

脓毒症外周血中 Toll 样受体 4 基因多态性及炎症因子表达分析



扫码阅读电子版

田铁英 徐喜媛 杨敬平

内蒙古包钢医院呼吸与危重症医学科, 包头 014010

通信作者: 杨敬平, Email: yangron@sina.com.cn

【摘要】 **目的** 观察脓症患者静脉血 Toll 样受体 4 (TLR4) 是否存在基因多态性, 同时了解 TLR4 mRNA、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 23 (IL-23)、降钙素原 (PCT)、C 反应蛋白 (CRP) 在不同严重程度脓症患者中的表达及对诊断的价值。**方法** 收集受试者外周血提取基因组 DNA, 应用基因测序及酶切方法检测 TLR4 Asp299Gly 位点多态性, RT-PCR 方法了解 TLR4 mRNA 表达, 酶联免疫吸附测定法监测血清中 IFN- γ 、IL-23、PCT、CRP 表达水平。**结果** (1) 在 TLR4 基因 Asp299Gly 位点不存在基因多态性。(2) 外周血 TLR4 mRNA 表达: 正常组第 1 天与急性生理和慢性健康评分 II (APACHE II) ≤ 20 组第 1 天、正常组第 1 天与 APACHE II > 20 组第 1 天、APACHE II ≤ 20 组第 1 天与 APACHE II > 20 组第 1 天差异均有统计学意义 ($t = 5.741, 14.780, 10.500, P$ 值均 < 0.01)。正常组第 7 天与 APACHE II ≤ 20 组第 7 天、正常组第 7 天与 APACHE II > 20 组第 7 天、APACHE II ≤ 20 组第 7 天与 APACHE II > 20 组第 7 天差异均有统计学意义 ($t = 4.186, 13.830, 9.645, P$ 值均 < 0.01)。(3) 脓症患者第 1 天、第 7 天血 IFN- γ 、IL-23、PCT、CRP 明显升高 (P 值均 < 0.01), TLR4 与 IFN- γ 、IL-23 呈正相关 (P 值均 < 0.01)。(4) TLR4、INF- γ 及 IL-23 分别取 891.6、84.5 及 861 $\mu\text{g/L}$ 为截断点, 对发现脓毒症的敏感度均为 100%, 诊断的特异度为 57%、57% 及 97%。**结论** (1) 在 TLR4 基因 Asp299Gly 位点未发现多态性。(2) 脓症患者 TLR4 mRNA、IFN- γ 、IL-23、PCT、CRP 高表达, 且随严重程度增加而增高。(3) TLR4 mRNA 与 IFN- γ 、IL-23 的表达可成为脓毒症的分子标记物。

【关键词】 脓毒症; Toll 样受体 4; 白细胞介素 23; 基因多态性

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.006

Expression of toll-like receptor 4 gene polymorphism and inflammatory factors in peripheral blood on patients with sepsis

Tian Tieying, Xu Xiuyan, Yang Jingping

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou 014010, China

Corresponding author: Yang Jingping, Email: yangron@sina.com.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the presence of toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphism on the venous blood of patients with sepsis. Meanwhile to observe the expression and the value of the diagnosis of TLR4 mRNA, interferon- γ (IFN- γ), interleukin-23 (IL-23), procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) on patients with different severity of sepsis.

Methods The subjects in the peripheral blood were collected to extract genomic DNA, gene sequencing and enzyme digestion method is applied to detection of TLR4 Asp299Gly loci polymorphism. The mRNA expression of TLR4 mRNA in peripheral blood was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of IFN- γ , IL-23, PCT and CRP were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** (1) The Asp299Gly site in sepsis do not exist polymorphism. (2) The expression of TLR4 mRNA in peripheral blood in patients with sepsis compared among different groups had significant differences on d1 [with Acute

Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) ≤ 20 group and APACHE II > 20 group vs normal group, and APACHE II ≤ 20 group vs APACHE II > 20 group, $t = 5.741, 14.780$ and 10.500 , all $P < 0.01$] and d7 (with APACHE II ≤ 20 group and APACHE II > 20 group vs normal group, and APACHE II ≤ 20 group vs APACHE II > 20 group, $t = 4.186, 13.830$ and 9.645 , all $P < 0.01$). (3) Blood IFN- γ , IL-23, PCT and CRP of d1, d7 in patients significantly elevated ($P < 0.01$). The concentration of IFN- γ , IL-23 were positively correlated with TLR4 mRNA concentration in sepsis. (4) The best cutoff value of TLR4 mRNA at baseline was $891.6 \mu\text{g/L}$, with a sensitivity of 100%, specificity of 57%. The best cutoff value of IFN- γ at baseline was $84.5 \mu\text{g/L}$, with a sensitivity of 100%, specificity of 57%. The best cutoff value of IL-23 at baseline was $861 \mu\text{g/L}$, with a sensitivity of 100%, specificity of 97%.

Conclusions (1) The Asp299Gly site in sepsis do not exist polymorphism. (2) The diagnostic rate of TLR4 mRNA, IFN- γ and IL-23 are relatively high in the diagnosis of sepsis. Patients with sepsis had high expression of TLR4 mRNA, IFN- γ , IL-23, PCT, and CRP, and increased with the increase of severity. (3) TLR4 mRNA, IFN- γ and IL-23 might be used as a biomarker for early diagnosis of sepsis.

【Key words】 Sepsis; Toll-like receptor 4; Interleukin-23; Gene polymorphism

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.006

脓毒症为机体对感染的反应失调所致的危及生命的器官功能障碍,进一步发展可导致感染性休克、多器官功能障碍综合征,是危重症领域首要解决的最常见的问题^[1]。尽管对脓毒症的认识水平及临床处理水平明显进步,但脓毒症的发病率和病死率仍无明显下降,并成为现阶段的主要医疗问题^[2]。在脓毒症早期阶段,疾病严重程度较难通过临床表现及客观指标判断,直接影响救治结果^[2]。因此,早期发现具有判断诊断及严重程度新标志物,对预后具有重要价值。研究表明,先天和适应性免疫反应与基因调控有重要关系^[3-8]。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)在先天免疫中扮演重要角色,通过识别病原分子,与相应受体结合,启动炎症信号转导通路^[3-4]。TLR4为TLRs家族成员,是重要的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)反应配体,参与炎症因子的产生^[3-4]。TLR4存在基因多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs),不同类型的SNPs影响TLR4对免疫炎症反应的调节及进展^[3-4]。目前,TLR4的SNPs研究主要集中在非亚裔人群有关Asp299Gly位点,亚裔人群包括汉族人群较少研究^[3-4]。所以,本研究主要目的是了解汉族脓毒症患者TLR4基因Asp299Gly位点的SNPs,通过监测不同严重程度患者血TLR4 mRNA及炎症因子的表达,观察其在脓毒症中可能的意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2014年8月至2017年11月入住内蒙古包钢医院呼吸与危重症医学科患者(均汉族),均符合SEPSIS 3.0的脓毒症诊断标准^[1]。排

除标准:(1)获得性免疫缺陷综合征患者;(2)器官移植术后进行免疫抑制治疗患者;(3)糖皮质激素治疗的患者(< 4 周);(4)8周内化疗治疗的患者;(5)年龄 < 18 岁的患者;(6)中途自动出院而退出者。分组:根据急性生理和慢性健康评分II(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, APACHE II)评分分组,APACHE II ≤ 20 组94例,患者APACHE II评分均 ≤ 20 ,男54例,女40例,年龄(64.9 ± 7.4)岁,年龄范围为55~78岁;APACHE II > 20 组68例,患者APACHE II评分均 > 20 ,男38例,女30例,年龄(63.8 ± 7.2)岁,年龄范围为50~75岁;正常组,相同时间来医院体检中心体检的健康成人,随机选取无近期感染史人群62例,男37例,女25例,年龄(64.5 ± 7.5)岁,年龄范围为50~75岁。入组研究对象在性别、年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则。

1.2 研究方法

1.2.1 标本留取 研究对象于入院当时第1天及入院第7天抽取静脉血4 ml,分为2管,第1管2 ml凝后以离心半径10 cm,3 000 r/min离心5 min分离血清,第2管2 ml加入2% EDTA抗凝。全部标本梯度降温法后冻存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,待批量检测。

