

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.05.015

急性胰腺炎患者外周血单核细胞 TLR9 mRNA 的表达及意义*

曾玉剑^{1,2}, 刘 霜³, 孙 亮^{1,2}, 舒 若^{1,2}, 施承民^{1,2},郭姝婧^{1,2}, 费昱达^{1,2}, 王昆华^{1,2}, 罗华友^{1,2,△}

(昆明医科大学第一附属医院:1. 胃肠与疝外科;2. 云南省消化病研究所;3. 干疝科,昆明 650032)

摘要:目的 观察急性胰腺炎(AP)患者外周血单核细胞(PBMCs)Toll 样受体 9(TLR9)mRNA 的表达情况。方法 收集 52 例发病 24 h 内的 AP 患者,采集第 1、3、5 天外周乙二胺四乙酸二钾(EDTA_{K2})抗凝静脉血,提取血浆低温冻存,用于成批检测胰弹性蛋白酶、促炎细胞因子、抗炎细胞因子等。同法采集其治愈后 2~3 个月的外周 EDTA_{K2} 抗凝静脉血行上述检测,作为相应指标的基准水平值。分离外周血单核细胞用于随后成批作逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TLR9 mRNA 的表达变化规律。同法采集其治愈后 3 个月的外周 EDTA_{K2} 抗凝静脉血行上述检测,作为相应指标的基准水平值。最终将成功采得治愈后 3 个月血液标本的前 36 例患者纳入最终研究。结果 AP 患者的外周血 PBMCs TLR9 mRNA 相对含量高于其痊愈后 3 个月的基线水平($P < 0.05$)。AP 患者的外周血 PBMCs TLR9 mRNA 相对含量表达改变与胰弹性蛋白酶、促炎细胞因子水平呈正相关,与抗炎细胞因子无相关性。结论 AP 患者的外周血 PBMCs TLR9 mRNA 表达显著升高并与促炎细胞因子表达同步上调,提示 AP 的发生、发展可能通过 TLR9 介导。

关键词:Toll 样受体 9;急性胰腺炎;外周血单核细胞**中图分类号:**R657.5**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2015)05-0623-03**Expression of TLR9 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis***Zeng Yujian^{1,2}, Liu Shuang³, Sun Liang^{1,2}, Shu Ruo^{1,2}, Shi Chengmin^{1,2},Guo Shujing^{1,2}, Fei Yida^{1,2}, Wang Kunhua^{1,2}, Luo Huayou^{1,2,△}

(1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Yunnan Research Institute of Digestive Diseases; 3. Department of Cadre Health, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of TLR9 mRNA of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with acute pancreatitis. **Methods** Fifty two AP patients with the disease duration in 24 h were collected, peripheral EDTA_{K2} coagulation vein blood were collected on the first, third and fifth day, then plasma were cryop reserved to detect pancreatic elastase, proinflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines. Then the peripheral EDTA_{K2} coagulation vein blood two to three months after treatment were collected in the same method to undertake these tests, and act as the reference level value. Peripheral blood was collected from 36 acute pancreatitis patients. Three months later, peripheral blood was collected again from these 36 people as controls. PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. RT-PCR was adopted to determine the relative content of the expression of TLR9 mRNA of the PBMCs. **Results** The relative content of expression of TLR9 mRNA were significantly up-regulated in the patients with acute pancreatitis, compared with that of controls ($P < 0.05$). The up-regulated expression of TLR9 mRNA was related to expression of TNF- α and IL-1. **Conclusion** The up-regulated expression of TLR9 mRNA in acute pancreatitis patients indicates that infective factors might be mediated by TLR9.

