

· 基础研究 ·

sTREM-1 在铜绿假单胞菌感染和定植的表达及意义*

高晓岚,艾中平,湛晓勤,甘辞海

(泸州医学院附属医院 ICU,四川泸州 646000)

摘要:目的 通过研究可溶性髓样细胞触发受体-1(sTREM-1)在铜绿假单胞菌呼吸系统感染和定植不同状态下表达水平的变化,探讨 sTREM-1 在铜绿假单胞菌肺炎及呼吸道定植中的意义。方法 将 90 只 SD 大鼠随机分为肺部感染组、口咽部定植组及对照组,每组按铜绿假单胞菌接种后不同时间又分为 3、9、24 h 亚组,每亚组 10 只。运用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 sTREM-1 浓度;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织 TREM-1 mRNA 表达;病理组织切片观察各组肺部炎症改变,并进行肺组织匀浆菌落计数。结果 感染组大鼠肺组织病理改变在 9 h 最为严重,而定植组和对照组的肺泡及肺间质结构基本正常;肺部感染组 3、9、24 h 肺组织 TREM-1 mRNA 的表达和血清中 sTREM-1 的浓度较定植组及对照组均明显增高($P < 0.05$),定植组与对照组 TREM-1 mRNA 的表达和 sTREM-1 浓度的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 检测 sTREM-1 有助于鉴别铜绿假单胞菌感染与定植;动态监测 sTREM-1 的变化对感染性疾病的早期诊断和病情评估具有指导意义。

关键词:感染;铜绿假单胞菌;髓样细胞触发受体-1;定植

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2246-03

Expression and significance of sTREM-1 in pseudomonas aeruginosa infection and colonization*

Gao Xiaolan, Ai Zhongping, Zhan Xiaojin, Gan Cihai

(Department of ICU, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) in respiratory infection and colonization of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Ninety Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: lung infection group, oropharynx colonization group and the control group. Each group was subdivided into 3, 9, 24 hours after being injected *Pseudomonas aeruginosa*, 10 rats in each subgroup. The concentration of sTREM-1 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the level of TREM-1 mRNA was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR), lung pathological changes were observed, and the bacterial colonies of lung homogenate were counted. **Results** The changes of the lung tissue pathology were the most serious in the infection group at 9 hours. The alveolar and pulmonary interstitial structures were normal in the colonization and control groups. In the infection group of each time point, the expression of TREM-1 mRNA and the level of sTREM-1 were much higher than that in colonization group and control group ($P < 0.05$), but there were no significant differences between the colonization and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Detection of sTREM-1 will contribute to identify the infection and colonization induced by *pseudomonas aeruginosa*. Dynamic monitoring sTREM-1 on diagnosis and evaluation will have significance in infectious disease.

Key words: infection; *pseudomonas aeruginosa*; TREM-1; colonization

可溶性髓样细胞触发受体-1(sTREM-1)是近年来被发现并应用于诊断感染性疾病的重要标记物,其在感染性炎症中表达明显升高^[1]。铜绿假单胞菌是呼吸道最常见的定植菌之一,临床判断痰培养出的铜绿假单胞菌是定植菌还是致病菌非常困难,鉴别手段十分有限,故寻求一种快速、简便、敏感的鉴别诊断指标尤为重要。本研究旨在通过观察 sTREM-1 在铜绿假单胞菌呼吸系统感染和定植不同状态下的表达水平,探讨 sTREM-1 在铜绿假单胞菌感染和定植中的意义。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂 健康雄性 SD 大鼠 90 只,体质量 180~220 g,由泸州医学院实验动物中心提供。铜绿假单胞菌标准菌(ATCC27853)由泸州医学院附属医院检验中心提供。大鼠 sTREM-1 酶链免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技公司;RT-PCR 试剂盒购自成都博瑞克生物技术公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的制作及分组 采用完全随机数字表法将大鼠分成肺部感染组(感染组)、口咽部定植组(定植组)、对照组 3 组,每组按铜绿假单胞菌接种后不同时间点以随机法再分为 3、9、24 h 亚组,每亚组 10 只大鼠。肺部感染组:取培养 18 h 的铜绿假单胞菌,用无菌生理盐水配制成 2 个麦氏单位浓度(6×10^8 cfu/mL)菌液,1%戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,经环甲膜穿刺从气管中注入 0.4 mL 菌液;口咽部定植组:将 2 个麦氏单位铜绿假单胞菌菌液 0.4 mL 分别经口、鼻腔缓慢滴入;对照组:经环甲膜穿刺从气管中注入无菌生理盐水 0.4 mL。

