAP2 基因表达明显增高,而负性调节因子 IRAK-M、Triad3A 基因表达则降低。比较分析脓毒症组和严重脓毒症组调节因子表达与前炎症细胞因子表达水平的关系,注意到正性调节因子越高,负性调节因子越低,前炎症细胞因子水平就越高,严重脓毒症组正性调节因子显著高于脓毒症组,负性调节因子低于脓毒症组,其前炎症细胞因子明显高于脓毒症组,提示脓毒症炎症免疫反应可能与 TLRs 信号途径正负性调节反馈回路调控失衡有关。TLRs 相关内源性或外源性配体触发 TLRs 信号途径的同时启动了正性或负性调节因子表达,由于某些因素(遗传或内外环境因素)的影响,脓毒症患儿 PRAT4B 等正性调节因子表达增加,而负性调节因子并未随正性调节因子表达增加而增加,随着负性调节因子表达绝对低下或相对不足,TLRs 信号途径转导分子表达进一步增加,IL-1β 等前炎症细胞因子表达水平明显升高,最终导致前炎症细胞因子过度表达,形成异常的前炎症细胞因子级联反应。当前已有研究证实,多靶点调控炎症因子表达而阻断前炎症细胞因子的级联反应有助于脓毒症患者的恢复<sup>[14-15]</sup>。值得注意的是,本研究中观察到脓毒症患儿多种调节因子失衡,在多层次复杂的调节因子网络中应进一步探讨哪种调节因子是导致脓毒症异常免疫炎症反应的主要因子,哪些为次要因子或继发改变的伴随因子,从而进一步澄清脓毒症炎症免疫反应机制,并有望为新的诊断治疗手段提供新思路。

参考文献

[1] Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis; a new hypothesis for

pathogenesis of the disease process[J]. Chest, 1997, 112(1): 235-243.

[2] Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloëz-Tayarani I, et al. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon; a review [J]. J Endotoxin Res, 2001, 7(2): 85-93.

[3] Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-κB expression in mononuclear cells of patient with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(5): 1877-1883.

[4] 龚非力. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2004: 272-276.

[5] 李志杰, 刘靖华, 姜勇. Toll 样受体的发现及其研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(11): 694-697.

[6] 姚咏明, 鄢小建, 姚风华, 等. 严重腹腔感染大鼠组织 Toll 样受体 2/4 基因表达及其调节机制[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(11): 646-650.

[7] 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(2): 312-319.

[8] 樊寻梅, 整理. 儿童感染性休克(脓毒性休克)诊疗推荐方案 [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(8): 596-598.

[9] Takeda KT, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity [J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 1-14.

[10] Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, et al. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulate its cell surface expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(4): 1076-1082.

[11] Sekine Y, Yumioka T, Yamamoto T, et al. Modulation of TLR4 signaling by a novel adaptor protein signal-transducing adaptor protein-2 in macrophage [J]. J Immunol, 2006, 176(1): 380-389.

[12] Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling [J]. Cell, 2002, 110(2): 191-202.

[13] Chung TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors [J]. Nat Immunol, 2004, 5(5): 495-502.

[14] 曲爱君, 吴铁军, 刘桂清, 等. 大黄对 SIRS 和 MODS 患者肿瘤坏死因子-α 及白介素的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(1): 43-45.

[15] 崔克亮, 曹书华, 王今达. 大承气汤对多器官功能障碍综合征防治作用的临床研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(1): 12-15.

(收稿日期: 2007-12-30 修回日期: 2008-02-22)  
(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: 监护仪 ..... (封二)
- ②廊坊爱尔: 炭肾 ..... (插页)
- ③日本旭化成株式会社:  
全自动和持续徐缓式血液净化装置 ..... (插页)
- ④广东天普药业: 天普洛安 ..... (插页)
- ⑤珠海丽珠: 丽珠血液灌流器 ..... (插页)
- ⑥天津红日药业: 血必净注射液 ..... (插页)
- ⑦锐普生物: TnI 试剂盒 ..... (插页)
- ⑧瑞士雅培: i-STAT 血液分析仪 ..... (封底)