Key words:Toll-like receptor 9; acute pancreatitis; peripheral blood mononuclear cells

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)的治疗是一个医学难题。无论基础研究还是临床实践都尚未能取得根本性的突破:(1)ANP 发病机理的研究尚无重大突破性发现,现有发病理论不足以解释急性胰腺炎(AP)的发生、发展;(2)ANP 的发病率及病死率逐年上升,现美国每年 AP 患者约 185 000 例;其中 25% 发展成为 ANP, 后者的病死率高达 50%。中国虽缺乏详尽的统计资料,但局部地区大宗病案报道也提示 ANP 的病死率呈上升趋势。AP 发病始动环节不清、对 ANP 发生、发展的分子基础及发病机制认识不足,是 AP 治疗效果难如人意及 ANP 病死率居高不下的根本原因。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是备受关注的一种哺乳动物细胞表面信号传导跨膜蛋白,在天然免疫识别病原体及介导炎症反应信号通路中有重要作用。TLR9 是 TLRs 家族成员中的重要一员,通过识别外源性的非甲基化 CpG 基序从而启

动机体炎症反应链。为探寻 TLR9 是否参与了人的 AP,本研究检测了 AP 患者外周血单核细胞(PBMCs)的 TLR9 表达情况,以及其与常见炎症相关细胞因子的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 3 月至 2010 年 8 月本院急诊科观察室收治的 52 例发病 24 h 内的 AP 患者;诊断标准:采用人民卫生出版社第 7 版外科学教材。采集 52 例患者第 1、3、5 天外周乙二胺四乙酸二钾(EDTA_{K2})抗凝静脉血,提取血浆低温冻存,用于成批检测胰弹性蛋白酶、促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1)、抗炎细胞因子(IL-4)等。同法采集其治愈后 3 个月的外周 EDTA_{K2} 抗凝静脉血行上述检测,作为相应指标的基准水平值。分离 PBMCs 用于随后成批作逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TLR9 mRNA 的表达变化规律。同法采集其治愈后 3 个月的外周 EDTA_{K2} 抗凝静脉血行上述检测,作为相应

* 基金项目:云南省教育厅基金(2010Y170)。 作者简介:曾玉剑(1975—),讲师,博士,主要从事胃肠肿瘤、疝和腹壁外科疾病、急性胰腺炎的临床及研究工作。△ 通讯作者,E-mail:huayoul@aliyun.com。

指标的基准水平值。最终将成功采得治愈后 3 个月血液标本的 36 例患者纳入研究,其余 16 例排除。全部患者皆诊断明确,同时确认其 3 个月内未曾接受糖皮质激素、免疫抑制剂或具有免疫调节作用的药物治疗。患者年龄 31~54 岁,平均(47.1±1.9)岁。

1.2 试剂 人淋巴细胞分离液、Ficoll Taq DNA 聚合酶(北京鼎国生物技术有限公司),DEPC(Sigma 公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),Rever Tra Ace 逆转录酶(TOYOBO 生物科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 TLR9 mRNA 的 RT-PCR 检测 (1)PBMCs 的分离,抽取研究对象空腹静脉血 15 mL, Ficoll 法分离 PBMCs。(2)PBMCs 总 RNA 用 Trizol 按说明提取,用 Trizol-三氯甲烷-异丙醇-乙醇法提取 PBMCs 总 RNA。(3)逆转录引物,由 TAKARA(中国大连)设计并合成:TLR9F,5'-TCC CTG CAT AGA GGT ACT TC-3'; TLR9R,5'-TCC AGC CAC TGA AGT TGT GA-3'; TaqMan 探针:5'-FAM-CTA GAA GTC CCC CAA CTT CGA GTC-FAMRA-3'。取 5 μg PBMCs 总 RNA 逆转录为 cDNA,再取 5 μL cDNA 进行扩增,扩增出的产物行 1.5% 琼脂糖电泳。用 GAPDH 作为内对照,其引物为:GAPDHF,5'-TGG GTG TGA ACC ACG AGA-A-3'; GAPDHR,5'-GGC ATG GAC TGT GGT-CAT GA-3'; TaqMan 探针:5'-FAM-CTG CAC CAC CA ACT GCT TAG CTA MRA-3'。(4)逆转录反应合成 cDNA,取 RNA 1 μg 加入 oligo T 1 μL,5×Buffer 4 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,RNA 酶抑制剂 1 μL,DEPC 水加至 20 μL。反应条件:42 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。(5)PCR 检测 TLR9、TLR7 mRNA 表达相对含量,TLR9、GAPDH 的引物序列设计应用在线引物设计软件 Primer 3.0,由上海博亚生有限公司合成。扩增体系及反应条件:取 2 μL cDNA,5 μL 10×PCR Buffer,2 μL dNTPs,上游、下游引物各 2 μL,1 μL Taq 酶,加灭菌双蒸水至总体积 50 μL;94 ℃ 5 min 预变性,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,采用凝胶成像分析系统中进行图像分析。以 GAPDH 为内参照半定量,各样本表达强度 = 样本灰度值/GAPDH 灰度值。

