

• 论 著 •

急性脑梗死患者外周血单核细胞 TLR4 表达及其与 TpP、Fn 的相关性研究

赵顺锋

(山东省聊城市第三人民医院检验科 252000)

摘 要:目的 探讨急性脑梗死(ACI)患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 (TLR4)的表达及其与血栓前体蛋白(TpP)和纤维连接蛋白(Fn)的相关性及临床意义。方法 以 79 例 ACI 患者作为脑梗死组,以 30 例健康体检者作为健康对照组,采用流式细胞术检测外周血中单核细胞 TLR4 的表达,用 ELISA 法测定血浆 TpP、Fn 水平。结果 脑梗死组 TLR4 表达、血浆 TpP、Fn 浓度均高于健康对照组($P<0.01$)。TLR4 的表达与血浆 TpP、Fn 浓度呈正相关($P<0.01$)。结论 研究提示,TLR4 在 ACI 缺血性炎症性损伤中具有重要的作用,其机制可能是通过上调 TLR4 表达,促进炎症因子产生和分泌,从而介导脑缺血炎症性损伤。TLR4 及其介导的炎症反应与 ACI 的发生、发展存在一定的相关性。联合检测患者 TLR4 表达与血浆 TpP、Fn 水平对 ACI 的早期诊断、治疗、预后有一定的临床价值。

关键词:脑梗死; Toll 样受体 4; 连接蛋白类; 血栓前体蛋白
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.006 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)04-0444-02

Relationship between expression of toll like receptor 4 in peripheral blood monocytes and TpP and Fn in patients with acute cerebral infarction

Zhao Shunfeng

(Department of Clinical Laboratory, The Third People's Hospital of Liaocheng City, Shandong 252000, China)

Abstract:**Objective** To investigate the expression of peripheral blood mononuclear cells Toll-like receptor 4 (TLR4), and the correlation and clinical significance among TLR4 and thrombus precursor protein (TpP) and fibronectin (Fn) in acute cerebral infarction (ACI) patients. **Methods** The expression of TLR4 protein in peripheral blood mononuclear cells was detected in 79 patients with ACI by flow cytometry, and serum TpP and Fn levels were detected by ELISA, and 30 healthy examples were enrolled as control group. **Results** TLR4 expression, serum TpP and Fn concentrations in ACI group were significantly higher than control group ($P<0.01$). TLR4 expression and serum TpP and Fn concentration were positively correlated ($P<0.01$). **Conclusion** Research suggests that TLR4 plays an important role in inflammatory injury with ACI, its mechanism is possible to promote the secretion of inflammatory cytokines mediating the inflammatory injury in cerebral ischemic through upregulating TLR4 expression. There is a certain relevance among TLR4 and its mediated inflammatory response and the occurrence and development of ACI. The combinatory detection of TLR4 expression and TpP and Fn levels in patients has a certain value on the early diagnosis and treatment of ACI.

Key words: brain infarction; Toll-like receptor 4; connexins; thrombus pre-cursor protein

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI)是神经系统的常见病和多发病^[1-2]。长期研究认为,脑血流阻断导致的脑组织缺血、缺氧损害,继之诱发的神经细胞坏死和凋亡是其主要的病理生理机制^[3]。有研究证实,脑缺血后存在明显炎症细胞聚集增加,细胞因子(致炎因子)表达上调,细胞黏附分子表达增加等炎症反应^[4-5]。目前,ACI 患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)蛋白的表达与血栓前体蛋白(thrombus pre-cursor protein, TpP)和纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)的关系研究尚少见报道,本研究通过检测 PBMC 中 TLR4 的表达与血浆中 TpP 和 Fn 的水平,探讨其在 ACI 患者诊治中的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008 年 12 月至 2009 年 12 月本院神经内科收治 ACI 患者 79 例,其中男 45 例,女 34 例,平均年龄(65 ± 8)岁,所有患者均符合我国 1995 年全国第 4 届脑血管病学术会议制定的诊断标准,并且经 CT、MRI 证实。排除标准:(1)肺栓塞患者;(2)急性心肌梗死患者;(3)下肢静脉血栓患者;(4)急性肝缺血病变者;(5)自身免疫性疾病患者;(6)使用激素或免疫抑制剂者;(7)不依从或不能完成本课题涉及指标测定者。同

