

慢性阻塞性肺疾病患者外周血单个核细胞 TLR-9 mRNA 的表达水平及临床意义

皖南医学院附属芜湖市第二人民医院 温跃莹* 袁义 杨刚, 芜湖 241000

摘要 目的: 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者外周血单个核细胞 TLR-9 mRNA 的表达水平与血清白介素-1(IL-1)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平的相关性。方法: 分别采用 RT-PCR 法和 ELISA 法检测 55 例 COPD 患者和 45 例健康体检者 TLR-9 mRNA 的表达及血清 IL-1、IL-6、TNF- α 的水平。结果: COPD 急性加重期患者 TLR-9 mRNA 表达、IL-1、IL-6、TNF- α 水平显著高于 COPD 缓解期患者及健康对照者(均 $P < 0.05$); COPD 缓解期患者 TLR-9 mRNA 表达、IL-1、IL-6、TNF- α 水平显著高于健康对照者(均 $P < 0.05$); COPD 患者 TLR-9 mRNA 表达水平与 IL-1、IL-6、TNF- α 呈正相关性, 与第一秒用力呼气容积(FEV_1)、用力肺活量(FVC)、 FEV_1/FVC 和最大呼气流量(PEF)水平呈负相关性。结论: COPD 患者外周血单个核细胞 TLR-9 mRNA 表达水平可一定程度上反映机体炎症状态和肺功能受损的严重程度。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; Toll 样受体; IL-1; IL-6; TNF- α ; 相关性

中图分类号 R563 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20190312

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)主要以慢性不完全可逆的气流受限为特征^[1], 但具体病因现尚不完全清楚。既往研究认为吸烟、空气污染、细菌及病毒感染、遗传因素及固有免疫等均与 COPD 病情进展有关^[2~5]。本研究回顾性分析 COPD 患者在急性加重期和治疗后处于缓解期两个状态下外周血单个核细胞 TLR-9 mRNA 的表达及白介素-1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的水平, 进一步探讨 COPD 的发病机制。

资料与方法

一般资料 2016 年 1 月~2017 年 6 月皖南医学院附属芜湖市第二人民医院呼吸内科住院的 COPD 急性加重患者 55 例(男 24, 女 31), 年龄 48~65 岁, 平均(53.6 ± 11.4)岁(患者短期内咳嗽咳痰、痰量增多伴有脓痰或黏液脓痰、气短或喘息加重及发热等, 视为 COPD 急性加重期, 具体参考“中华医

学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组”于 2013 年制定的诊断指南^[6])。纳入标准: ①COPD 急性加重诊断明确; ②无其他严重合并症, 如严重肝肾功能不全、急性心肌梗死、恶性肿瘤及自身免疫性疾病等。排除标准: ①住院期间治疗效果不明显、治疗中断或治疗期间合并肺部真菌感染等; ②患哮喘、支气管扩张、充血性心力衰竭和肺结核等疾病。另选在本院体检中心进行健康体检且结果正常 45 人(男 21, 女 24)为对照组, 年龄 45~61 岁, 平均(53.5 ± 14.6)岁。2 组年龄和性别分布比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。2 组研究对象均签署知情同意书, 本研究经过医院医学伦理组织委员会批准。

外周血 PBMC 的分离 于清晨空腹采集 COPD 急性加重期患者和健康对照组患者外周静脉血 10 mL 置于含有肝素的抗凝管中并使用 10 mL 磷酸盐缓冲液稀释。在离心管中加入 10 mL Ficoll-Paque

表 1 2 组一般资料

组别	例	性别(例)		年龄 (岁)	吸烟史 (年)	FEV ₁ (L)	
		男	女			急性加重期	缓解期
观察组	55	35	31	53.6 ± 11.5	38	1.72 ± 0.23	2.01 ± 0.41
对照组	45	21	24	53.5 ± 14.6	—	—	—