1.2.2 检测指标及方法 制模成功后 3、9、24 h 经心脏采血 2 mL,离心后取上清液于-70℃保存待测,采用 ELISA 法测定血清 sTREM-1 浓度,严格按照试剂说明书进行操作;取血后处死大鼠,在无菌操作下取右下肺叶行苏木精-伊红(HE)染色后进行光学观察;将右上肺叶取材称质量,在无菌操作下制备

* 基金项目:泸州医学院附属医院科研基金[院发(2011)43号]。

作者简介:高晓岚(1982~),硕士,主要从事肺部感染的临床研究工作。

肺组织匀浆,取 1 mL 匀浆液用无菌生理盐水对其进行 10、10²、10³、10⁴ 倍稀释,取各浓度的匀浆 0.1 mL,用接种环均匀涂布在血琼脂平板表面,然后 37 °C 培养箱内孵育 24 h,最后计算出各稀释倍数下的菌落数。定植组加行咽拭子细菌培养。

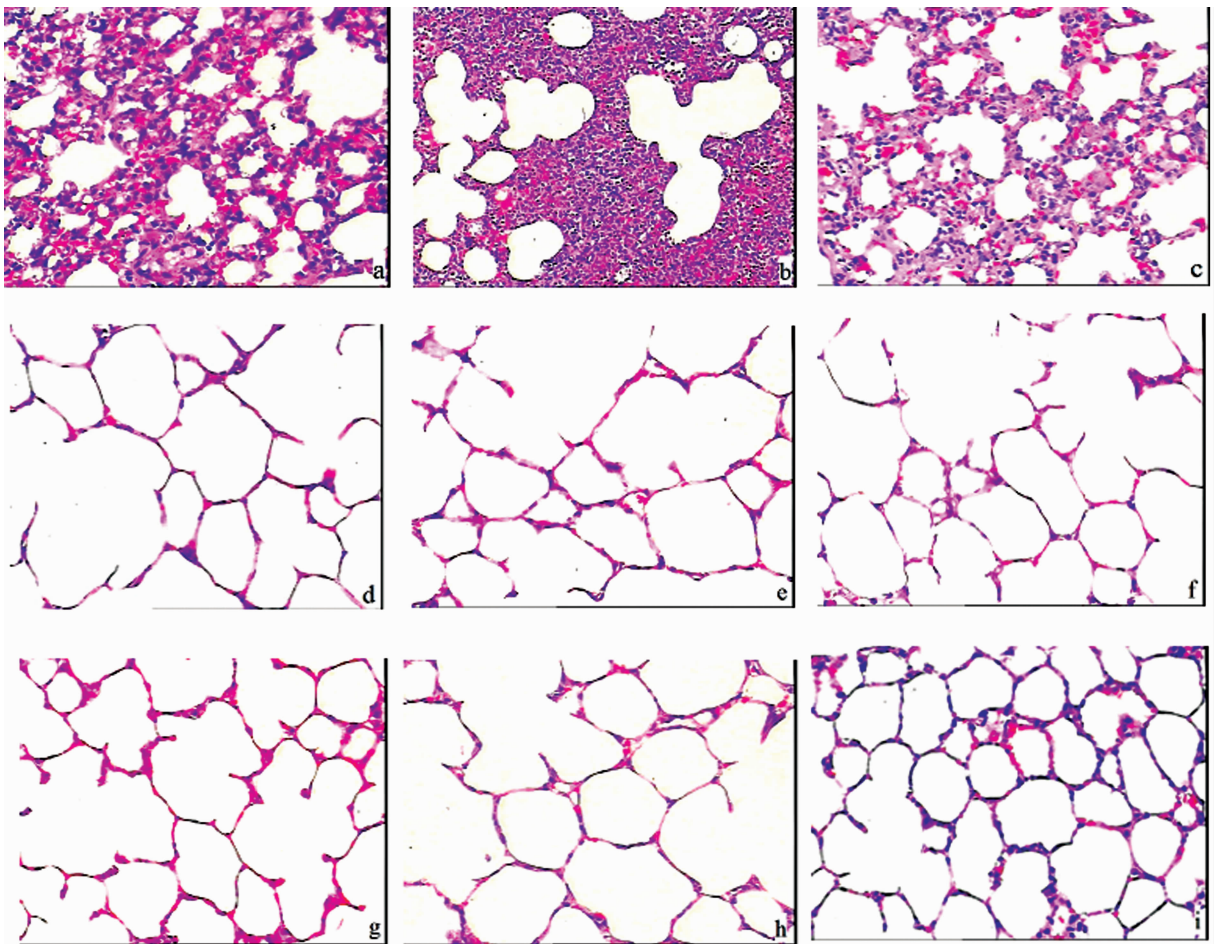
1.2.3 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肺组织中 TREM-1 mRNA 表达:根据 Genbank 中大鼠 TREM-1 和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的序列,由上海生工生物工程有限公司合成引物。引物序列: TREM-1 上游 5'-AGT ATG CCA GAA GCA GGA AG-3',下游 5'-TCG GGT TGG AGT TGA GTG TT-3',扩增片段大小为 362bp 左右; GAPDH 上游:5'-CCT CAA GAT TGT CAG CAA T-3',下游:5'-CCA TCC ACA GTC TTC TGA GT-3',扩增片段大小为 141 bp 左右。用 Trizol 试剂一步法提取肺组织总 RNA,测定 RNA 纯度并定量,逆转录后行 PCR 扩增。扩增条件:94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共循环 30 次,最后 72 °C 延伸 5

