

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.18.023

UC 患者 PBMC 中 TLR4、NF- κ B 水平的变化及其临床意义马永刚¹,高芙蓉²,卞巍³

(1. 武警浙江省总队医院嘉兴医院消化内科,浙江嘉兴 314000;2. 武警浙江省总队医院嘉兴医院放射科,浙江嘉兴 314000;3. 浙江省嘉兴市妇幼保健院放射科 314000)

[摘要] **目的** 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者外周血单核细胞(PBMC)中 TOLL 样受体(TLR)4、NF- κ B 水平的变化及在 UC 发病中的可能机制。**方法** 选取武警浙江省总队医院嘉兴医院消化科 2014 年 1 月至 2015 年 1 月收治的 UC 患者 30 例作为观察组,另选取该院体检科健康体检者 10 例作为对照组。采用流式细胞仪检测外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达率,RT-PCR 检测 TLR4、髓样分化因子 88(MyD88)、NF- κ B(P65) mRNA 表达水平,Western blot 检测 TLR4、MyD88、NF- κ B(P65) 蛋白水平。**结果** 观察组外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达率明显高于对照组($P < 0.05$);对照组 TLR4、MyD88、NF- κ B(P65) mRNA 及蛋白水平明显低于观察组($P < 0.01$);TLR4、MyD88、NF- κ B(P65) 蛋白水平与 UC 严重程度呈正相关。**结论** UC 患者 PBMC 中 TLR4、NF- κ B 明显增高,临床可通过检测 TLR4、NF- κ B 水平判断 UC 的发展程度。

[关键词] 结肠炎,溃疡性;单核细胞;TOLL 样受体 4;NF- κ B**[中图分类号]** R574.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)18-2515-03

Changes and clinical significance of TLR4 and nuclear factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells of patients with ulcerative colitis

Ma Yonggang¹, Gao Furong², Bian Wei³

(1. Department of Internal Medicine; 2. Department of Radiology, Jiaxing Hospital of Zhengjiang Provincial Armed Police Corps Hospital, Jiaxing, Zhejiang 314000, China; 3. Department of Radiology, Jiaxing Maternal and Child Health Care Hospital, Jiaxing, Zhejiang 314000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of TLR4 and nuclear factor kappa B(NF- κ B) levels in peripheral blood mononuclear cells(PBMC) of the patients with ulcerative colitis(UC) and its possible pathogenesis mechanism. **Methods** In our hospital from January 2014 to January 2015, 30 cases of UC were selected as the observation group, and other 10 individuals undergoing healthy physical examination in this hospital were selected as the control group. Flow cytometry was used to detect the positive expression rate of TLR4 on surface of peripheral blood CD14⁺ mononuclear cells. The levels of TLR4, MyD88, NF- κ B(P65) mRNA expression were detected by RT-PCR. Western blot was adopted to detect the levels of TLR4, MyD88, NF- κ B(P65) protein. **Results** The positive expression rate of TLR4 on the surface of peripheral blood CD14⁺ mononuclear cells in the observation group was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$); the levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B(P65) B mRNA and protein in the control group were significantly lower than those in the observation group($P < 0.05$); the levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B(P65) protein were positively correlated with the severity of UC. **Conclusion** The levels of TLR4 and NF- κ B in PBMC of the patients with UC are significantly increased, clinic can judge the UC development degree by detecting TLR4 and NF- κ B levels.

[Key words] colitis, ulcerative; monocytes; toll-like receptor 4; NF-kappa B

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种,临床主要表现为反复的腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重等,严重者可导致失血性休克^[1]。UC 的发病机制与遗传、感染、免疫异常、心理及环境等因素有关。目前的研究认为人体免疫功能的紊乱可能是 UC 病情发生、发展的主要影响因素,而 TOLL 样受体(toll-like receptors, TLRs)可能与 UC 密切相关^[2-3]。TLRs 可启动由髓样分子因子 88(MyD88)介导的 NF- κ B 下游炎症反应信号通路^[4-6]。本研究比较健康者和 UC 患者 TLR4、NF- κ B 表达水平的差异,探讨 TLR4、NF- κ B 在 UC 发病中的可能机制。