组别	例	FVC(L)		FEV ₁ /FVC(%)		PEF(L/s)	
		急性加重期	缓解期	急性加重期	缓解期	急性加重期	缓解期
观察组	55	1.97 ± 0.16	2.81 ± 0.53	56.44 ± 7.31	62.31 ± 4.53	3.34 ± 0.86	6.61 ± 1.24
对照组	45	—	—	—	—	—	—

* 通信作者: 温跃莹, E-mail: xu871011@126.com

Plus,将稀释后外周血 20 mL 加入离心管中并在室温下离心 30 min (2 000 转/min),吸取血浆层和 Ficoll 层之间的单核细胞层于无菌试管中,加入 5 倍的磷酸盐缓冲液混匀并离心 5 min (1 000 转/min),去除上清液后得到单个核细胞。

实时定量 RT-PCR 检测 TLR-9 mRNA 水平 按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,使用紫外分光光度计分别测定波长为 260 nm 和 280 nm 的光密度值,确定总 RNA 含量和纯度。采用 RT-PCR 试剂盒进行逆转录。20 μ L PCR 体系, β -actin 作为内参。由上海生工生物工程公司合成引物,其中 TLR-9 正义链 5-CAGCAGCTCTGCAGTACGTC-3,反义链 5-AAGGCCAGGTAATTGTCACG-3 (扩增片段 224bp); β -actin 正义链:5-CCAACCGCGAGAAGATGACC-3;反义链:5-GATCTTCATGAGGTAGTCAGT-3,扩增片段 236bp。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、95 $^{\circ}$ C 变性 5 min、58 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 为 1 个循环,共计 30 个循环。PCR 产物在琼脂糖凝胶上 95V 恒压电泳 35 min 后观察结果。采用 bandscan 4.3 对每个目的条带进行总光密度值分析,TLR-9 mRNA 相对表达水平为目的产物条带 OD 值与 β -actin 产物条带的 OD 值的比值。COPD 急性加重期患者经过治疗且病情缓解后再次测定 TLR-9 mRNA 相对表达水平(患者咳嗽、咳痰及气短症状稳定或轻微视为稳定期^[5])。

IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平测定 于清晨空腹采集 COPD 急性加重期患者和健康对照组患者外周静脉血 5 mL 于抗凝管中,在常温下离心收集上层血清

置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。采用 ELISA 法检测所有研究对象血 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平。COPD 急性加重期患者经过治疗且病情缓解后再次测定血 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平。

统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料符合正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验,对 COPD 患者治疗前、后采用配对样本 t 检验,运用 Spearman 相关分析 TLR-9 mRNA 表达水平与 IL-1、IL-6、TNF- α 、第一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second,FEV₁)、用力肺活量(forced vital capacity,FVC)、FEV₁/FVC 和最大呼气流量(peak expiratory flow,PEF)水平的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

COPD 急性加重期、COPD 缓解期患者及健康对照者 TLR-9 mRNA 表达及炎症因子水平 COPD 急性加重期患者的 TLR-9 mRNA 表达及炎症因子水平显著高于 COPD 缓解期患者及健康对照者(均 $P < 0.05$);COPD 缓解期患者 TLR-9 mRNA 表达及炎症因子水平显著高于健康对照者(均 $P < 0.05$),见表 2。

吸烟组和非吸烟组 COPD 患者的 TLR-9 mRNA 表达及炎症因子水平情况 COPD 急性加重期患者和缓解期患者中,吸烟组患者 TLR-9 mRNA 表达及炎症因子水平显著高于非吸烟组患者(均 $P < 0.05$),见表 3。

