

老年脓毒症患者外周血单核细胞 Toll 样受体表达谱的改变

黄 敏,周 静,毕立清,朱冬梅,周苏明*

(南京医科大学第一附属医院老年 ICU,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察老年脓毒症患者外周血单核细胞 Toll 样受体(TLR)表达谱的改变。方法:37 例脓毒症患者,按照年龄分为成年脓毒症组(<60 岁,17 例)、老年脓毒症组(≥ 60 岁,20 例),同时设立健康对照;成年对照组(<60 岁,20 例)、老年对照组(≥ 60 岁,20 例)。流式细胞仪检测外周血单核细胞 Toll 样受体的表达。结果:老年对照组、成年对照组均以 TLR6、TLR8 表达最高,两组间无明显差异。成年脓毒症组 TLR2 [(69.97 \pm 29.29)%]、TLR7 [(24.73 \pm 22.77)%]较成年对照组 TLR2 [(16.00 \pm 18.62)%]、TLR7[(3.92 \pm 3.06)%]明显增高($P < 0.05$)。老年脓毒症组 TLR2[(27.44 \pm 33.64)%]较老年对照组 TLR2[(3.61 \pm 5.92)%]明显增高($P < 0.05$)。老年脓毒症组 TLR2[(27.44 \pm 33.64)%]、TLR8[(15.30 \pm 21.25)%]较成年脓毒症组 TLR2[(69.97 \pm 29.29)%]、TLR8[(34.75 \pm 27.64)%]明显降低($P < 0.05$),余无明显差异。结论:正常老年人外周血单核细胞 Toll 样受体的分布与成年人相似,TLR2 在脓毒症患者中发挥着重要的作用,脓毒症时老年患者免疫反应较成年患者弱。

[关键词] 老年;脓毒症;Toll 样受体

[中图分类号] R592

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1367-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141018

脓毒症(sepsis)是感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),是创伤、烧伤、休克、感染等临床急危重患者严重的并发症之一,也是诱发脓毒性休克(septic shock)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要原因^[1-2]。在重症病例中脓毒症的病死率可高达 50%~68%^[3-5]。脓毒症的免疫病理机制以过度的炎症反应及获得性免疫减弱为特点^[6-7]。Toll 样受体^[8](Toll like receptors, TLRs)家族是哺乳动物最有特征的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),在机体的固有免疫和获得性免疫方面均具有重要的调节作用。它能够激活炎症反应,帮助消灭入侵的病原体,协调全身性的防御。TLRs 在脓毒症的发生、发展中起着重要的作用。随着年龄的增长,人体的多个器官和系统都将发生变化,而免疫系统衰退则尤为明显。本研究观察脓毒症时不同年龄组人体外周血单核细胞上各种 TLRs 表达的变化趋势,为进一步探讨 TLRs 在老年脓毒症患者中的免疫作用机制奠定基础。

1 对象和方法

1.1 对象

选择 2009 年 11 月~2012 年 8 月在南京医科大学第一附属医院老年 ICU 及普外科 ICU 收治的脓毒症患者 37 例,其中成年脓毒症组 17 例、老年脓毒症组 20 例,同时留取 40 例健康志愿者外周静脉血,分为成年对照组 20 例、老年对照组 20 例,具体性别及年龄分布见表 1。各组之间性别分布无差异,成年组(对照组及脓毒症组)年龄明显低于老年组(对照组及脓毒症组)($P \leq 0.05$),成年对照组与成年脓毒症组之间、老年对照组与老年脓毒症组之间年龄分布无差异。所有入选对象排除患有糖尿病、风湿免疫性疾病、肿瘤、慢性肝炎、肝硬化、艾滋病、近 3 个月内曾使用或正在使用免疫调节剂者。脓毒症诊断标准^[9]:全身炎症反应+微生物学证实或临床标准诊断感染。全身炎症反应定义为:体温 $>38.0^{\circ}\text{C}$ 或 $<36.0^{\circ}\text{C}$;心率 >90 次/min;呼吸频率 >20 次/min或过度通气致 PaCO₂ < 32 mmHg;白细胞计数 $>12\ 000$ 个/ μl 或 $<4\ 000$ 个/ μl ,具备其中 2 项以上即可认为是全身炎症反应。

1.2 方法

流式细胞仪检测:采集外周静脉血 1 ml 于 EDTA 抗凝管。取 100 μl 抗凝血,加入 10 μl 小鼠抗人 PE-TLR1 抗体(eBioscience 公司,美国),10 μl 小鼠抗人 FITC-CD14 抗体(BD 公司,美国)混匀,避光孵育 60 min,用红细胞裂解素裂解红细胞,PBS 洗 2 次后加入 0.3 ml PBS 重悬,上流式细胞仪(BD FAC-