时收集本院健康体检者 30 例作为对照组,其中男 18 例,女 12 例,平均年龄(64 ± 6)岁。2 组对象的年龄、性别比较差异无统计学意义。所有受试者均签署知情同意书,并经本院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理

入选者于入院后次日清晨空腹采集静脉血 4 mL,其中 2 mL 用乙二胺乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝后用于检测 TLR4,另外 2 mL 收集于含枸橼酸钠抗凝剂(0.129 mmol/L)的试管中,抗凝剂与血液的比例为 1:9,以 8 cm 为离心半径,2 000 r/min 离心 15 min,分离血浆后于 -70 ℃保存待测。

1.2.2 TLR4 的测定

取 100 μ L EDTA-K₂ 抗凝的全血,加入 20 μ L PE 标记鼠抗人 TLR4 单抗(Biolegend 公司,美国),混匀后室温孵育 30 min,用标本处理仪进行细胞固定和破膜,离心后弃上清液,用 2 mL Stain buffer(pH7.4 的磷酸缓冲液加 2%小牛血清和 0.1%叠氮钠)洗 2 遍,细胞沉淀用 500 mL Stain buffer 重悬后上流式细胞仪(Coulter 公司,美国)检测,同时设不加标记抗体的阴性对照管,测定 PBMC 中 TLR4 蛋白表达量。

1.2.3 血浆 TpP 和 Fn 含量测定

均采用 ELISA 法。仪器

为北京普朗酶标仪、洗板机,所选试剂均由美国 ABS 公司生产,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 所有数据用 SPSS13.0 处理,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验、 t 检验、方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白的表达水平 见表 1。与健康对照组相比,ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白表达的阳性率及表达量(即荧光强度)均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白的表达			
组别	<i>n</i>	阳性率(%)	荧光强度
健康对照组	30	8.69±5.82	2.29±1.95
ACI 组	79	67.89±13.29*	11.76±4.31*

* : $P < 0.01$,与健康对照组比较。

2.2 ACI 患者血浆 TpP、Fn 浓度水平 见表 2。与健康对照组相比,ACI 患者血浆 TpP 和 Fn 浓度水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 ACI 患者血浆 TpP、Fn 检测结果			
组别	<i>n</i>	TpP(mg/L)	Fn(μg/L)
健康对照组	30	3.2±1.1	227±51
ACI 组	79	16.3±6.8*	442±59*

* : $P < 0.01$,与健康对照组比较。

2.3 ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白的表达与血浆 TpP、Fn 浓度相关性 相关性分析显示,ACI 组中 TLR4 蛋白表达与血浆 TpP、Fn 浓度呈正相关,相关系数分别为 0.841 和 0.793, P 值均小于 0.01。

3 讨 论

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)分布广泛,主要表达于单核细胞、巨噬细胞、树突细胞等细胞膜上,是与微生物识别有关的天然免疫受体家族,属膜式识别受体^[6]。TLRs 最突出的生物学功能是促进细胞因子的合成与释放,引发炎症反应,以及促进抗原提呈细胞的成熟,从而诱导机体的获得性免疫反应^[7]。因此,TLRs 是机体介导天然免疫转向获得性免疫的桥梁。脑梗死时,PBMC 中 TLR4 的表达上调,促进炎症因子的产生和分泌,从而介导脑缺血炎症损伤。本研究中,ACI 组与健康对照组相比,ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白明显增高,此结果与目前 TLR4 在动脉阻塞疾病、心肌缺血再灌注损伤、肝脏缺血再灌注损伤的结果基本一致^[8],本研究显示 TLR4 参与了 ACI 发生后的缺血性炎症损伤。PBMC 中 TLR4 的表达增高与 ACI 的发生有密切关系,是脑梗死发病的一个危险因素,通过检测 PBMC 中 TLR4 的表达水平可以识别脑梗死的高危患者,有利于采取积极措施对疾病进行合理的控制和监测。

