

心脏体外循环手术 TLR4 的表达与术后呼吸机相关性肺炎关系的临床研究

耿 直,刘 翔,吴延虎,朱锦富,梁永年,唐义虎,张冬月,蔡 燧

(南京医科大学第一附属医院胸心外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨心脏体外循环手术中 Toll 样受体 4(TLR4)的表达变化与术后呼吸机相关性肺炎(VAP)发生发展的联系。**方法:**选取 20 例体外循环下心内直视手术的患者,根据术后是否发生呼吸机相关性肺炎分为两组:A 组(VAP 组),B 组(对照组)。分别于体外循环开始即刻(T1),体外循环后 20 min(T2),体外循环后 40 min(T3),体外循环结束即刻(T4)采集所有患者左心房血液,利用流式细胞术法观察粒细胞 TLR4 的表达变化。同时分析患者术前一般状况,术中体外循环手术情况,术后呼吸机相关性肺炎的发生发展状况。**结果:**有 8 例患者术后发生呼吸机相关性肺炎,其体外循环时间和术中 T3、T4 时间点左房血粒细胞 TLR4 的表达均显著高于未发生呼吸机相关性肺炎患者。**结论:**长时间体外循环通过激活 TLR4 促进术后呼吸机相关性肺炎的发生发展。

[关键词] 呼吸机相关性肺炎;心脏手术;体外循环;TLR4

[中图分类号] R654.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-837-04

The clinical research of the relationship between expression of TLR4 in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and ventilator-associated pneumonia

GENG Zhi, LIU Xiang, WU Yan-hu, ZHU Jin-fu, LIANG Yong-nian, TANG Yi-hu, ZHANG Dong-yue, CAI Yi

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To test the hypothesis that ventilator-associated pneumonia(VAP) after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) requires TLR4-dependent signaling. **Methods:** Twenty patients were categorized into two groups based on development of VAP following CPB, group with VAP (group A) and group VAP without (group B). The blood samples of left atrium were collected in both groups at the time points of preoperation (T1), 20 min (T2), 40 min (T3) and end (T4) of CPB. Expression of TLR4 on granular leukocyte was detected with flow cytometry. The clinical data of all cases in two groups were compared. **Results:** VAP occurred in 8 patients. CPB time in group A was statistically longer than in group B. The expression of TLR4 on granular leukocyte in group A at the time points of T3 and T4 were significantly higher than those in group B. **Conclusion:** Development of VAP after cardiac surgery with CPB was promoted by long CPB time via TLR4-dependent signaling activated.

[Key words] ventilator-associated pneumonia; cardiac surgery; cardiopulmonary bypass; TLR4

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 837-840]

心脏体外循环 (cardiopulmonary bypass, CPB) 手术后呼吸机相关性肺炎 (Ventilator-associated pneumonia, VAP) 的发生几率通常会大为增加^[1-2], VAP 是指在不肺部感染的呼吸衰竭患者,在气管插管或切开行机械通气治疗 48 h 后发生的肺部感染。导致 CPB 术后 VAP 发生发展的病原微生物主要为革兰氏阴性细菌,其主要致病成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 为 Toll 样受体 4 (TOLL-like

receptor 4, TLR4) 的天然配体^[3-4]。目前虽有体外循环中 TLR4 表达变化的研究,但对于 TLR4 与体外循环术后 VAP 的发生发展之间的联系,仍未见相关报道^[5]。因此,本文分析了 20 例心脏体外循环手术患者术中左房血粒细胞表面 TLR4 的表达变化及与术后呼吸机相关性肺炎发生发展的联系,初步探讨了 TLR4 在体外循环术后 VAP 发生发展中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

南京医科大学第一附属医院胸心外科 2011 年 6 月~2011 年 12 月接受体外循环心脏瓣膜置换或复杂先心病矫治手术的 20 例患者,均在静脉、吸入复合麻醉下,经胸骨正中切口,主动脉及右心房途径建立体外循环下行心脏直视手术。手术开始前 1 h 经静脉给予二代头孢类抗生素,术后予以呼吸机辅助呼吸,通气模式为压力调节容量控制通气模式 (pressure regulated volume control, PRVC),初始给氧浓度 60%。根据术后 VAP 的发生状况分为 VAP 组(A 组)与对照组(B 组),收集患者性别、年龄、体重,术前超声心动图检查的左室射血分数(LVEF)、血气分析、红细胞压积,术中体外循环时间、手术时间、主动脉阻断时间,术后入监护病房的氧合指数、机械通气时间、监护病房停留时间、拔管时血气分析、血液制品用量、病死率等资料。