1.3.2 血清淀粉酶和脂肪酶的测定 抽取研究对象 EDTAK₂ 抗凝静脉血 5 mL。淀粉酶和脂肪酶的测定在昆明医科大学第一附属医院生化中心的自动生化仪(Olympus AU5400,日本)上进行。

1.3.3 细胞因子检测 抽取研究对象 EDTAK₂ 抗凝静脉血 5 mL,在常温下离心后收集上层血清保存于-80 ℃ 冰箱,用于细胞因子的检测。TNF-α、IL-1 和 IL-4 用 ELISA 试剂盒(R&D,Minneapolis,MN)来进行测定。最后用全自动定量绘图酶标仪(Bio-Rad,M550,Hercules,CA)来判断结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非配对 Student *t* 检验和方差分析(ANOVA)。RT-PCR 的结果则表达为平均值(ΔCt),并采用 Mann-Whitney *U* 进行检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清淀粉酶和脂肪酶 血清淀粉酶和脂肪酶结果随 AP 的发展而呈现较为一致的变化;两酶在第 1 天组就都已经明显升高。淀粉酶($P < 0.05$)与脂肪酶都在第 1 天($P < 0.05$)达到峰值。但随后,淀粉酶呈逐级回落,而脂肪酶则在第 3 天快速

回落,第 5 天时脂肪酶甚至降至近基线水平($P > 0.05$),见表 1。

表 1 血清淀粉酶和脂肪酶检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	淀粉酶(IU/L)		脂肪酶(IU/L)	
		数值	<i>P</i>	数值	<i>P</i>
对照组	36	73.15±16.17	—	131.12±16.05	—
第 1 天	36	457.63±37.43	<0.05*	371.95±19.50	<0.05*
第 3 天	36	218.19±36.62	<0.05*	125.39±18.74	>0.05
第 5 天	36	117.45±18.93	>0.05	131.54±12.90	>0.05

*: $P < 0.01$,与对照组比较;—:此项无数据。

2.2 血清细胞因子检测结果 每个组的血清 TNF-α、IL-1 和 IL-4 用 ELISA 进行检测(表 2)。3 种细胞因子表现为在不同时段的上调;TNF-α 表现为缓慢的上调并在第 5 天组出现峰值;IL-1 表现为快速上调,其后缓慢上升,峰值出现于第 5 天组;IL-4 峰值出现于较早的第 1 天组,其后逐渐下降。

表 2 血清细胞因子检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF-α(pg/mL)	IL-1(pg/mL)	IL-4(pg/mL)
对照组	36	31.24±0.71	691.43±39.05	26.93±2.57
第 1 天	36	35.44±0.68	1151.26±34.18*	41.53±2.25*
第 3 天	36	40.15±2.05*	1135.47±39.55*	38.14±1.86
第 5 天	36	44.51±1.78*	1473.62±65.58#	30.26±1.36

*: $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.01$,与对照组比较。

2.3 RT-PCR 结果 自 RNA 逆转录而来的 cDNA 经凝胶电泳证实为目的片段大小(113 bp)。用 Taqman 探针对 TLR9 mRNA 表达进行定量分析;其结果揭示,在 AP 的前 1 周内,TLR9 在 PBMCs 中呈现出明显的表达上调。TLR9 mRNA 在第 1 天明显上调至对照组的 7.89(2^{2.98})倍($P < 0.05$)。随后,第 3、5 天组呈现缓慢上调表现($P < 0.05$),于第 5 天组达峰值,分别为对照组的 8.94(2^{3.16})倍,9.51(2^{3.25})倍。