1.2.2 TLR4基因多态性的检测 应用血液基因组柱式提取试剂盒(Blood Gen Mini Kit,中国康为世纪生物科技北京有限公司,目录号CW2087)提取样本DNA,应用全自动酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国)检测样本DNA浓度。扩

增 TLR4 基因 Asp299Gly 区域 (美国 ABI 公司 PCR 仪), 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> 数据库查询基因序列进行引物设计, 对所选位点应用 primer 5.0 引物设计软件进行目的基因引物设计, 引物包括正、反向引物。引物序列: TLR4 Asp299Gly, 上游引物: 5'-ATACTT-AGACTACTACCTCCATG-3', 下游引物: 5'-TTGTTGGAAGTGAAAGTAAG-3'。回收及纯化 PCR 产物 TLR4 Asp299Gly (TIANgel Midi Purification Kit, 中国天根生化科技北京有限公司, 目录号 DP209), 限制性内切酶 Nco I 酶切, 位点为 Nco I: 5'...C[∇]TCATGG...3'; 3'...GGTAC[∇]C...5', 应用琼脂糖凝胶进行电泳 (美国伯乐公司) 得到酶切产物, 然后分析限制性片断长度多态性 (以 DNA Marker I 为相对分子质量标准)。

1.2.3 基因测序 对纯化的 PCR 产物进行测序 (中国北京华大基因公司)。

1.2.4 外周血 TLR4 mRNA 检测 按照说明书进行反转录 PCR 提取单个核总 RNA 后, 行 Real Time PCR 检测 TLR4 mRNA 表达检测 (美国 ABI 公司 PCR 仪)。在 NCBI gene bank 上检索 TLR4 的编码区序列进行引物设计, 引物名称分别为: NR-H-TLR4-上游引物、NR-H-TLR4-下游引物、TH-GAPDH-上游引物及 TH-GAPDH-下游引物, 引物序列分别为: 5'-CATTGGTGT-GTCGGTCCTCA-3'、5'-CCAGTCCTCATCCTG-GCTTG-3'、5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT-C-3' 及 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'。

应用 ΔC_t 法进行定量结果计算 (平均相对含量 $\% = 2^{-\text{平均}\Delta C_t}$; $\Delta C_t_{\text{未知样品}} = C_{t_{\text{未知样品}}} - C_{t_{\text{内参}}}$), 内参为 GAPDH。

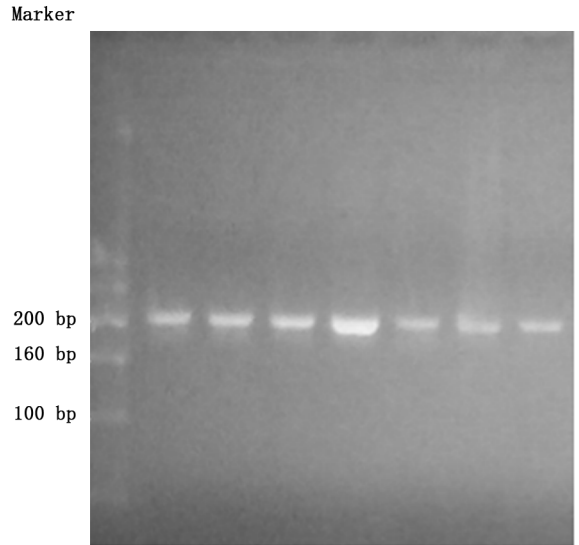
1.2.5 血清中 IFN- γ 、IL-23、PCT、CRP 含量检测 用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 严格按说明书进行检测。

1.3 统计学分析 应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计学计算, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对多组数据进行方差分析, 方差齐时, 采用单因素方差分析 (One way ANOVA), 方差不齐时, 采用秩和检验。相关性分析采用直线相关分析, 诊断脓毒症的敏感度及特异度采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。如存在基因多态性, 对基因遗传频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 运用 HaPloview 4.2 软件处理, 对样本间的基因型分

布及等位基因频率进行 χ^2 检验 [(双侧检验, $\alpha = 0.05$) 并计算等位基因频率的比值比 (odds ratio, OR) 值和 95% 的可信区间]。

