

· 论著 ·

# 脓毒症患者单个核细胞 Toll 样受体 4 表达与内毒素耐受的关系

滕国杰 聂秀红

**【摘要】 目的** 观察革兰阴性菌感染所致脓毒症患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达与内毒素耐受之间的关系。**方法** 以重症监护病房治疗的 32 例革兰阴性菌感染所致脓毒症患者为研究对象,另选 20 例为健康对照组。两组入选人员均晨起空腹采血,分离外周血单个核细胞,采用流式细胞仪技术检测单个核细胞表面 TLR4 的表达;另一部分外周血分离单个核细胞,并加入 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  脂多糖 (LPS) 培养 24 h,同样进行流式细胞仪检测单个核细胞表面 TLR4 的表达。并应用放射免疫法测定血清及外周血单个核细胞培养液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度。**结果** (1)脓毒症组外周血单个核细胞表面 TLR4 表达、血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度均明显高于健康对照组(均  $P < 0.001$ )。(2)脓毒症组患者外周血单个核细胞经 LPS 刺激后培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度显著低于健康对照组(均  $P < 0.05$ ),脓毒症组患者外周血单个核细胞经 LPS 刺激后 TLR4 表达较刺激前轻度下调,但刺激前后组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论** 脓毒症患者外周血单个核细胞体外给予大剂量 LPS 刺激后可以产生内毒素耐受,但这种现象不能单纯用 TLR4 的表达下调解释,其可能存在更复杂的机制。内毒素耐受状况下,单个核细胞表现为促炎因子表达的明显下调。

**【关键词】** 脓毒症; 内毒素类; Toll 样受体 4; 外周血单个核细胞

**Expression of Toll-like receptor 4 on surface of peripheral blood mononuclear cells in septic patients and endotoxin-tolerant** TENG Guo-jie, NIE Xiu-hong. Respiratory Department of Xuanwu Hospital, Beijing 100053, China

Corresponding author: NIE Xiu-hong, Email: xiuhongnie@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate expression of Toll-like receptor 4 (TLR-4) on surface of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in septic patients with Gram-negative bacterial infections and whether correlated with lipopolysaccharide (LPS) tolerance. **Methods** Thirty-two patients, who were diagnosed as sepsis infected with Gram-negative bacteria in Intensive Care Unit of our hospital, and twenty health person as control group were studied. Morning blood samples of these person were obtained to isolated PBMCs. Expression of TLR-4 on surface of the PBMCs was quantitatively analyzed by direct immunofluorescence using flow cytometer. The isolated PBMCs were cultured with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hours. Expression of TLR-4 on surface of cultured PBMCs was also measured by flow cytometer. Concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) in serum and culture supernatant were measured by radioimmunoassay. **Results** (1) PBMCs isolated from septic group had significantly increased expression of TLR-4 compared to those from healthy controls ( $P < 0.001$ ). The concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum were also significantly increased in the septic group, compared to those in healthy controls (all  $P < 0.001$ ). (2) After stimulation by LPS, the concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 in culture supernatant of the PBMCs from the septic group were significantly decreased compared to those from healthy controls (all  $P < 0.05$ ). Expression of TLR-4 on surface of the PBMCs from the septic group was decreased slightly, but there was no significant difference compared to the unstimulated PBMCs from the septic group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** After stimulation by LPS, the LPS tolerance could be seen in isolated PBMCs from the septic group, but it does not

depend only on reductions of TLR-4 expression, and other complex mechanisms could be involved. Down-regulation of proinflammatory cytokine release could be seen in endotoxin-tolerant monocytes.

**【Key words】** Sepsis; Endotoxins; Toll-like receptor 4; Peripheral blood mononuclear cell

尽管医疗技术飞速发展,脓毒症死亡率仍居高不下,脓毒症休克的死亡率更高达30%~50%<sup>[1]</sup>,对脓毒症及其相关机制的深入研究,降低脓毒症患者的死亡率是目前的研究热点<sup>[2-3]</sup>。Toll样受体4(TLR4)是革兰阴性菌细胞壁脂多糖即内毒素受体,在其导致的脓毒症的病理生理发展过程中具有重要地位。本研究旨在通过观察革兰阴性菌所致脓症患者外周血单个核细胞TLR4的表达及其与内毒素耐受之间的关系,初步探讨脓症患者内毒素耐受状况及其可能的机制,对脓毒症的发生发展机制进行探索。

## 对象与方法

1. 研究对象:以首都医科大学宣武医院2007年3月至2010年3月入重症监护病房治疗的脓症患者为研究对象。随机选取32例患者,所有患者均有明确革兰阴性菌感染的证据(痰培养、尿培养、腹腔培养、血培养阳性),且符合2001年美国危重病医学会脓毒症诊断标准<sup>[1]</sup>。所选患者在诊断脓毒症72h内进行试验,并除外终末期肝肾疾病、糖尿病、恶性肿瘤、垂体疾病、免疫缺陷疾患及近3个月内使用激素或免疫抑制剂者。另取健康志愿者20例为健康对照组,并根据入选患者年龄、性别进行匹配。所有入选者均签署知情同意书。