1 资料与方法**1.1 一般资料** 选择武警浙江省总队医院嘉兴医院消化内科

2014 年 1 月至 2015 年 1 月收治的 UC 患者 30 例作为观察组,其中男 16 例,女 14 例,年龄 29~63 岁,平均(40.82±8.32)岁,病程 3 个月至 12 年,平均(4.35±0.83)年。30 例 UC 患者依据病情严重程度分为轻度组($n=8$)、中度组($n=12$)、重度组($n=10$)。另选取该院体检科正常体检者 10 例作为对照组,其中男 5 例,女 5 例,年龄 30~64 岁,平均(35.02±11.22)岁,两组对象性别、年龄比较,差异无统计学差异($P > 0.05$)。所有对象均签署了知情同意书,对试验内容了解。本研究获得该院伦理委员会批准。30 例 UC 患者均符合 2007 年 5 月济南全国 IBD 研讨会修订的《对我国 IBD 诊断治疗规范的共识意见》中的诊断标准。患者排除具有其他自身免疫性疾病,排除结核、肝炎、肿瘤等疾病,排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫

表 1 引物序列(5'-3')

项目	正向	反向	片段长度(bp)
TLR4	ACT TGG ACC TTT CCA GCA AC	TTT AAA TGC ACC TGG TTG GA	451
MyD88	GCA TGG AAC CAG TGG CTG TGA G	GAG GAA GTG GAA TGG GCG GTG T	867
NF-κB(P65)	TCA AGA TCT GCC GAG TGA AC	CCT CTT TCT GCA CCT TGT CA	555

病、肠结核等感染性结肠炎。UC 的分级标准参考《对我国 IBD 诊断治疗规范的共识意见》，轻度：腹泻低于 4 次/天，便血轻或无，无发热、脉搏加快或贫血，红细胞沉降率(ESR)正常。中度：腹泻次数 4~6 次/天，便血轻中度。重度：腹泻每天 6 次以上，伴明显黏液血便，体温高于 37.5℃，脉搏每分钟 90 次以上，血红蛋白(Hb) < 100 g/L，ESR > 30 mm/h^[7]。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器和试剂 T Gradient 型 PCR 仪(Biometra 公司);GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司);冷冻高速离心机(德国 Eppendor 公司);琼脂糖水平电泳槽(北京六一仪器厂);超低温冰箱(日本三洋公司);PCR 扩增试剂盒(Fermentas 公司);PCR 引物(上海生物工程有限公司);Trizol(In-vitrogen 公司);流式细胞仪(美国 Becton dickinson 公司);CD14-FITC(Miltenyi 公司)。

1.2.2 标本采集及检测方法 两组对象均于清晨空腹采集静脉血液，肝素抗凝，3 000 r/min 分离获得血浆，-80℃保存待测。利用密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMC)，调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL，接种于 24 孔板，细胞培养 4 h 后，洗脱未贴壁的细胞，获得贴壁的 PBMC。置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收获细胞。采用双色荧光法进行 CD14⁺ 单核细胞上 TLR4 阳性率的检测，用 Cell Quest 软件进行获取和分析数据^[8]。100 μL 细胞悬液(5×10^5 个/mL)，加入 CD14-FITC，CD284-APC 抗体各 10 μL，4℃避光孵育 30 min，PBS 清洗 2 次，加入 300 μL PBS 上机检测。RT-PCR 检测：提取单核细胞 RNA，依次加入 RNA、Oligo(dT18)、双蒸水，总体积为 12.50 μL，65℃5 min，冰浴 5 min，加入 RNase 抑制剂、Buffer、d NTPs、M-Mu LV，42℃1 h，70℃10 min，冰浴 5 min，RT-PCR 以 GAPDH 为作为内参基因，实时荧光试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的数据统计方法分析基因的相对表达。引物序列见表 1^[9]。Western blot 检测：胰酶消化离心获得细胞，加入冰预冷裂解缓冲液，高速冷冻离心机离心获得蛋白，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，湿法转膜，封闭处理，加入抗体孵育，加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗，室温下孵育 2 h，将显影液置于 NC 膜上，凝胶成像仪成像。