min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,利用凝胶成像分析系统扫描 PCR 产物量,以相对吸光度(A)值×面积表示,分析结果以 GAPDH 作为对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据分别进行正态检验和方差齐性分析,若符合正态分布和方差齐性,则进行 ANOVA,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学观察 光镜下感染组各时间点可见大量炎性细胞浸润并扩散到肺间质内,肺间质水肿,肺泡隔增厚,间质及肺泡内出血明显,肺泡壁结构破坏,局部有肺泡膨胀不全或肺泡塌陷、融合,其中以细菌接种 9 h 炎症改变最为严重,出现典型肺炎表现,3、24 h 与之相比炎症表现较轻;而对照组及定植组各时间点肺泡结构完整,肺泡腔清晰,肺泡间隔均一,肺泡和肺间质无出血及炎性细胞浸润,见图 1。



a:感染组 3 h;b:感染组 9 h;c:感染组 24 h 组;d:定植组 3 h;e:定植组 9 h;f:定植组 24 h;g:对照组 3 h;h:对照组 9 h;i:对照组 24 h。

图 1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变情况 (HE×200)

2.2 肺组织匀浆菌落计数 接种后 3、9、24 h,定植组和对照组肺组织匀浆均未培养出细菌,而感染组肺匀浆中均有铜绿假单胞菌生长,肺组织匀浆菌落计数均大于 10⁵ cfu/g。定植组咽拭子均培养出铜绿假单胞菌。

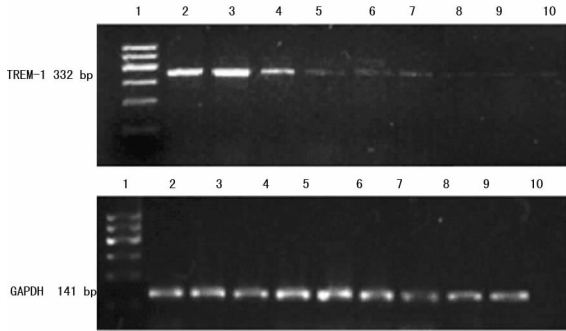
2.3 肺组织 TREM-1 mRNA 表达(表 1,图 2) 与定植组和对照组比较,感染组在细菌接种后 3、9、24 h TREM-1 mRNA 表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),其表达水平在 3 h 就有升高,9 h 显著增高,24 h 逐渐下降。而定植组和对照组 TREM-1 mRNA 的表达相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 不同组别 3、9、24 h 肺组织 TREM-1 mRNA 的表达(A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 h	9 h	24 h
感染组	30	2.21±0.75 ^{#△}	2.87±0.48 ^{#△}	0.93±0.15 ^{#△}
定植组	30	0.18±0.04	0.21±0.05	0.19±0.04
对照组	30	0.19±0.04	0.20±0.04	0.20±0.04