3 讨论

AP 是一种常见而严重的疾病,但其发病机制仍未能完全阐明;其中,重症胰腺炎病死率仍较高。作为一类新的跨膜蛋白,TLR 家族的发现给 AP 发病机理探索提供了新的途径。TLR9 在其家族中较晚被发现,通常被认为主要表达于 B 细胞、树突细胞等免疫细胞^[1-4]。但是,最近有报道一些 TLR 家族成员也可以表达于某些上皮细胞^[5]。此外,在一些肿瘤细胞上也有 TLR9 高表达的报道^[6-11]。这些发现说明 TLR9 确实可以在一些免疫细胞甚至非免疫细胞上表达,并进一步提示在这些细胞上 TLR9 的作用可能并不是识别 CpG 基序。

本研究小组曾经对大鼠胰腺组织是否有 TLR9 表达进行过检测^[1]。免疫组织化学提示 TLR9 主要表达在胰管,特别在胰管上皮。作者前期的实验也发现,TLR4 在胰管上皮也有表达;这是否提示 TLR9 和 TLR4 存在着一致或协同的作用。胰管黏膜屏障(PDMB)^[12]是一种被广泛认同的胰管自身的保护机制;通常认为它的保护作用既包括机械性隔离因素,也包括化学性机制。作为先天性免疫系统的一种重要受体,TLR9 在胰管的表达揭示了一种可能,TLR9 激活和其后细胞因子释放也许参与了 PDMB 的抗炎作用调节。据此,TLR9 也可能为一个潜在的免疫调节点。免疫组织化学也揭示 TLR9 着色于胰腺的血管内皮系统。微循环损害是 AP 的早期病理改变之一;作者前期的实验也提示 TLR4 可能参与这一损害^[13]。TLR9

的免疫组织化学检测结合其实时 RT-PCR 结果揭示,TLR9 可能涉及胰腺炎早期的血管微循环损害。

上述实验证实,大鼠胰腺是存在 TLR9 表达的。作者随后的研究亦证实,TLR9 与大鼠实验性胰腺炎的发生、发展存在相关性。所以,本实验的目的在于希望将在动物实验的结论在人体中得到某种程度的验证。但由于伦理学的原因和客观上很难以直接获取胰腺炎时的人体胰腺组织,所以只能从较容易获取的其他组织的检测来间接证实或推测 TLR9 在人类 AP 时的作用和参与度。而 TLR9 在人体 PBMCs 的表达已经得到证实,鉴于此,本研究决定提取并检测 AP 患者外周血的单核细胞。

作者用外周静脉血行淀粉酶、脂肪酶检查作为判断 AP 的指标,这些指标提示典型 AP 改变。

3.1 早期 AP 患者 PBMCs TLR9 表达变化规律 为了探究 TLR9 与胰腺炎的关联性,实时 RT-PCR 被用于对 TLR9 mRNA 表达进行定量分析。实时 RT-PCR 结果证实 TLR9 mRNA 在人体外周血单核细胞为低水平表达,但在 AP 早期,TLR9 mRNA 表达即已经上调明显。TLR9 mRNA 上调迅速,在第 1 天时已经上升 7.89(2^{2.98})倍($P < 0.05$),其后逐渐上调并在第 5 天时达到峰值,约为对照组的 9.51(2^{3.25})倍($P < 0.05$)。这充分说明 TLR9 对于人类 AP 反应迅速,TLR9 参与了 AP 的发展。随后 1 周时间内,TLR9 表达并未出现明显得下调,而是维持在一个高水平上的缓慢上调。Lindau 等^[14]提出,CpG 基序并不能特异性地诱导 TLR9 表达上调。结合本实验结果,可以间接地推测,人类 AP 能够诱导 TLR9 快速而强烈的表达上调。