2 结果

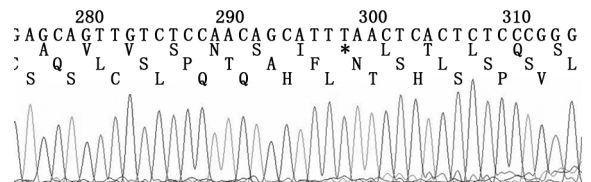
2.1 TLR4 Asp299Gly 酶切后结果 基因 TLR4 Asp299Gly 位点经限制性核酸内切酶 Nco I 酶切后, 可见基因 TLR4 Asp299Gly 位点 PCR 产物为 218 bp, 未见该位点基因突变 (图 1)。



注: 使用 DNA Marker 20; TLR4 为 Toll 样受体 4

图 1 TLR4 Asp299Gly 位点 Nco I 酶切产物电泳图

2.2 基因测序结果 对酶切前纯化的 PCR 产物进行测序, 结果见基因峰图显示良好, 未见 TLR4 (Asp299Gly) 位点的基因突变 (图 2)。

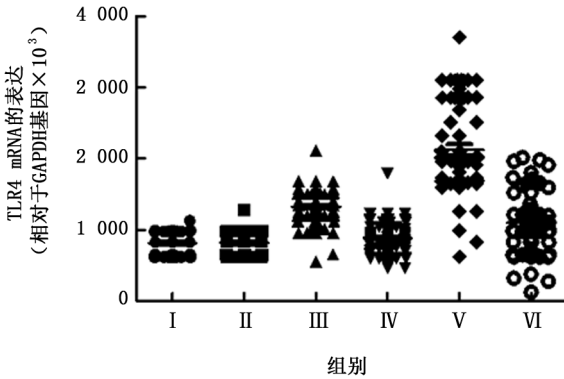


注: TLR4 为 Toll 样受体 4

图 2 TLR4 (Asp299Gly) 基因峰图

2.3 RT-PCR 检测外周血 TLR4 的 mRNA 表达 TLR4 mRNA 表达结果: 第 1 天正常组、APACHE II ≤ 20 组、APACHE II > 20 组 TLR4 mRNA 表达分别为 816 ± 162 、 $1\,324 \pm 231$ 、 $2\,124 \pm 639$ 。APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II > 20 组比正常组明显增高 ($t = 9.000$ 、 22.000 , P 值均 $< 0.000\,1$), APACHE II > 20 组比 APACHE II ≤ 20 组明显增高 ($t = 15.000$, $P < 0.000\,1$)。第 7 天正常组、APACHE II ≤ 20 组、APACHE II > 20 组 TLR4 mRNA 表达分别为 822 ± 167 、 $886 \pm$

206、1 097±448。APACHE II >20 组仍明显高于正常组及 APACHE II ≤ 20 组 ($t = 4.500$ 、 3.830 , P 值均 < 0.01), 正常组与 APACHE II ≤ 20 组差异无统计学意义 ($t = 1.100$, $P > 0.05$)。第 7 天 APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II >20 组 TLR4 mRNA 组内相比均较第 1 天明显下降 ($t = 8.700$ 、 17.000 , P 值均 < 0.000 1), 见图 3。



注: I 为第 1 天正常组; II 为第 7 天正常组; III 为第 1 天 APACHE II ≤ 20 组; IV 为第 7 天 APACHE II ≤ 20 组; V 为第 1 天 APACHE II >20 组; VI 为第 7 天 APACHE II >20 组; PBMC 为外周血单个核细胞; TLR4 为 Toll 样受体 4
图 3 各组 PBMC TLR4 mRNA 表达