相关性分析 COPD 急性加重期患者 TLR-9 mRNA 表达水平同 IL-1、IL-6 及 TNF- α 水平均呈正

表 2 COPD 组和健康对照组的实验室相关指标分析

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	IL-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TLR-9 mRNA
对照组	45	85.43 $\pm$ 24.89	94.26 $\pm$ 23.67	41.86 $\pm$ 12.95	0.07 $\pm$ 0.01
COPD 组					
缓解期	55	192.87 $\pm$ 34.51 *	203.45 $\pm$ 48.92 *	72.52 $\pm$ 18.54 *	1.23 $\pm$ 0.07 *
急性加重期	55	270.43 $\pm$ 54.21 **	325.82 $\pm$ 77.03 **	156.02 $\pm$ 16.23 **	2.45 $\pm$ 0.03 **

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$;与 COPD 组缓解期比较,** $P < 0.05$

表 3 吸烟组和非吸烟组 COPD 患者的实验室相关指标分析

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	IL-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TLR-9 mRNA
COPD 急性加重期					
吸烟组	38	321.67 $\pm$ 32.84 *	357.93 $\pm$ 23.45 *	195.34 $\pm$ 32.95 *	3.17 $\pm$ 0.21 *
非吸烟组	17	150.78 $\pm$ 54.23	295.81 $\pm$ 12.90	123.78 $\pm$ 21.64	2.04 $\pm$ 0.16
COPD 缓解期					
吸烟组	38	221.74 $\pm$ 22.78 #	254.72 $\pm$ 31.87 #	102.67 $\pm$ 34.21 #	1.75 $\pm$ 0.28 #
非吸烟组	17	123.65 $\pm$ 41.32	198.06 $\pm$ 43.55	54.85 $\pm$ 30.64	0.92 $\pm$ 0.17

注:与 COPD 急性加重期非吸烟组比较,* $P < 0.05$;与 COPD 缓解期非吸烟组比较,# $P < 0.05$

相关性,相关系数分别为($r=0.365,0.632,0.531$,均 $P<0.05$);与 FEV_1 、FVC、 FEV_1/FVC 和PEF水平呈负相关性,相关系数分别为($r=-0.271,-0.771,-0.621$,均 $P<0.05$)。COPD缓解期患者TLR-9 mRNA表达水平同IL-1、IL-6及TNF- α 水平均呈正相关性,相关系数分别为($r=0.021,0.043,0.056$,均 $P<0.05$);与 FEV_1 、FVC、 FEV_1/FVC 和PEF水平呈负相关性,相关系数分别为($r=-0.983,-0.542,-0.218$,均 $P<0.05$)。

讨 论

Toll样受体(Toll like receptor,TLR)属于机体固有免疫中一种重要的模式识别受体^[7],可直接损伤气道上皮细胞和肺组织,还可募集中性粒细胞、单核细胞及趋化因子等,从而在气道上皮细胞及肺组织造成持久的慢性炎症状态。研究发现^[8~10],COPD患者气道及肺内IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子的合成与释放均依赖于TLR。文献报道^[11],COPD患者外周血单个核细胞TLR-2mRNA和TLR-4mRNA的表达水平相对于健康对照组显著增高,TLR-9属于病毒的模式识别受体,COPD患者对病毒的高度易感性是否与TLR-9 mRNA的表达上调相关尚不清楚。本研究发现,COPD急性加重期患者TLR-9 mRNA表达水平显著高于缓解期患者及健康对照组;且TLR-9 mRNA表达水平与炎症因子水平均具有正相关性。提示COPD患者对病毒的高度敏感性可能与TLR-9 mRNA的表达上调并释放大量炎症因子有关。本研究发现COPD患者TLR-9 mRNA表达水平与 FEV_1 、FVC、 FEV_1/FVC 和PEF均呈负相关性,即患者肺功能受损越严重,TLR-9 mRNA表达水平越高。COPD患者肺功能越差,机体相对处于缺氧状态,机体缺氧增加了Toll样受体的表达,可能因为缺氧可激活肺泡上皮细胞TLR的表达。邹静静等^[12]通过对坏死性小肠结肠炎小鼠模型的肠道组织TLR9mRNA表达水平研究发现,实验组小鼠肠道组织TLR-9 mRNA的表达量是对照组小鼠的4倍。徐盛权^[13]通过在1% O₂和5% CO₂的缺氧环境下刺激人成纤维细胞24 h后发现,人成纤维细胞TLR4 mRNA和TLR7 mRNA的表达水平显著升高。