3.2 早期 AP 患者外周血促炎细胞因子及抑炎细胞因子与 TLR9 的关系 TLR9 的上调和血清中一些细胞因子的增加是密切相关的。以往的研究已经证实 TLR9 的激活可以诱导促炎症细胞因子,如 IL-1、IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- α 等的大量释放^[15]。作者对其中的两种,IL-1 和 TNF- α 进行了检测;它们在 TLR9 上调后的某一特定时段都表现为上调。这一结果间接支持作者关于 TLR9 参与了 AP 的推测。而且炎症时 TLR9 通路的具体作用靶点或最终的调节产物尚无定论,有理由相信上述促炎细胞因子是其可能的下游产物。同时,为进一步明确 TLR9 为促炎症性因素,作者还对抑制炎症的细胞因子 IL-4 进行了检测。结果表明,TLR9 mRNA 表达在 AP 早期呈逐渐上调的表现的同时,作为具有抑制炎症作用的细胞因子 IL-4 的表达水平却在短暂上调之后维持于接近基线的水平,这说明 TLR9 在人类 AP 的发生、发展中可能确实是一种单纯的促炎性细胞介质。

3.3 AP 病情轻重及预后与 TLR9 的相关性 通过分析本组 AP 患者的淀粉酶及脂肪酶走向与 TLR9 mRNA 表达水平,可以看出:在血清淀粉酶及脂肪酶浓度逐渐减低的时候 TLR9 mRNA 的表达水平是在继续上调的。结合前述的判断,TLR9 在人类 AP 的发生、发展中是一种促炎性细胞介质,本研究可以推测,TLR9 的表达水平与人类 AP 的病情严重程度和预后之间可能并没有一种必然的联系。

参考文献:

[1] Zeng YJ, Song JM, Li Y, et al. Toll-like receptor 9 is expressed in rat pancreas and is involved in cerulein-induced pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2008, 36: 212-214.

- [2] Wei T, Gong J, Rssle SC, et al. A leucine-rich repeat assembly approach for homology modeling of the human TLR5-10 and mouse TLR11-13 ectodomains[J]. *J Mol Model*, 2011, 17(1): 27-36.
- [3] Akira S. Mammalian Toll-like receptors[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15: 5-11.
- [4] Zhang W, Xu L, Qin J, et al. New Water-soluble cationic poly (p-phenylenevinylene) derivative; the interaction with DNA and selective fluorescence enhancement induced by ssDNA[J]. *Macromol Rapid Commun*, 2013, 34(5): 442-446.
- [5] Liua J, Xua C, Liu YL, et al. Activation of rabbit TLR9 by different CpG-ODN optimized for mouse and human TLR9[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35: 443-451.
- [6] Pan X, Yue J, Ding G, et al. Leucine-rich repeat 11 of TLR9 can tightly bind to CpG ODN and the positively charged residues are critical for the high affinity[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36): 30596-30609.
- [7] Kauppila JH, Korvala J, Siiril K, et al. Toll-like receptor 9 mediates invasion and predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the mobile tongue[J]. *J Oral Pathol Med*, 2014, 23(2): 104-107.
- [8] Kauppila JH, Karttunen TJ, Saarnio J, et al. Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1659-1663.
- [9] van Geenen EJ, van der Peet DL, Bhagirath P, et al. Etiology and diagnosis of acute biliary pancreatitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(9): 495-502.
- [10] Nijmeijer RM, Schaap FG, Smits AJ, et al. Impact of global fxr deficiency on experimental acute pancreatitis and genetic variation in the FXR locus in human acute pancreatitis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114393.
- [11] Deng YY, Wang R, Wu H, et al. Etiology, clinical features and management of acute recurrent pancreatitis[J]. *J Dig Dis*, 2014, 15(10): 570-577.
- [12] Merrell A, Ilvesaro JM, Lehtonen N, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(7): 437-447.
- [13] Xue J, Habtezion A. Carbon monoxide-based therapy ameliorates acute pancreatitis via TLR4 inhibition[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 437-447.
- [14] Lindau D. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells[J]. *Immunology*, 2013, 138(2): 105-115.
- [15] Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, et al. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40611-40617.