2.4 ELSIA 法检测血清中 IFN-γ、IL-23 及 PCT 表达 第 1 天正常组、APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II >20 组 IFN-γ 分别为 ($107.9 ± 47.01$) μg/L、($183.3 ± 62.53$) μg/L 和 ($252.8 ± 83.52$) μg/L; IL-23 分别为: ($501 ± 223$) μg/L、($1 957 ± 657$) μg/L 和 ($2 980 ± 713$) μg/L; PCT 分别为 ($0.25 ± 0.06$) μg/L、($2.62 ± 4.03$) μg/L 和 ($5.97 ± 6.66$) μg/L; 第 1 天 APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II >20 组上述指标均比正常组明显增高 ($t = 7.564$ 和 13.550 , 19.000 和 31.800 , 4.020 和 9.010 , P 值均 < 0.01), APACHE II >20 组比 APACHE II ≤ 20 组均明显增高 ($t = 13.550$ 、 14.500 、 5.810 , P 值均 < 0.01)。

第 7 天正常组、APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II >20 组 IFN-γ 分别为 ($105.5 ± 47.01$) μg/L、($108.3 ± 47.46$) μg/L 及 ($154.9 ± 71.05$) μg/L; IL-23 分别为 ($499 ± 217$) μg/L、($536 ± 252$) μg/L 及 ($890 ± 359$) μg/L; PCT 分别为 ($0.25 ± 0.06$) μg/L、($0.99 ± 1.11$) μg/L 及 ($3.18 ± 4.17$) μg/L。

第 7 天正常组上述指标均与 APACHE II ≤ 20 组差异无统计学意义 ($t = 0.288 4$ 、 0.490 及 1.249 , P 值均 > 0.05), 但 APACHE II >20 组较

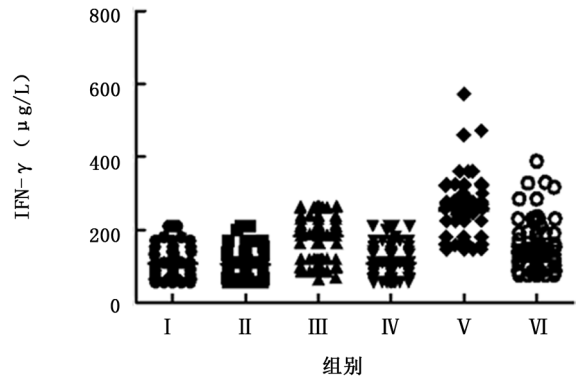
正常组上述指标仍明显增高 ($t = 4.619$ 、 4.800 及 4.606 , P 值均 < 0.01)。APACHE II >20 组较 APACHE II ≤ 20 组也均明显增高 ($t = 4.619$ 、 4.800 及 4.606 , P 值均 < 0.01)。

第 7 天 APACHE II ≤ 20 组及 APACHE II >20 组 IFN-γ、IL-23 及 PCT 组内相比均较第 1 天明显下降 ($t = 7.176$ 、 14.000 及 3.089 ; P 值均 < 0.001 及 0.01), 见表 1, 图 4~6。

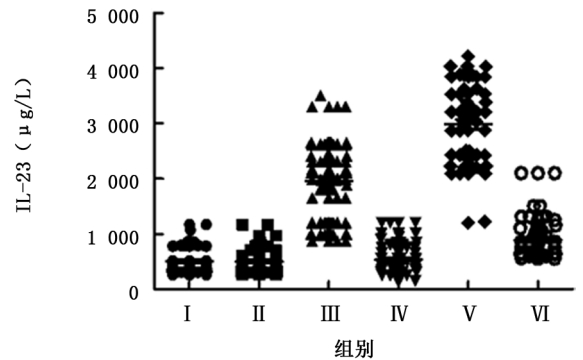
表 1 脓毒症患者不同指标 ROC 数值

| 指标 | 截断点 (μg/L) | AUC | 敏感度 (%) | 特异度 (%) |
|-----------------|------------|-------|---------|---------|
| Toll 样受体 4 mRNA | 891.60 | 0.975 | 100 | 57 |
| 干扰素 γ | 84.50 | 0.952 | 100 | 57 |
| IL-23 | 861.00 | 0.992 | 100 | 97 |
| 降钙素原 | 0.83 | 0.866 | 85 | 100 |
| C 反应蛋白 | 8.25 | 0.894 | 97 | 50 |