1.2 方法

流式细胞术分析术中左房血粒细胞 TLR4 的表达状况,方法如下:①分别于体外循环开始即刻(T1),体外循环后 20 min(T2),体外循环后 40 min(T3),体外循环结束即刻(T4)使用 EDTA 抗凝管采集左心房回流血液 2 ml,充分混匀,置于 4℃冰箱保存;②取 5 个流式管分别标记为 A、B、C、D、E, A 管作为阴性对照,加入对照试剂 IgG PE 10 μl (BD 公司,美国);B、C、D、E 管先后加入标记试剂 Anti-Human CD284(TLR4) PE 10 μl (EB 公司,美国);③将患者血液标本充分混匀, A 管和 B 管内均加入 T1 时点的患者血液标本 100 μl, C 管内加入 T2 时点血液标本 100 μl, D 管内加入 T3 时点血液标本 100 μl,

E 管内加入 T4 时点血液标本 100 μl,置于漩涡混合器充分混匀;④将 A~E 管在 4℃冰箱内孵育 30 min;⑤将 A~E 管均加入人红细胞裂解素 1 ml 室温静置 15 min 至透光;⑥在 A~E 管加入 2 ml 1×PBS 1 500 r/min 离心 5min,弃上清,置于漩涡混合器充分混匀;⑦重复步骤⑥;⑧将 A~E 管均加入 1%的多聚甲醛,每管 100 μl,立即以流式细胞仪检测。

参照《医院获得性肺炎诊断和治疗指南》:①使用机械通气 48 h 以上或撤机拔管 48 h 内;②与机械通气前 X 线胸片比较,出现新的或进行性增大的肺部浸润性阴影;③肺实变体征和/或闻及湿性啰音、并至少具备下列条件两项者:①白细胞总数 > 10.0 × 10⁹ 个/L 或 < 4.0 × 10⁹ 个/L 伴或不伴核左移;②体温 > 38℃;③呼吸道有脓性分泌物;④起病后从支气管分泌物中分离到新的病原体。

VAP 排除标准:术前已存在下呼吸道感染者。

1.3 统计学方法

SPSS13.0 统计软件包对数据进行分析,统计学分析的数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,临床指标采用成组 *t* 检验进行比较 (*F* 检验表明所有数据均具有方差齐性),流式细胞学检验数据采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总体情况

手术顺利,20 例患者中有 8 例符合术后 VAP 诊断标准,发生率为 40%,其中 1 例自动出院,其余均无严重并发症发生。

2.2 术前临床资料比较

术前患者情况比较, A 组患者年龄较轻,红细胞压积较高,其余均无显著性差异(表 1)。

表 1 两组患者临床资料比较

组别	年龄(岁)	性别(男/女)	体重(kg)	氧分压(mmHg)	CO ₂ 分压(mmHg)	心功能(EF%)	红细胞压积(%)
A 组(<i>n</i> = 8)	40 ± 5.0*	3/5	52 ± 3.8	91.4 ± 6.1	35.1 ± 2.3	64.6 ± 1.2	43 ± 3*
B 组(<i>n</i> = 12)	51 ± 2.3	4/8	57 ± 2.2	98.1 ± 8.6	40 ± 1.6	66.7 ± 1.6	36 ± 2

与 B 组比较, **P* < 0.05。

2.3 术中体外循环情况比较

A 组患者体外循环时间显著长于 B 组,手术时

间、主动脉阻断时间和入监护病房时氧合指数无显著性差异(表 2)。

表 2 两组患者体外循环情况

组别	CPB 时间(min)	主动脉阻断时间(min)	手术时间(h)	入室氧合指数(mmHg)
A 组(<i>n</i> = 8)	133.9 ± 12.8*	69.5 ± 8.4	4.9 ± 0.6	447.6 ± 32.0
B 组(<i>n</i> = 12)	96.4 ± 11.3	67.7 ± 10.3	4.2 ± 0.3	396.9 ± 44.0