血栓形成是脑梗死等血栓性疾病发生的早期事件,并贯穿于疾病发展的始末。TpP 是血栓的直接前体,血浆 TpP 水平升高是活动性血栓形成的重要标志。TpP 是凝血酶从纤维蛋白原上切割掉纤维蛋白原 A 肽及 B 肽后形成的可溶性纤维蛋白,血栓形成时,TpP 会不可避免地升高。因此,TpP 的浓度可反映血栓形成活动水平。Carville 等^[9]研究表明,TpP 是 ACI 的早期预报指标。本组结果显示,ACI 患者的 TpP 水平较健康对照组有显著的升高($P < 0.01$),提示 TpP 水平的升高

对于 ACI 的早期诊断非常有价值,对判断病情进展也有帮助。

Fn 为血小板 α 颗粒的成分之一,Fn 从 α 颗粒释放并结合到血小板膜表面,从而介导血小板的黏附和聚集反应^[10]。Ni 等^[11]通过观察 Fn 基因剔除小鼠模型发现,Fn 是除 von Willebrand 因子和纤维蛋白原之外的又一种介导血小板黏附与聚集的物质。本组也发现 ACI 患者血浆 Fn 水平较健康对照组显著升高($P < 0.01$)。此外,Serena 等^[12]研究认为,Fn 作为内皮损伤的分子标志物,可帮助预测脑梗死患者发生脑水肿的严重程度,由此推测 Fn 可能有助于脑梗死的早期诊断及预后判断。

本组研究了 ACI 患者 PBMC 中 TLR4 的表达情况,及其与血浆 TpP 和 Fn 浓度的相关性,结果发现 ACI 患者 PBMC 中 TLR4 蛋白明显增高,并与血浆 TpP、Fn 浓度呈正相关,因此 3 者联合检测对 ACI 的早期诊断、治疗及预后有一定的临床价值。

参考文献

[1] Kim Y, So HS, Kim JK, et al. Anti-inflammatory effect of oyak-sungisan in peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(6): 1037-1041.

[2] Tulner DM, Smith ORF, de Jonge P, et al. Circulating cerebral S100B protein is associated with depressive symptoms following myocardial infarction[J]. Neuropsychobiol, 2009, 59(2): 87-95.

[3] Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. New paradigm for brain protection after stroke[J]. Hypertension, 2006, 47(4): 742-751.

[4] Khan M, Sekhon B, Jatana M, et al. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(4): 519-527.

[5] Gill R, Kemp JA, Sabin C, et al. Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(11): 1214-1218.

[6] Hawn TR, Scholes D, Li SS, et al. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women[J]. PLoS One, 2009, 4(6): 5990.

[7] Cormican P, Lloyd AT, Downing T, et al. The avian Toll-like receptor pathway-subtle differences amidst general conformity[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(9): 967-973.

[8] Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells[J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7661-7668.

[9] Carville DG, Dimitrijevic N, Walsh M, et al. Thrombus precursor protein (TpP): marker of thrombosis early in the pathogenesis of myocardial infarction[J]. Clin Chem, 1996, 42(9): 1537-1541.

[10] Ni H, Denis CD, Subbarao S, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen[J]. J Clin Invest, 2000, 106(3): 385-392.

[11] Ni H, Yuen PS, Papalia JM, et al. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2415-2419.

[12] Serena J, Blanco M, Castellanos M, et al. The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers[J]. Stroke, 2005, 36(9): 1921-1926.