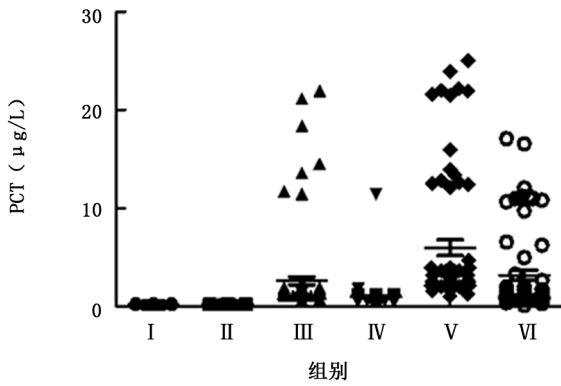
注: ROC 为受试者工作特征; AUC 为曲线下面积



注: IFN-γ 为干扰素 γ; I 为第 1 天正常组; II 为第 7 天正常组; III 为第 1 天 APACHE II ≤ 20 组; IV 为第 7 天 APACHE II ≤ 20 组; V 为第 1 天 APACHE II >20 组; VI 为第 7 天 APACHE II >20 组
图 4 血清中 IFN-γ 表达



注: I 为第 1 天正常组; II 为第 7 天正常组; III 为第 1 天 APACHE II ≤ 20 组; IV 为第 7 天 APACHE II ≤ 20 组; V 为第 1 天 APACHE II >20 组; VI 为第 7 天 APACHE II >20 组
图 5 血清中 IL-23 表达



注：PCT 为降钙素原；I 为第 1 天正常组；II 为第 7 天正常组；III 为第 1 天 APACHE II ≤ 20 组；IV 为第 7 天 APACHE II ≤ 20 组；V 为第 1 天 APACHE II > 20 组；VI 为第 7 天 APACHE II > 20 组

图 6 血清中 PCT 表达

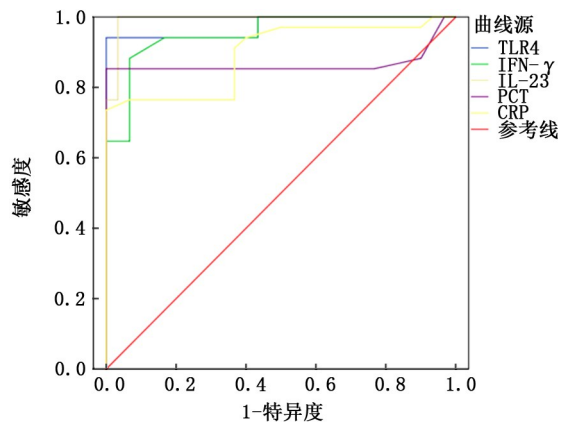
2.5 TLR4 mRNA 与 IFN-γ、IL-23 及 PCT 相关性分析 经直线相关分析，第 1 天 TLR4 mRNA 与 IFN-γ、IL-23 在 APACHE II ≤ 20 组和 APACHE II > 20 组的相关系数分别为 0.949、0.957 和 0.914 9、0.910，TLR4 mRNA 和 IFN-γ 及 IL-23 表达明显相关 (P 值均 < 0.000 1)。第 7 天 TLR4 mRNA 与 IFN-γ 及 IL-23 在 APACHE II ≤ 20 组和 APACHE II > 20 组的相关系数分别为 0.116 2 及 0.110 和 -0.175 1 及 0.040，TLR4 mRNA 和 IFN-γ 表达无相关性 (P 值均 > 0.05)。

2.6 TLR4 mRNA、IFN-γ、IL-23 对预测脓毒症的诊断价值 取入院第 1 天 TLR4 mRNA 及 IFN-γ、IL-23 数据计算 ROC 曲线，TLR4 mRNA、IFN-γ、IL-23、PCT 及 CRP 的曲线下面积 (area under curve, AUC) 分别为 0.975、0.952、0.992、0.866 及 0.894，均有较好的诊断敏感性。TLR4、IFN-γ 及 IL-23 分别取 891.6 µg/L、84.5 µg/L 及 861.0 µg/L 为截断点，对发现脓毒症的敏感度均为 100%，诊断的特异度为 57%、57% 及 97%。见图 7、表 1。