与 B 组比较, **P* < 0.05。

2.4 术后临床指标比较

两组患者呼吸机辅助时间、监护病房停留时

间、拔除气管插管时血气分析、24 h 引流量及血制品的使用均无统计学差异(表 3)。

表 3 两组患者术后临床指标比较

Table 3 Clinical index after operation comparison of two groups of patients

组别	呼吸机辅助(h)	ICU 停留(h)	氧分压(mmHg)	CO ₂ 分压(mmHg)	24 h 引流量(ml)	红细胞(U)	血浆(ml)
A 组(n = 8)	22.9 ± 6.4	40.7 ± 15.7	212.0 ± 32.8	39.9 ± 1.7	381.0 ± 64.7	4.83 ± 0.5	802 ± 106
B 组(n = 12)	20.8 ± 3.3	30.2 ± 4.6	220.0 ± 26.7	40.0 ± 1.0	530.0 ± 97.7	4.54 ± 0.9	991 ± 93

2.5 左房血白细胞 TLR4 表达比较

CPB 后左房血白细胞 TLR4 均显著升高, 术后发生 VAP 组(A 组)T3 和 T4 时点 TLR4 表达显著高于未感染组(B 组)(图 1)。

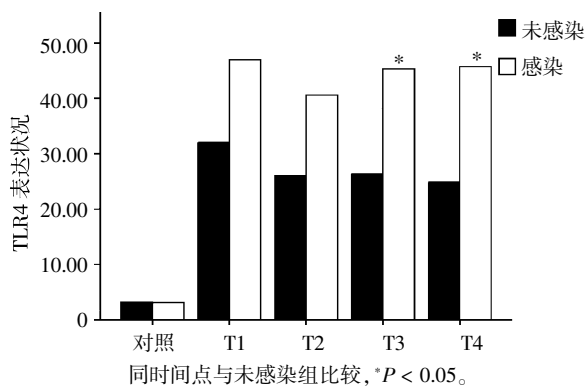


图 1 两组患者流式细胞术检测结果对比

Figure 1 FCM results comparison of two groups of patients

3 讨论

体外循环术后呼吸机相关性肺炎发生率高, 不仅有一定的病死率, 而且增加了患者的抗生素使用、住院时间和费用, 也降低了手术治疗效果。本研究也证实瓣膜置换或复杂先心病体外循环术后 VAP 发生的几率高达 40%, 因此如何减少 CPB 后 VAP 的发生几率以及减轻其程度, 一直是临床心脏外科医生关注的焦点, 对于心脏外科手术的治疗效果具有极其重要的意义。

体外循环术后呼吸机相关性肺炎的独立发生危险因素有以下几点: 首先来源于体外循环中的肺部损伤, 虽然体外循环肺损伤的机制至今未得到完全阐明, 但就目前的研究结果, 多数学者认为肺损伤的机制主要由血液成分与 CPB 管道表面接触引发的全身炎症反应及肺缺血再灌注损伤, 炎症反应造成局部肺组织的损伤, 增加了术后细菌感染的几率^[6-7]。其次为患者存在心功能不全或肺动脉高压。第三是机械辅助呼吸, 因此在体外循环后 48 h 内减少肺部损伤, 并停止机械通气辅助呼吸对于控制

肺部感染尤为重要。第四是手术中及手术后大量血制品的使用。其他, 二次开胸止血、胸骨哆开等, 也会显著增加术后肺部感染的几率, 可以作为独立因素存在^[8]。

本研究表明, 在条件相当的前提下, 过长的体外循环时间对术后呼吸机相关性肺炎的发生发展起决定性作用, 能显著增加 VAP 发生的几率, 其可能的机制是上调粒细胞表面 TLR4 受体的表达, 不仅加重肺部炎症损伤反应, 而且也增加了革兰氏阴性细菌感染的几率。

肺损伤的存在是术后肺部感染的重要诱因, 同时肺部感染又加重了损伤, 两者常形成恶性循环。TLR4 与肺损伤的发生发展关系密切, 不仅是肺部感染, 还包括非感染因素所致肺损伤, 特别是缺血再灌注损伤和外伤导致的肺部损伤, 此外还有机械通气、放射性肺损伤等^[9]。TLR4(-/-)基因敲除小鼠实验提示 TLR4-MyD88 介导的信号途径在肺部损伤中起主要作用, 臭氧层空洞导致的气道高反应性和肺部纤维化、出血性休克、吸入性肺炎导致的肺部损伤均与 TLR4 信号途径的激活密切相关^[10-11]。因此提示可以尝试通过调节 TLR4 信号途径来减少肺损伤, 已经证实一些药物, 如乌司他丁可以通过 TLR4 信号途径来减少包括肺损伤在内的多脏器功能损伤^[12]。