[#]: $P < 0.05$, 与同时时间点的定植组相比; [△]: $P < 0.05$, 与同时时间点的对照组相比。

2.4 血清 sTREM-1 的浓度(表 2) 感染组血清 sTREM-1 的浓度较定植组和对照组有明显升高($P < 0.05$),而定植组血清 sTREM-1 浓度与对照组相比差异没有统计学意义。感染组各时间点血清 sTREM-1 的浓度分别是(80.82 ± 10.10)、(136.60 ± 20.29)、(59.74 ± 9.13)ng/L,组内 sTREM-1 浓度差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 sTREM-1 的浓度在 3 h 开始上升,9 h 到达高峰,24 h 后降低。



1:DNA 标记物;2:感染组 3 h;3:感染组 9 h;4:感染组 24 h;5:定植组 3 h;6:定植组 9 h;7:定植组 24 h;8:对照组 3 h;9:对照组 9 h;10:对照组 24 h。

图 2 不同组别 3、9、24 h 肺组织 TREM-1 mRNA 表达水平

表 2 不同组别 3、9、24 h 血清 sTREM-1 的浓度($\bar{x} \pm s$,ng/L)

组别	n	3 h	9 h	24 h
感染组	30	80.82 ± 10.10 ^{#△}	136.60 ± 20.29 ^{#△}	59.74 ± 9.13 ^{#△}
定植组	30	45.43 ± 18.01	42.83 ± 13.33	44.99 ± 18.85
对照组	30	40.25 ± 8.93	38.40 ± 9.20	38.78 ± 8.47

[#]: $P < 0.05$,与同时时间点的定植组相比;[△]: $P < 0.05$,与同时时间点的对照组相比。

3 讨论

医院获得性肺炎是中国最常见的院内感染之一,其发病率为 1.3%~3.4%,病死率为 20%~50%,而重症肺炎病死率高达 70%^[2-3]。铜绿假单胞菌作为医院获得性肺炎最常见的定植菌之一,其在痰标本中分离率位居首位,在临床上通过痰培养判断其为致病菌还是定植菌较为困难,临床医生对此很难做出准确、及时的判断,从而可能造成抗菌药物的过度应用或延误治疗时机,因此近年对致病菌和定植菌的鉴别成为了国内外学者研究和探索的方向。但这些研究均存在可靠性不稳定,检测周期长,操作复杂等局限性,并且仍无法确认是定植菌还是致病菌^[4-7]。

TREM-1 属于免疫球蛋白超家族受体,在许多髓样细胞表面都有表达^[1]。在对其天然配体的研究中发现^[8],铜绿假单胞菌的细胞壁多糖可能是 TREM-1 的天然配体。TREM-1 与配体结合后,其跨膜结构域保守的赖氨酸残基与跨膜信号传导分子 DAP12 的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)中的天冬氨酸残基结合,使酪氨酸磷酸化,从而引发一系列下游信号传导的发生,启动与炎症相关基因的转录,促进 TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等促炎因子和趋化因子的合成和分泌,引起中性粒细胞脱颗粒及发生呼吸爆发,同时 TREM-1 也能与 Toll 样受体互相影响,因此 TREM-1 在炎症反应中起到触发和放大的重要作用。sTREM-1^[9]作为 TREM-1 的可

溶性形式,在炎症反应中高表达的 TREM-1 可从髓系细胞表面被蛋白酶切割、脱落成为游离状态的 sTREM-1,并且在细胞的培养液、动物模型或病人的血清、肺泡灌洗液、脑脊液、胸水中均检测到了 sTREM-1 的表达^[10-13]。