1.3 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，组间比较采用 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达比较 对照组外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达率为(0.09±0.02)%，观察组外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达率为(1.80±0.06)%，观察组外周血 CD14⁺ 单核细胞表面 TLR4 阳性表达率明显高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 两组对象 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) mRNA

NA 表达水平比较 对照组 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) mRNA 水平明显低于观察组($P < 0.01$)，见表 2。

表 2 两组对象 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TLR4	MyD88	NF-κB(P65)
对照组	10	0.94±0.12	1.01±0.08	1.02±0.07
观察组	30	1.98±0.08 ^a	3.64±0.18 ^a	3.57±0.21 ^a

^a: $P < 0.01$ ，与对照组比较。

2.3 两组对象 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白水平比较 对照组 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白水平明显低于观察组($P < 0.01$)，见表 3。

表 3 两组对象 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TLR4	MyD88	NF-κB(P65)
对照组	10	0.022±0.007	0.020±0.008	0.053±0.006
观察组	30	0.183±0.006 ^a	0.181±0.007 ^a	0.265±0.017 ^a

^a: $P < 0.01$ ，与对照组比较。

2.4 UC 不同组别 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白表达水平比较 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白表达水平与 UC 严重程度呈正相关，UC 重度组 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白表达明显高于 UC 轻、中度组($P < 0.01$)；UC 中度组 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白表达明显高于 UC 轻度组($P < 0.01$)，见表 4。

表 4 UC 不同组别 PBMC 表面 TLR4、MyD88、NF-κB(P65) 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TLR4	MyD88	NF-κB(P65)
UC 轻度组	8	0.086±0.009 ^{ab}	0.125±0.011 ^{ab}	0.156±0.015 ^{ab}
UC 中度组	12	0.199±0.016 ^a	0.205±0.020 ^a	0.285±0.022 ^a
UC 重度组	10	0.256±0.022	0.356±0.035	0.358±0.041

^a: $P < 0.01$ ，与 UC 重度组比较；^b: $P < 0.01$ ，与 UC 中度组比较。

3 讨论

UC 是 IBD 的一种，是病因未明的、以侵犯结肠为主的慢性炎症，该病病程长、易复发、与直肠癌的发病有着重要联系。西方国家，UC 发病率为 7/10 万人^[10]；亚洲，UC 发病率为 1~2/10 万人。UC 的发病机制尚未明确，环境、遗传、感染和免疫因素相结合导致肠道黏膜炎症，然后黏膜病变，黏膜修复。尽管发病机制尚未明确，机体免疫系统对肠道正常菌群的免疫反应异常是其发病的重要因素^[11]。

哺乳动物中已发现的 TLRs 有 13 种，其中，人类至少有 10 种。TLRs 表达在各种免疫细胞上，其中 TLR4 主要表达于单

核-巨噬细胞、树突状细胞表面,TLR4 通过选择性识别 PAMPs[如脂多糖(LPS)、鞭毛蛋白和微生物核酸等],触发 MyD88 依赖性和非依赖性途径,最终活化 NF- κ B,导致肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 等炎性细胞因子及趋化因子的释放,诱导炎症的发生^[12-13]。TLR4 识别的外源性配体主要为脂多糖,内源性配体主要包括坏死细胞、热休克蛋白等。活化的通过信号转导介导肠道黏膜的免疫反应^[14]。

本研究比较了健康者与 UC 患者之间 PBMC 的 TLR4、MyD88 和 NF- κ B(P65)表达差异,UC 患者 TLR4、MyD88 和 NF- κ B(P65)无论在基因水平还是蛋白水平均明显高于对照组,说明 TLR4 和 NF- κ B(P65)与 UC 的发病相关。TLR4 表达异常可能与 LPS 耐受有关,UC 肠道菌群失调,宿主肠黏膜对 LPS 的耐受性降低,外周血 TLR4 大量表达,并与 LPS 结合,激活 TLR5-MyD88-IRAK-NF- κ B(P65)的转导途径,募集炎性细胞,释放自由基,损伤黏膜^[15]。在进一步的分析中,TLR4、MyD88、NF- κ B(P65)蛋白表达水平与 UC 严重程度呈正相关,表明 TLR4、MyD88 和 NF- κ B(P65)表达水平可反映 UC 的活动情况,有助于判断患者的病情发展情况。

综上所述,TLR4、MyD88 和 NF- κ B(P65)参与了 UC 的发生、发展,临床可通过检测 TLR4、MyD88 和 NF- κ B(P65)水平判断 UC 患者的疾病发展情况,并将信号通路作为 UC 的潜在治疗靶点。

参考文献

[1] Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility [J]. *Immunol Res*, 2015, 62(2): 1-19.