2. 方法:入选人员晨起空腹采静脉血20ml,肝素抗凝,密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,将细胞悬液置于2个细胞培养皿内,放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中孵育2h,收集贴壁单个核细胞,调节细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。一个细胞培养皿内的细胞直接进行流式细胞仪检测单个核细胞表面TLR4表达。另一细胞培养皿内的细胞,加入RPMI1640培养液,重悬细胞,并加入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)1μg/ml,培养皿放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中孵育24h,之后收集贴壁的单个核细胞,调节细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。同法进行流式细胞仪检测单个核细胞表面TLR4表达。同时收集培养皿中的细胞培养上清液,测定细胞因子。

采用流式细胞仪(BD公司, FACSCalibur型)直接免疫荧光标记法检测单个核细胞表面TLR4表达。测定管取100μl细胞悬液加入10μl PE-抗人-TLR4单抗(购自美国eBioscience公司),10μl FITC-抗人-CD14单抗(购自美国eBioscience公司)。对照管取100μl细胞悬液加入10μl FITC-抗人-CD14单抗及10μl PE-mouse-IgG2α单抗(购自美国eBioscience公司)。用测定管与对照管平均荧光强度的比值表示TLR4的相对表达量。

采用放射免疫分析法检测血清及细胞培养上清液中TNF-α、IL-6的浓度,试剂盒为北京华英生物技术研究所提供。

3. 统计学分析:应用SPSS 11.5统计软件包分析。计量资料均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,配对资料间比较采取配对t检验,两组间比较采用独立样本t检验,计数资料比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 一般情况比较:脓毒症组32例,男22例,女10例,患者年龄32~91岁,平均(64.50±15.67)岁,所患病种包括肺部感染12例(痰培养为肺炎克雷伯菌5例,铜绿假单胞菌7例)、泌尿系感染6例(尿培养均为大肠杆菌)和腹腔感染14例(腹腔培养液为大肠杆菌6例,血培养为大肠杆菌8例)。健康对照组20例,男12例,女8例,年龄29~75岁,平均(63.70±14.64)岁。两组间年龄、性别无统计学差异。

2. 外周血单个核细胞表面TLR4表达及血清TNF-α、IL-6浓度比较(表1):与健康对照组相比,脓毒症组外周血单个核细胞表面TLR4表达、血清TNF-α、IL-6浓度均明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

3. LPS刺激后外周血单个核细胞表面TLR4表达比较(表2):给予LPS 1μg/ml刺激后,健康对照组外周血单个核细胞表面TLR4表达较刺激前明显升高( $P < 0.01$ );脓毒症组外周血单个核细胞表面TLR4表达

较刺激前轻度下调,但刺激前后并无统计学差异( $P > 0.05$ )。

4. LPS 刺激后细胞培养上清液中细胞因子浓度比较(表3):给予 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  刺激后,脓毒症组患者细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度显著低于健康对照组(均  $P < 0.05$ )。

表1 两组外周血单个核细胞 TLR4 表达及血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TLR4	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	IL-6 (pg/ml)
脓毒症组	32	8.66 $\pm$ 1.13	1.81 $\pm$ 0.33	209.17 $\pm$ 44.96
健康对照组	20	3.19 $\pm$ 1.10	1.11 $\pm$ 0.37	87.65 $\pm$ 15.06
<i>t</i> 值		17.169	7.056	14.078
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

表2 两组给予 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  刺激前后外周血单个核细胞 TLR4 表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	LPS 刺激前	LPS 刺激后
脓毒症组	32	8.66 $\pm$ 1.13	8.36 $\pm$ 1.27
健康对照组	20	3.19 $\pm$ 1.10	8.76 $\pm$ 1.29

注:脓毒症组 LPS 刺激前后比较, $t = 1.117, P = 0.237$ ;健康对照组 LPS 刺激前后比较, $t = -19.564, P = 0$

表3 两组给予 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  刺激后上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	IL-6 (pg/ml)
脓毒症组	32	1.54 $\pm$ 0.45	166.38 $\pm$ 27.42
健康对照组	20	1.89 $\pm$ 0.57	285.94 $\pm$ 100.43
<i>t</i> 值		-2.499	-6.398
<i>P</i> 值		0.016	0.000

## 讨 论

细菌内毒素或细菌 LPS 是革兰阴性细菌细胞壁外膜的重要组成部分,TLR4 作为 LPS 的模式识别受体,是 LPS 识别与信号转导的重要元件,在 LPS 导致的脓毒症发生发展中起重要作用,其升高与革兰阴性菌感染密切相关<sup>[4-6]</sup>。Armstrong 等<sup>[7]</sup>的研究显示,正常人外周血单个核细胞在给予 LPS 刺激后,TLR4 mRNA 表达即可明显升高;Tsujimoto 等<sup>[8]</sup>发现腹腔感染的脓症患者外周血单个核细胞 TLR4 表达较正常人明显升高。本研究结果同样表明,革兰阴性菌感染的脓症患者外周血单个核细胞 TLR4 表达较健康人明显升高,并且健康对照组外周血单个核细胞在给予 LPS 刺激后 TLR4 表达亦升高,与上述结论一致。