TREM-1 能够在铜绿假单胞菌的诱导下迅速启动其基因转录并翻译为具有生理功能的蛋白分子,从而在早期就参与炎症反应的启动且此后也一直发挥着相应的功能。在本研究中发现,感染组各时间点血清 sTREM-1 浓度明显高于定植组和对照组,在细菌感染后的 3 h 即可检测到血清 sTREM-1 的升高,9 h 其浓度达到最高,这与 Knapp 等^[14]的研究中发现注射内毒素后血清 sTREM-1 浓度的变化有着相似的趋势,而 sTREM-1 浓度的变化表明其可能具有早期鉴别铜绿假单胞菌感染和定植的作用。同时作者也发现 TREM-1 mRNA 的表达和血清 sTREM-1 的浓度水平与肺部炎症程度相关,在肺部炎症改变最为严重的感染 9 h 组 TREM-1 基因表达和血清 sTREM-1 浓度水平的增加最为明显,而随着感染的控制和炎症的减轻,TREM-1 水平则逐步下降。提示 TREM-1 与感染性炎症反应有着紧密的联系,TREM-1 的表达高低能够反映炎症反应的强弱,其变化有助于临床医师对感染性疾病严重程度和治疗效果的评价。

综上所述,TREM-1 在呼吸系统铜绿假单胞菌感染和定植的不同状态下表达具有明显的差异,依靠这种差异有助于呼吸道铜绿假单胞菌感染与定植的鉴别。动态监测 sTREM-1 的变化对感染性疾病的早期诊断和病情评估具有重要意义。

参考文献:

- [1] Bouchou A, Facchetti F, Weiqand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock[J]. Nature, 2001, 410(6832): 1103-1107.
- [2] American Thoracic Society Documents. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171: 388-416.
- [3] 杨薇,陈萍,刘丁. 医院获得性肺炎发病情况与危险因素动态研究[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(6): 390-392.
- [4] Koenig SM, Truitt JD. Ventilator-associated pneumonia; diagnosis, treatment, and prevention[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(4): 637-657.
- [5] 杨曼琼,钟礼立,张兵,等. 荧光定量 PCR 评价铜绿假单胞菌感染的实验研究[J]. 中国医师杂志, 2008, 10(3): 312-317.
- [6] Uhl JR, Adamson SC, Vetter EA, et al. Comparison of Light Cycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 242-249.
- [7] 肖性龙,张经纬,龚俊,等. ETA 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 Taqmon 探针快速检测铜绿假单胞菌的研究[J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 581-585.
- [8] 余志辉,黄红川,毛璞,等. 细菌细胞壁人髓系细胞触发受体-1 天然配体的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(6): 335-339.
- [9] Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected(下转第 2251 页)

省份,广西壮族自治区为 1.35%^[7],江西省为 0.36%^[8],河北省为 2%^[9],河南省为 2.08%^[10]。这说明本市总体处于中等水平,本次发现的结核病和 HIV/AIDS 双重感染患者主要集中在经济较为发达的西部和中部地区,两个地区的 HIV 感染率明显高于其他地区,且高于全市平均水平,因此,各地区感染水平不均衡,地区差异明显,表明本市的结核病和 HIV/AIDS 双重感染形势不容乐观,控制双重感染应因地制宜,分类指导,监测重点地区。

3.2 不同人群特点的结核病患者 HIV 感染状况 通过对本次参与调查的所有结核病患者进行分析,不同年龄、性别、职业、文化程度和登记分类的结核患者的 HIV 感染率没有统计学差异,这也提示人们在制定双重感染的防控政策和措施时,应该全方位覆盖不同人群特点的结核病患者。

3.3 结核病和 HIV/AIDS 双重感染使结核病防控工作面临新的挑战 HIV 病毒导致机体免疫功能缺陷,助长了结核病的进一步流行。一些研究表明,HIV 感染导致部分结核病可疑患者就诊延迟;同时可加快感染结核分枝杆菌的患者发展成为活动性肺结核患者的进程。结核病也可能增强 HIV 的复制并加速 HIV 感染的自然进程^[11],这无疑增加了患者的治疗难度,使得治疗成功率下降。《2011 年全球结核病控制报告》显示 2010 年全球约有 35 万人死于 HIV 感染相关结核病。部分非洲国家 30% 的 HIV/AIDS 患者的死亡和结核病有关^[12]。近年来,对结核病和 HIV/AIDS 双重感染流行态势调查发现,结核病和 HIV/AIDS 双重感染率不断攀升,其感染病例每年增加近 10%^[13]。可以看出结核病的防控工作面临结核病和 HIV/AIDS 双重感染所带来的新的挑战,加强结核病和 HIV/AIDS 双重感染的防治工作已刻不容缓。