[基金项目] 科教兴卫工程重点学科开放课题(XK16200901)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhousmco@aliyun.com

表 1 各组受试者性别及年龄分布

组别	性别 (男/女)	年龄分布 (岁)	平均年龄 (岁)
成年对照组(n=20)	13/7	26~52	36.6 ± 7.1
成年脓毒症组(n=17)	15/2	24~59	39.1 ± 10.2
老年对照组(n=20)	16/4	62~91	78.8 ± 10.9
老年脓毒症组(n=20)	14/6	63~96	81.8 ± 7.7

SAria,美国)检测。同时以加入 IgG-FITC 和 IgG-PE 为阴性对照管。单核细胞 TLR1 的表达量以 TLR1 在 CD14 阳性细胞的百分率(%)来表示。按照 TLR1 的检测方法,用抗 TLR2~9 抗体(Biolegend 公司,美国)分别测定 TLR2~9 的表达。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS13.0 软件包完成统计处理。结

果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组资料先检验方差齐性,满足方差齐性的资料采用方差分析(One-Way ANOVA)方法进行各组间计量资料差异性比较及两两比较,不满足方差齐性的资料采用多组比较的秩和检验方法进行组间比较, $P \leq 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

老年对照组、成年对照组均以 TLR6、TLR8 表达最高,两组间无明显差异。成年脓毒症组 TLR2、TLR7 较成年对照组明显增高($P < 0.05$)。老年脓毒症组 TLR2 较老年对照组明显增高($P < 0.05$)。老年脓毒症组 TLR2、TLR8 较成年脓毒症组明显降低 ($P < 0.05$),余无明显差异(表 2)。

表 2 各组受试者外周血单核细胞表面 TLRs 分布

组别	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5
成年对照组	17.35 ± 13.93	16.00 ± 18.62	8.80 ± 13.82	4.09 ± 4.41	5.26 ± 5.48
成年脓毒症组	13.36 ± 13.97	69.98 ± 29.29*	0.93 ± 1.03	0.75 ± 0.88	5.21 ± 5.98
老年对照组	15.72 ± 19.91	3.61 ± 5.92	2.49 ± 7.64	9.59 ± 13.65	11.68 ± 17.53
老年脓毒症组	25.23 ± 22.79	27.44 ± 33.64**	5.70 ± 10.65	4.69 ± 6.01	4.52 ± 5.62
组别	TLR6	TLR7	TLR8	TLR8	TLR9
成年对照组	23.87 ± 11.26	3.92 ± 3.06	23.88 ± 20.16	23.88 ± 20.16	2.28 ± 3.69
成年脓毒症组	18.74 ± 20.48	24.73 ± 22.77*	34.75 ± 27.64	34.75 ± 27.64	0.19 ± 0.41
老年对照组	24.33 ± 24.93	10.91 ± 20.24	32.17 ± 30.48	32.17 ± 30.48	1.03 ± 1.45
老年脓毒症组	13.19 ± 17.48	10.54 ± 11.56	15.30 ± 21.25 [§]	15.30 ± 21.25 [§]	1.18 ± 2.96

与成年对照组比较,* $P < 0.05$;与老年对照组比较,** $P < 0.05$;与成年脓毒症组比较,[§] $P < 0.05$ 。

3 讨论

Toll 样受体是存在于生物机体中的一大类非常重要的模式识别受体,是主要表达于天然免疫系统细胞的跨膜蛋白。到目前为止,在哺乳动物已有 13 个 TLRs 家族成员被发现,在人类则发现了 11 个 TLRs 家族成员。Toll 样受体广泛分布于天然免疫细胞的表面,包括单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、上皮细胞及内皮细胞。不同的 Toll 样受体识别不同的配体。TLR2 常与 TLR1 或 TLR6 组成异源二聚体,配体主要是革兰阳性菌的脂蛋白和脂磷壁酸。TLR3 识别合成或病毒的双链 RNA。TLR4 基本上是同源性二聚体,是有效识别革兰阴性菌脂多糖(LPS)的关键受体。TLR5 识别革兰阴性菌和革兰阳性菌的鞭毛蛋白。TLR7~9 识别病原体的核酸成份^[10]。TLRs 信号转导可被病原微生物的保守结构——病原相关的分子模式所激活,从而启动免疫系统的防御反应,促进细胞因子的合成与释放,引发炎症反应,促