3 讨论

基因多态性指基因序列碱基变化形成的 SNPs，为遗传变异的常见情况。SNPs 可能导致如下结果：基因碱基序列的改变致其翻译蛋白质发生改变，产生机体功能，如应激易感性、临床表型及药物治疗反应变异；对蛋白质的氨基酸序列无影响而无功能改变^[3-4]。研究表明脓毒症发病中 TLRs 介导的信号转导通路所致的异常炎症反应起重要作用^[5]，所以，TLRs 基因多态性也可以使脓毒症的易感性及严重程度改变^[3-4]。由于 TLRs 的 SNPs

导致了细胞外结构域改变，影响了炎症因子的产生水平，从而导致 TLRs 介导的炎症反应程度改变^[5]。TLR4 的 SNPs 在 G⁻ 细菌介导的脓毒症中研究最为充分，其中 TLR4 Asp299Gly 天冬氨酸被甘氨酸取代和 Thr399Ile 苏氨酸被异亮氨酸取代研究最为充分^[6-7,9]。Lorenz 等^[6] 及 Agnese 等^[7] 研究表明，TLR4 的 SNPs 影响脓毒症发病、严重程度及预后。但也有报道表明 TLR4 Asp299Gly 及 Thr399Ile 基因多态性与脓毒症无关^[8,10]。本研究选择汉族脓症患者 TLR4 的 Asp299Gly 位点为研究对象，基因测序及相应基因位点酶切结果均未发现 TLR4 的 Asp299Gly 基因多态性，与 Ahren 等^[8,10] 的研究相似，也可能与本研究例数较少有关。



注：TLR4 为 Toll 样受体 4；IFN-γ 为干扰素 γ；PCT 为降钙素原；CRP 为 C 反应蛋白；ROC 为受试者工作特征

图 7 入院第 1 天受试者 TLR4、IFN-γ、IL-23、PCT、CRP ROC 曲线

TLRs 介导的炎症信号转导通路在机体免疫应答反应中起着重要的作用，研究发现病原体感染后 TLR4 激活，在诱导机体对感染的保护性免疫反应的同时，也介导全身免疫反应，对脓毒症的发生、发展有重要意义，监测其表达量可能及早诊断及判断病情严重程度^[5,9]。TLR4 主要分布在单核细胞中^[5]。所以，本研究选择表达最丰富的血单个核细胞，对脓症患者行 TLR4 mRNA 表达监测，以 APACHE II 评分 20 分为分界进行脓毒症严重程度分级，结果显示，TLR4 mRNA 表达随 APACHE II 评分增高，其表达水平与脓毒症严重程度直接相关。本研究结果说明炎症反应、疾病严重程度与血 TLR4 有关，为我们对脓毒症的诊断、评估及治疗提供了重要的标记物，将对我们进一步深入研究脓毒症发病机制提供重要帮助，与前述研究结果相同^[6-7,9]。

脓毒症的产生与 TLR4 通过识别 LPS 而激活 TLR2 和 TLR4 共同介导的跨膜信号转导通路有关, 结果导致失衡的炎症因子瀑布式释放^[9]。IL-23 是致炎性的异二聚体细胞因子, 属于 IL-12 家族, 由一个亚单位 p19 和 p40 通过二硫键形成。作为促炎症因子, IL-23 参与免疫细胞的分化、发育、增殖, 在炎症反应调节中起重要作用。IL-23 可作用于自然杀伤细胞, 诱导 IFN- γ 产生; 作用于记忆 T 淋巴细胞, 大量生成前炎症介质 IL-17^[11]。本研究发现脓症患者第 1 天 IFN- γ 、IL-23 的表达在正常组、APACHE II \leq 20 组、APACHE II $>$ 20 组之间差异均有统计学意义 (P 值均 $<$ 0.01); 第 7 天除正常组与 APACHE II $>$ 20 组比差异有统计学意义 ($P <$ 0.01) 外, 其余组间两两比较差异均无统计学意义 (P 值均 $>$ 0.05)。表明脓症患者随治疗时间的延长 IFN- γ 、IL-23 水平明显降低, 说明炎症反应明显减弱, 可能做为病情变化趋势判断的指标, 与 Gordon^[11] 的研究报道相似。本研究发现, 脓症患者早期 (第 1 天) TLR4 mRNA 表达与 IFN- γ 、IL-23 明显相关 (P 值均 $<$ 0.000 1), 第 7 天时 TLR4 mRNA 与 IFN- γ 、IL-23 表达无相关性 (P 值均 $>$ 0.05), 说明脓症早期 TLR4 mRNA 与 IFN- γ 、IL-23 表达同步, 但由于病例数较少, 阴性结果有待于扩大病例数证实。目前, 经典评估感染严重程度的实验室指标主要为 CRP 及 PCT, 但 CRP 不能区别炎症的类型。PCT 是降钙素前体, 于细菌感染时浓度升高, 对细菌感染引起的炎症有诊断价值^[12]。本研究监测了血清中 CRP、PCT 的表达, 表明其与 TLR4 mRNA 表达与 IFN- γ 、IL-23 升高同步, 证明上述指标具有经典标记物同等的临床意义, 与前述研究相似^[12]。