虽然脓毒症时细胞因子大量释放,可引起严重的炎症级联反应,甚至出现脓毒症性休克、多脏器功能衰竭。但生物在长期进化过程中形成了某些保护性调节机制,以避免机体对内毒素刺激的持续过度反应,内毒素耐受是其中之一<sup>[9-10]</sup>。内毒素耐受是预先受到小剂量或亚致死量 LPS 刺激后,机体对大剂量或致死量 LPS 呈低反应甚至无反应的现象。有观点认为 TLR4 表达下调可导致内毒素耐受的产生,Nomura 等<sup>[11]</sup>对小鼠腹腔巨噬细胞研究结果显示 TLR4 表达下调可导致小鼠腹腔巨噬细胞产生内毒素耐受。本研究旨在观察革兰阴性菌所致脓症患者外周血单个核细胞 TLR4 的表达及其与内毒素耐受之间的关系。由于脓症患者外周血单个核细胞在体内已经受到小剂量 LPS 的刺激,当体外再次给予大剂量 LPS 刺激后,我们观察到其外周血单个核细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度显著低于健康对照组(均  $P < 0.05$ ),提示脓症患者外周血单个核细胞产生内毒素耐受,大剂量 LPS 刺激后,炎症因子较正常人明显减少。但脓毒症组与健康对照组相比,外周血单个核细胞给予 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 刺激后 TLR4 表达差异无统计学意义,即细胞因子分泌的下调未伴随 TLR4 表达的下调,提示革兰阴性菌感染的脓症患者外周血单个核细胞产生内毒素耐受现象并不能单纯用 TLR4 表达下调来解释。

我们分析引起脓症患者内毒素耐受现象可能与 TLR4 下行信号通路改变相关,而不是 TLR4 在细胞膜表面的表达数量。在产生内毒素耐受的过程中,TLR4 下行传导通路上的受体、衔接蛋白和转录因子在数

量、结构和功能上的改变在减少致炎细胞因子、升高抗炎因子和活化特殊的信号传导通路方面有重要作用<sup>[12-13]</sup>。TLR4介导LPS信号传递,信号由TLR4传到胞内后,再顺序传递给髓样细胞分化因子88(Myeloid differentiation factor, MyD88)、白介素-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK)、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)等,最终启动细胞因子转录、翻译,导致炎症因子释放<sup>[14]</sup>。在此过程中任何改变均可影响最终炎症因子的产生和分泌。文献报道MyD88<sup>[15]</sup>、IRAK<sup>[16]</sup>、NF- $\kappa$ B<sup>[17]</sup>均参与内毒素耐受的调控,显示脓毒症患者内毒素耐受现象是一个复杂的调控机制,难以用单一的TLR4受体表达改变解释,仍需进一步加以研究。

### 参 考 文 献

- [1] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units; results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 2006, 34:344-353.
- [2] 张爽, 赵英萍, 梁锦云, 等. 血N末端B型利钠肽原水平对脓毒症患者的治疗及预后判断[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 2735-2737.
- [3] 黄顺伟, 管向东, 陈娟, 等. 免疫调理治疗改善脓毒症炎症因子、体液和细胞免疫以及预后的作用[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2009, 3:1645-1652.
- [4] Härter L, Mica L, Stocker R, et al. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*, 2004, 22:403-409.
- [5] Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*, 2007, 212:715-722.
- [6] Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, et al. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock*, 2008, 29:315-321.
- [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. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136:312-319.
- [8] Tsujimoto H, Ono S, Majima T, et al. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock*, 2005, 23: 39-44.
- [9] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*, 2009, 30:475-487.
- [10] Koons A, Crandall M, An GC, et al. Even ephemeral endotoxin exposure establishes endotoxin tolerance. *J Trauma*, 2008, 64:938-942.
- [11] Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*, 2000, 164:3476-3479.
- [12] 张杰, 万献尧. 全身性感染与Toll样受体2、4相关性研究进展. *医学与哲学*, 2009, 30:50-53.
- [13] Salomão R, Martins PS, Brunialti MK, et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock*, 2008, 30 Suppl 1:73-77.
- [14] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 1999, 162:3749-3752.
- [15] Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol*, 2007, 179:4083-4092.
- [16] Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 2002, 110:191-202.
- [17] Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*, 2004, 10:71-84.

(收稿日期:2011-04-08)

(本文编辑:吴莹)

滕国杰, 聂秀红. 脓毒症患者单个核细胞Toll样受体4表达与内毒素耐受的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(18):5319-5322.