[2] Yong Z, Zhen S, Zhang X, et al. TIPE2 play a negative role in TLR4-mediated autoimmune T helper 17 cell responses in patients with myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2015, 10(4): 635-644.

[3] 方文怡,柯晓,周凡,等. 清化肠饮对溃疡性结肠炎小鼠 TLR4/NF- κ B 通路的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2014, 22(8): 417-421.

[4] Guo QS, Xia B, Jiang Y, et al. Polymorphisms of CD14 gene and TLR4 gene are not associated with ulcerative colitis in Chinese patients [J]. *Postgrad Med J*, 2005, 81(958): 526-529.

[5] 吴玉泓,许雅清,李海龙,等. 久泻灵颗粒对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠 TLR4 及 NF- κ B p65 表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(1): 47-52.

[6] 李晨. 芍黄安肠汤对溃疡性结肠炎 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的干预作用 [D]. 南京:南京中医药大学, 2014.

[7] Meena NK, Verma R, Verma N, et al. TLR4 D299G polymorphism modulates cytokine expression in ulcerative colitis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2013, 47(9): 773-780.

[8] 朱灵,周军,曹海军,等. 雷公藤多苷通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制小鼠结肠炎症 [J]. *胃肠病学*, 2015, 20(10): 606-611.

[9] Rahman FZ, Smith AM, Hayee B, et al. Delayed resolution of acute inflammation in ulcerative colitis is associated with elevated cytokine release downstream of TLR4 [J]. *Syst Rev*, 2010, 5(3): 1095-1098.

[10] Tan Y, Zou K F, Qian W, et al. Expression and implication of toll-like receptors TLR2, TLR4 and TLR9 in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2014, 34(5): 785-790.

[11] Pan L, Hong L, Hong Y, et al. IRF5, but not TLR4, DEFE1, or VDR, is associated with the risk of ulcerative colitis in a Han Chinese population [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(10): 1145-1151.

[12] Mohammadi M, Zahedi MJ, Nikpoor AR, et al. Interleukin-17 serum levels and TLR4 polymorphisms in ulcerative colitis [J]. *Iran J Immunol*, 2013, 10(2): 83-92.

[13] 李晨,俞媛,范尧夫,等. 芍黄安肠汤对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(7): 151-155.

[14] Ke X, Zhou F, Gao Y, et al. Qing Hua Chang Yin exerts therapeutic effects against ulcerative colitis; through the inhibition of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 926-930.

[15] 方新华,吴鑫,朱雪梅,等. 芍药内酯苷通过 TLR4 通路对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及 Tollip 表达的调控作用 [J]. *中国药学(英文版)*, 2016(5): 366-372.

(收稿日期:2017-01-01 修回日期:2017-03-16)

(上接第 2514 页)

Doppler flowmetry of ophthalmic arteries for prediction of pre-eclampsia [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2014, 60(6): 538-541.

[12] Guerci P, Vial F, Feugeas J, et al. Cerebral oximetry assessed by near-infrared spectrometry during preeclampsia: an observational study; impact of magnesium sulfate administration [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(11): 2379-2386.

[13] Maged AM, Hashem AM, Gad Allah SH, et al. The effect of loading dose of magnesium sulfate on uterine, umbili-

cal, and fetal middle cerebral arteries Doppler in women with severe preeclampsia: a case control study [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2016, 35(1): 91-99.

[14] 张薇. 硫酸镁对子痫前期患者子宫动脉、螺旋动脉及胎儿血流动力学指标的影响研究 [J]. *海峡药学*, 2012, 24(10): 243-244.

[15] 朴顺福,张妍,张宁,等. 硫酸镁对子痫前期病人胎儿血流的影响 [J]. *青岛大学医学院学报*, 2015, 51(1): 77-79.

(收稿日期:2017-01-23 修回日期:2017-03-16)