多项临床资料表明, 60%以上体外循环术后呼吸机相关性肺炎的主要致病菌为革兰氏阴性细菌, 包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希氏杆菌、肺炎克雷伯杆菌等, 除铜绿假单胞菌与 TLR5 信号途径相关外, 其余均主要通过 TLR4 信号途径激发机体的免疫炎症反应^[4,13]。

TLR4 主要识别革兰阴性细菌表面的脂多糖外, 还可识别其他配体, 已经证实的有热休克蛋白、呼吸道合胞病毒、纤维素原及某些真菌表面的多聚糖成分等^[14-15]。TLR4 所激活的主要细胞内信号正是控制着各种效应基因表达的核转录因子(nuclear factor kappaB, NFκB), MyD88 依赖性途径是细胞内

激活 NF κ B 的主要信号通路。此外还存在 TLR4 介导的非 MyD88 依赖性信号途径激活 NF κ B, 近年来的研究表明, 这条途径可能是 PI3K/Akt 信号途径, 作为体内免疫炎症反应的一条重要的反馈和平衡机制, 可能参与 TLR4 信号通路的负反馈调节^[16]。

总之, TLR4 信号途径与体外循环术后呼吸机相关性肺炎的发生发展关系密切, 正确认识和掌握体外循环术中 TLR4 的表达变化及与术后肺部感染损伤的关系, 是利用调节 TLR4 信号通路来有效预防和治疗体外循环后肺部感染的第一步, 具有非常重要的临床意义和实际应用价值。

[参考文献]

- [1] Tamayo E, Álvarez FJ, Martínez-Rafael B, et al. Ventilator-associated pneumonia is an important risk factor for mortality after major cardiac surgery[J]. *Journal of Critical Care*, 2012, 27(1): 18-25
- [2] Tang CW, Liu PY, Huang YF, et al. Ventilator-associated pneumonia after pediatric cardiac surgery in southern Taiwan [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2009, 42(5): 413-419
- [3] 生伟, 池一凡, 侯文明, 等. 65例心脏直视术后呼吸机相关肺炎临床分析[J]. *临床肺科杂志*, 2009, 14(1): 21-22
- [4] 赵霞, 廖崇先, 杨谦, 等. 心脏瓣膜手术后呼吸机相关肺炎的临床与病原学分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2009, 9(5): 330-333
- [5] Liangos O, Domhan S, Schwager C, et al. Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13658
- [6] Stocker CF, Shekerdemian LS, Horton SB, et al. The influence of bypass temperature on the systemic inflammatory response and organ injury after pediatric open surgery: a randomized trial[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 142(1): 174-180
- [7] Sitniakowsky LS, Later AF, van de Watering LM, et al. The effect of RBC transfusions on cytokine gene expression after cardiac surgery in patients developing post-operative multiple organ failure[J]. *Transfus Med*, 2011, 21(4): 236-246
- [8] 尤 颢, 廖崇先, 杨 谦, 等. 成人体外循环心脏术后呼吸机相关肺炎的危险因素分析[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2009, 8(2): 162-165
- [9] Roger T, Casson N, Croxatto A, et al. Role of MyD88 and Toll-Like receptors 2 and 4 in the sensing of parachlamydia acanthamoebae [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(12): 5195-5201
- [10] Reino DC, Pisarenko V, Palange D, et al. Trauma hemorrhagic shock-induced lung injury involves a gut-lymph-induced TLR4 pathway in mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e14829
- [11] Krzyzaniak M, Cheadle G, Peterson C, et al. Burn-induced acute lung injury requires a functional Toll-like receptor 4[J]. *Shock*, 2011, 36(1): 24-29
- [12] Yang Q, Liu X, Liu M, et al. Ulinastatin-mediated protection against zymosan-induced multiple organ dysfunction in rats[J]. *Biologicals*, 2010, 38(5): 552-556
- [13] Ramphal R, Balloy V, Huerre M, et al. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute Pseudomonas aeruginosa lung infections [J]. *J Immunol*, 2005, 175(6): 3927-3934
- [14] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature*, 2000, 408(6813): 740-745
- [15] Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, (183): 111-127
- [16] Tuanzhu Ha, Fang Hua, Xiang Liu, et al. Lipopolysaccharide-induced myocardial protection against ischaemia/reperfusion injury is mediated through a PI3K/Akt-dependent mechanism [J]. *Cardiovascular Research*, 2008, 78(3): 546-553

[收稿日期] 2012-03-07