ROC 曲线可以对疾病诊断的敏感度和特异度的相互关系进行评定, ROC 的 AUC 与诊断价值成正比^[13]。本研究以第 1 天 TLR4 mRNA、IFN- γ 、IL-23、PCT、CRP 表达结果行 ROC 曲线分析, 相应的 AUC 分别为 0.975、0.952、0.992、0.866 及 0.894, 可见 TLR4 mRNA、IFN- γ 、IL-23 的 AUC 高于 PCT、CRP。本研究表明, TLR4 mRNA、IFN- γ 及 IL-23 分别取 891.6、84.5 及 861.0 $\mu\text{g/L}$ 为截断点, 对发现脓毒症的敏感度均为 100%, 诊断的特异度为 57%、57% 及 97%, 表明三者对脓毒症的早期诊断价值均较高 (敏感度均 100%)。可见, TLR4 mRNA、IFN- γ 、

IL-23 可作为早期诊断标记物, 且效能高于 PCT、CRP。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Javed A, Guirgis FW, Sterling SA, et al. Clinical predictors of early death from sepsis[J]. J Crit Care, 2017, 42:30-34. DOI: 10.1016/j.jcrc.2017.06.024.
- [2] Bhattacharjee P, Edelson DP, Churpek MM. Identifying patients with sepsis on the hospital wards[J]. Chest, 2017, 151(4):898-907. DOI: 10.1016/j.chest.2016.06.020.
- [3] Plantinga TS, Ioana M, Alonso S, et al. The evolutionary history of TLR4 polymorphisms in Europe [J]. J Innate Immun, 2012, 4(2):168-175. DOI:10.1159/000329492.
- [4] Thurow HS, Sarturi CR, Fallavena PR, et al. Very low frequencies of Toll-like receptor 2 supposed-2029T and 2258A (RS5743708) mutant alleles in southern Brazilian critically ill patients: would it be a lack of worldwide-accepted clinical applications of Toll-like receptor 2 variants? [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2010, 14(3):405-419. DOI: 10.1089/gtmb.2009.0169.
- [5] Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling [J]. Cell, 2006, 125(5):943-955.
- [6] Lorenz E, Mira JP, Frees KL, et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock[J]. Arch Intern Med, 2002, 162(9):1028-1032.
- [7] Agnese DM, Calvano JE, Hahn SL, et al. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections [J]. J Infect Dis, 2002, 186(10):1522-1525.
- [8] Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll like receptors and susceptibility to infectious disease[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(3):156-164.
- [9] 齐明禄, 杨敬平. TOLL 样受体基因多态性与脓毒症的相关性研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(1):146-147, 152.
- [10] Ahren P, Kattner E, Kohler B, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants[J]. Pediatr Res, 2004, 55(4):652-656.
- [11] Gordon MA. Salmonella infections in immunocompromised adults[J]. J Infect, 2008, 56(6):413-422. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.03.012.
- [12] Maruna P, Nedelniková K, Gürlich R. Physiology and genetics of procalcitonin[J]. Physiol Res, 2000, 49 Suppl 1:S57-S61.
- [13] Wu J, Hu L, Zhang G, et al. Accuracy of presepsin in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0133057. DOI: 10.1371/journal.pone.0133057.

(收稿日期: 2018-06-29)