3.4 采取积极有效的措施,加强结核病和 HIV/AIDS 双重感染防治工作 HIV 感染增加了结核病的流行,只有加强结核病防治机构与 AIDS 防治机构的协作才能有效控制双重感染疫情,减轻与 AIDS 相关的结核病负担。重庆市分别制定了结核病和 AIDS 防治规划,正在建立结防机构和艾防机构的有效合作机制,逐步开展了双向筛查工作。与此同时,也应进一步加强重点地区的监测,及时发现和治疗患者,更有效的控制结核病和 HIV/AIDS 双重感染。

参考文献:

[1] Harries A, Maher D, Graham S. TB/HIV: a clinical manu-

al[M]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2004: 3-37.

[2] 严碧涯. 人类免疫缺陷病毒艾滋病与结核病关系的进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19(6): 329-332.

[3] 艾维莉. 艾滋病与结核病双重感染的研究概况[J]. 内科, 2007, 2(4): 604-606.

[4] Cao YZ. Mixed infection of AIDS and tuberculosis[J]. Intern J Infect, 2006, 2: 102-105.

[5] Harries AD, Nyandala DS, Kangombe C, et al. The scourge of HIV-related tuberculosis: a cohort study in a district general hospital in Malawi[J]. Ann Trop Med Parasitol, 1997, 91(7): 771-776.

[6] 王陇德. 结核病防治[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 273.

[7] 林柱新, 段润宁, 刘明团, 等. 结核病人感染人类免疫缺陷病毒(HIV)监测结果分析[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(5): 446-447.

[8] 何旺瑞, 胡嘉江. 江西省结核病人中 HIV 感染现状调查[J]. 现代预防医学, 2009, 37(16): 3147-3149.

[9] 路丽, 张联英, 陈海峰, 等. 河北省 TB/HIV 双重感染监测结果分析[J]. 预防医学情报杂志, 2009, 25(4): 250-251.

[10] 甄新安, 马士文, 雷朝宽, 等. 结核病人中 HIV 感染现状调查结果分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(19): 3601-3603.

[11] Swaminathan S, Deivanayagam CN, bjasekaran S, et al. Longterm follow up of HIV-infected patients with tuberculosis treated with 6-month intermittent short course chemotherapy[J]. Natl Med J India, 2008, 21(1): 3-8.

[12] Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, et al. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and the Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(4): 603-662.

[13] 曲淑霞, 陆立星, 孙燕, 等. HIV/AIDS 患者合并结核病调查分析[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(15): 2714.

(收稿日期: 2012-11-13 修回日期: 2013-03-08)

(上接第 2248 页)

sepsis[J]. Ann Intern Med, 2004, 141(1): 9-15.

[10] Gibot S, Cravoisy A, Levy B, et al. Combined measurement of PCT and soluble TREM-1 in the diagnosis of nosocomial sepsis[J]. Scand J Infect Dis, 2007, 39(6/7): 604-608.

[11] 张良清, 古妙宁, 徐军发, 等. 脓毒症小鼠多器官髓样细胞触发受体-1 基因的表达及其意义[J]. 中国急救医学, 2008, 28(1): 46-48.

[12] Bishara J, Hadari N, Shalita-Chesner M, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 for distinguishing bacterial from aseptic meningitis in adults

[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(9): 647-650.

[13] Chan MC, Chang KM, Chao WC, et al. Evaluation of a new inflammatory molecule (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) in the diagnosis of pleural effusion[J]. Respirology, 2007, 12(3): 333-338.

[14] Knapp S, Gibot S, de Vos A, et al. Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia[J]. J Immunol, 2004, 173(12): 7131-7134.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-03-29)