进免疫细胞膜表面表达相关免疫分子,促进免疫细胞的成熟和活化,调节免疫应答,诱导一氧化氮依赖性杀菌活性,在脓毒症中具有重要地位^[11]。研究显示,年龄相关的 TLR 功能障碍将影响先天和后天免疫系统的有效性^[12]。免疫系统的老化会增加感染的风险,降低清除病原体的能力,进而导致循环细胞因子水平升高的促炎环境^[13]。持续存在的促炎环境使得老年感染患者更易产生脏器功能的损害,继而进展为脓毒症、多脏器功能衰竭,危及生命。

年龄相关的 TLRs 功能障碍在免疫老化中发挥着重要的作用^[14],但其具体机制尚不十分明确,有学者认为可能与细胞表面受体表达下降有关。Van 等^[15]发现老年人外周血单核细胞表面的 TLR1 表达较年轻人下降。但目前的研究结果尚不一致,莱恩等^[16]研究 Toll 样受体 1、2、4、5 和 6 在年轻(8~10 周)和老年(>18 个月)C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞的表达结果显示,在基础水平老年组仅 TLR5 mRNA 转录较青年组明显减少。当巨噬细胞受革兰氏

阴性菌牙龈卟啉单胞菌刺激时,TLR5 转录明显下降,但其在细胞表面的表达却无明显改变。相反,细胞表面 TLR2 的表达显著减少,而 TLR2 mRNA 水平没有任何变化。本研究观察了老年人外周血单核细胞上 TLR1~9 表达的改变,发现在非感染状态下,老年人外周血单核细胞表面以 TLR8、TLR6、TLR1、TLR5 表达为主,TLR3、TLR9 表达最少,成年人以 TLR8、TLR6、TLR1、TLR2 表达为主,TLR7、TLR9 表达最少。这与以往研究相一致,单核细胞表面以 TLR1、2、4、5、6、8 表达为主^[17]。同时进一步分析显示老年人 TLR1~9 的表达与成年人无明显差别。一项在小鼠模型中的研究表明,虽然随着年龄的增长 LPS 诱导的 TNF- α 产生减少,但细胞表面 TLR4 的表达没有改变^[18]。同时亦有研究发现,老龄鼠巨噬细胞受 LPS 刺激后其 Toll 样受体信号转导通路相关蛋白 JNK、p38 及 MAPK 活化蛋白激酶均较年轻鼠下降^[19-20]。结合本实验结果,推测年龄相关的 TLRs 老化不一定表现在其表达水平的减少,可能表现在其对相应配体反应的减弱,及其下游信号转导通路的下降。

在人类 Toll 样受体家族中,TLR2 是表达范围最广,识别病原微生物及其产物种类最多的分子,参与炎症信号转导,介导天然抗感染免疫,因而被认为是一种中枢型模式识别受体^[21],在脓毒症的信号转导和病理生理过程中具有重要地位。TLR2 的基本结构为 I 型跨膜蛋白,分为胞外段、跨膜段和胞内段。胞外段识别广泛存在于病原体细胞表面的分子标志,同 PAMP 结合启动信号转导过程。跨膜区是富含半胱氨酸的结构域。胞内段与白细胞介素(IL)1 受体同源,被称为 TIR,约 200 个氨基酸大小,负责 TLR2 下游信号的转导。目前研究发现,TLR2 的胞内信号转导途径至少有 2 条。一是髓样分化蛋白 MyD88 依赖途径。即活化的 TLR2 的胞内 TIR 结构域与 MyD88 羧基端相互作用而使后者活化。MyD88 连接 TLR 到 IL 受体相关激酶家族成员,包括(IL)受体相关激酶 1 和 IL 受体相关激酶 4,进而激活肿瘤坏死因子 α 受体相关因子 6(TrAF6)。然后 TrAF6 诱导转化生长因子 β 活化激酶(TAK1)和丝裂原活化蛋白激酶的激酶 6(MKK6)的活化,继之分别活化 NF- κ B、JNK、p38 蛋白激酶^[22],进一步产生炎症因子。但是也有研究证明,除了 MyD88 依赖通路的核心反应外,尚有依赖于微生物产物的性质而诱导的另一种信号转导通路。目前,已经得到鉴定的含有 TIR 结构域的非 MyD88 转接蛋白有 3 种,分别为