雒志明等^[14]发现吸烟是COPD的独立危险因素。研究认为烟雾中的病原微生物与TLR的模式识别受体识别后,合成和释放炎症因子并引起中性粒细胞、巨噬细胞聚集于呼吸道,导致气道和肺内的异常炎症反应和蛋白酶降解、氧化应激,最终导致气

道和肺损伤^[15,16]。本研究发现吸烟组COPD患者TLR-9 mRNA表达水平和炎症因子水平均显著高于非吸烟组患者。提示对于COPD患者应提早戒烟从而降低TLR-9 mRNA的表达水平及机体炎症水平。

综上所述,COPD患者外周血单个核细胞TLR-9 mRNA表达水平显著升高,尤其是具有吸烟史的COPD患者,且表达水平与机体炎症因子成正相关性,与肺功能呈负相关性。在未来是否可以通过研发TLR-9抑制剂为治疗COPD提供新思路。

参 考 文 献

- 1 杜毓锋,钱力,刘学军.慢性阻塞性肺疾病2017指南更新要点解读[J].中华老年病研究电子杂志,2017,4(3):18-21.
- 2 王梦莹,刘冬静,黄辉,等.慢性阻塞性肺疾病遗传易感性研究进展[J].中华流行病学杂志,2016,37(12):1678-1682.
- 3 赵振钧,邓炯.慢性阻塞性肺疾病发生相关因素的研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2016,36(1):128-132.
- 4 张超凡,杜春华,李娜,等.IL-21与COPD发病机制的研究进展[J].国际呼吸杂志,2017,37(19):1503-1506.
- 5 吴雷.慢性阻塞性肺疾病患者血清25-羟维生素D3水平的变化及其临床意义[J].内科急危重症杂志,2018,24(2):49-51.
- 6 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2013,36(4):484-491.
- 7 王海坤,韩代书.Toll样受体(TLRs)的信号转导与免疫调节[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(9):820-827.
- 8 Ramesh A,Varghese SS.Toll like receptors in COPD and periodontal disease-a mini review[J].Immunol Endocr Metab Agents Med Chem,2017,17(1):32-36.
- 9 Zhang Y,Ni H J,Zhou HS.Study on the expression of Toll-like receptor 4 and matrix metalloproteinase-9 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and their clinical significance[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2017,21(9):2185-2191.
- 10 Pomeranek A,Lea SR,Herrick S,et al.Characterization of TLR-induced inflammatory responses in COPD and control lung tissue explants[J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2016,11(1):2409-2417.
- 11 龚燕,施小梅,顾洁,等.慢性阻塞性肺病外周血单个核细胞表面TLR2、TLR4的表达与血清TNF- α 、IL-6、IL-8相关性的研究[J].中国临床医学,2012,19(2):108-111.
- 12 邹静静,陈运彬.双歧杆菌对新生鼠坏死性小肠结肠炎肠道黏膜Toll样受体表达的影响[J].中国妇幼保健,2012,27(16):2505-2509.
- 13 徐盛权.人皮肤成纤维细胞在缺氧应激下TGF- β 通路及Toll样受体相关蛋白表达变化[D].浙江大学,2016.
- 14 雒志明,马丽娜,聂秀红,等.吸烟对COPD患者肺功能的影响[J].临床肺科杂志,2011,16(8):1250-1251.
- 15 Metcalfe HJ,Lea S,Hughes D,et al.Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages[J].Clin Exp Immunol,2014,176(3):461-472.
- 16 Von SI,Larsson K,DahlénB,et al.Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD[J].Respir Med,2011,105(8):1222-1230.

(2018-01-29 收稿 2019-05-09 修回)