TIRAP/MyD88 转接样蛋白、TRIF (TIR-containing adaptor molecule inducing IFN-beta)/TICAM-1 (TIR-containing adaptor molecule-1)以及 TICAM-2/TRAM (TRIF-related adaptor molecule) 蛋白。其中 MyD88 转接样蛋白在 TLR2 介导的信号通路中起作用,介导了 TLR2 非 MyD88 依赖的通路^[23]。本文发现在脓毒症时,成年患者 TLR2、TLR7 的表达较非感染时明显升高,老年患者的 TLR2 表达也较非感染时明显升高。但老年脓毒症患者的 TLR2 水平明显低于成年脓毒症组患者。因此,进一步证实了 TLR2 在脓毒症过程中发挥着重要的作用。另外,尽管在非感染状态下老年人外周血单核细胞的 TLR 表达与成年人比较无差别,但在脓毒症时其 TLR2 的升高较成年患者明显减弱,提示脓毒症时老年患者的 TLR2 功能是受损的,对配体反应减弱,进而导致下游的信号通路激活受限,使其清除外来病原体能力下降,使得感染容易迁延不愈。

本研究中,初步观察了老年人外周血单核细胞在非感染状态及脓毒症时 TLR1~9 的表达,提示老年患者在脓毒症时其 TLR2 的反应较成年患者弱,为进一步研究老年脓毒症时 Toll 样受体的功能奠定了基础。但 TLR 表达对于年龄相关的 TLR 功能障碍的意义尚不十分确定。有待于运用构象敏感的抗体,在人体进行更广泛的研究,以更好地明确 Toll 样受体的表达在老年个体中的重要性。

[参考文献]

- [1] Klein Klouwenberg PM, Ong DS, Bonten MJ, et al. Classification of sepsis, severe sepsis and septic shock; the impact of minor variations in data capture and definition of SIRS criteria [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38(5): 811-819
- [2] Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012 [J]. *JAMA*, 2014, 311(13): 1308-1316
- [3] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012 [J]. *Critical Care Medicine*, 2013, 39(2): 165-228
- [4] Lopez-Bushnell K, Demaray WS, Jaco C. Reducing sepsis mortality [J]. *Medsurg Nurs*, 2014, 23(1): 9-14
- [5] Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and pathophysiology of sepsis [J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2013, 43(10): 260-263
- [6] Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Lipid mediators in

- immune dysfunction after severe inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(1):12-21
- [7] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(12):862-874
- [8] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(4):621-625
- [9] ACCP-SCCM Consensus Conference. Definitions of sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. *Crit Care Med*, 1992, 20(6):864-874
- [10] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response[J]. *Biochem J*, 2009, 420(1):1-16
- [11] Zwinkels RL, Dawson L. Immunoparalysis in sepsis[J]. *Neth J Med*, 2013, 71(5):243-245
- [12] Dunston CR, Griffiths HR. The effect of ageing on macrophage Toll-like receptor-mediated responses in the fight against pathogens[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 161(3):407-416
- [13] van Duin D, Shaw AC. Toll-Like Receptors in older Adults[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2007, 55(9):1438-1444
- [14] Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, et al. Innate immune function by toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly[J]. *Immunity*, 2012, 37(5):771-783
- [15] van Duin D, Mohanty S, Thomas V, et al. Age-associated defect in human TLR-1/2 function[J]. *J Immunol*, 2007, 178(2):970-975
- [16] Liang S, Domon H, Hosur KB, et al. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro[J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(8):538-546
- [17] Kéri S, Szabó C, Kelemen O. Expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 40:235-243
- [18] Boehmer ED, Meehan MJ, Cutro BT, et al. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated proinflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway[J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(12):1305-1313
- [19] Chelvarajan L, Popa D, Liu Y, et al. Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory phenotype of neonatal splenic macrophages[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(2):403-416
- [20] da Silva Correia J, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3):1845-1854
- [21] Li J, Lee DS, Madrenas J. Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-Dependent responses: Basic research and translational opportunities[J]. *Front Immunol*, 2013, 4:347
- [22] Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(4):357-366
- [23] Basu J, Shin DM, Jo EK. Mycobacterial signaling through toll-like receptors[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2:145

[收稿日期] 2014-04-27

(上接第 1359 页)

- et al. A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(10), 1821-1825
- [15] Chang CH, Wang RF, Tsai RY, et al. Significant association of XPD codon 312 single nucleotide polymorphism with bladder cancer susceptibility in Taiwan[J]. *Anti-cancer Res*, 2009, 29(10):3903-3907
- [16] Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, et al. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(3):536-542
- [17] Wu X, Gu J, Grossman HB, et al. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(3):464-479
- [18] Rouissi K, Ouerhani S, Hamrita B, et al. Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk factors affecting bladder cancer in northern tunisia[J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17(4):879-886

[收稿日期] 2014-05-27