

Toll 样受体在新生儿呼吸窘迫综合征中作用的研究

熊 维¹,蒲向阳^{2△},李晓文³

(1.重庆市酉阳县人民医院儿科 409800;2.重庆市黔江区中心医院儿科 409000;

3.重庆医科大学附属儿童医院新生儿科 400014)

[摘要] **目的** 探讨 Toll 样受体在新生儿呼吸窘迫综合征(NRDS)中的作用。**方法** 选取酉阳县人民医院 2014 年 10 月至 2015 年 10 月的 42 例 NRDS 患儿作为病例组,选取同期的 42 例非 NRDS 患儿作为对照组,对两组研究对象的 TLR2、TLR3 和 TLR4、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、JNK 和核因子- κ B(NF- κ B)血清学水平进行检查,TLRs/JNK/NF- κ B/TNF- α 信号通路进行表达,分析 TLR2、TLR3 和 TLR4 血清学水平与 NRDS 发病的相关性,以及 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 与 NRDS 发病的相关性。**结果** 两组患者的治疗后 3 d 和 7 d 的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与治疗前存在明显差异,而且病例组的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$);两组患者治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 TLR2、TLR3 和 TLR4 明显低于治疗前,而且病例组治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 TLR2、TLR3 和 TLR4 明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与 NRDS 发病具有良好的相关性,TLR2、TLR3 和 TLR4 与 NRDS 发病具有良好相关性。**结论** 对 NRDS 的 Toll 样受体分析可以更好的发现 TLRs/JNK/NF- κ B/TNF- α 信号通路与新生儿呼吸窘迫综合征的相关性。

[关键词] Toll 样受体;呼吸窘迫综合征,新生儿;肺表面活性物质;TLRs/JNK/NF- κ B/TNF- α 信号通路**[中图分类号]** R722.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)34-4814-03

The study of Toll-like receptors in the neonatal respiratory distress syndrome

Xiong Wei¹,Pu Xiangyang^{2△},Li Xiaowen³

(1. Department of Paediatrics, People's Hospital of Youyang County, Chongqing 409800, China;

2. Department of Paediatrics, Central Hospital of Qianjiang District, Chongqing 409000, China; 3. Department of

New Pediatric, the Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the toll-like receptors in neonatal respiratory distress syndrome (NRDS). **Methods** Forty two cases of neonatal respiratory distress syndrome were selected as cases group from October 2014 to October 2015, 42 cases of neonatal respiratory distress syndrome in the same period were selected as the control group. The TLR2, TLR3 and TLR4 serology, TLRs/JNK/nf-kappa B/TNF alpha express signal path were analyzed; the correlation between TLR2, TLR3 and TLR4 serological levels and the incidence of NRDS was analyzed, and correlation between TNF- α , IL-6, JN, NF- κ B and the incidence of NRDS was analyzed, too. **Results** The TNF- α , IL-6, JNK and nf-kappa B serological levels at 3rd and 7th day between two groups were significantly different compared with pre-treatment levels. And the TNF- α , IL-6, JNK and nf-kappa B serological levels between the case group and the control group were significantly different, too ($P < 0.05$); the TLR2, TLR3 and TLR4 on the 3rd and 7th day after treatment were significantly lower than that of pretreatment, and the TLR2, TLR3 and TLR4 on the 3rd and 7th day after treatment of case group were significantly lower than that of control group ($P < 0.05$); TNF- α , IL-6, JNK and nf-kappa B serological levels and the NRDS incidence were closely related, and TLR2, TLR3 and TLR4 and the NRDS incidence were closely related, too. **Conclusion** The analysis of toll-like receptors in neonatal respiratory distress syndrome can help to find the correlation between TLRs/JNK/nf-kappa B/TNF alpha signaling pathways and the neonatal respiratory distress syndrome.

[Key words] Toll-like receptors; respiratory distress syndrome, newborn; lung surface active substance; TLRs/JNK/NF-kappa B/TNF alpha signaling pathways

新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)是出生新生儿的一种常见的呼吸道重症,而且也是早产儿常见的临床表现,也是导致新生儿死亡的重要原因。相关的资料显示 NRDS 是新生儿在出生一年内容易患上的疾病^[1-2]。此外, NRDS 也是我国 NICU 住院期间平均费用是新生儿呼吸衰竭疾病谱中最高^[3-4]。目前一致认为肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)缺乏是 NRDS 的发病机制^[5]。PS 相关蛋白是肺泡 II 型上皮细胞损伤的一个重要标志物, SP-A 与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)具有良好的负相关,而且 SP-A 水平下降也可以说明 ARDS 也会严重发生,可能的

原因是 SP-A 可以抑制 C1q 介导的补体活化和炎症反应,而且还可以与先天免疫的 Toll 样受体(TLRs)有着一定关系。目前有关 TLRs 与 ARDS 的研究已见很多报道,而 NRDS 中 TLRs 的表达情况鲜有报道。对 NRDS 固有免疫功能的因子如粒细胞、单核巨噬细胞数量的研究可为进一步了解在该病的发生,而且对发展过程中的特异免疫 TLRs、TNF- α 、IL-6 等相关因子具有一定参考。因此,本课题通过对 NRDS 患儿体内外周血免疫细胞有关 TLRs 信号通路分子的检测统计分析,探讨血清 TLRs(TLR2~4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、JNK 和核因子- κ B(NF- κ B)水平与 NRDS

表 1 两组患者的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF- α			IL-6			JNK			NF- κ B		
		治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d
病例组	42	6.5 \pm 0.9	11.9 \pm 0.6 ^a	9.9 \pm 1.1 ^a	4.6 \pm 0.8	9.9 \pm 0.7 ^a	7.8 \pm 0.8 ^a	6.5 \pm 0.8	9.4 \pm 0.6 ^a	7.5 \pm 0.8 ^a	14.9 \pm 1.1	29.6 \pm 1.8 ^a	18.9 \pm 1.5 ^a
对照组	42	6.6 \pm 1.1	8.9 \pm 1.5 ^a	6.9 \pm 1.8 ^a	4.9 \pm 0.8	6.8 \pm 0.9 ^a	5.8 \pm 1.1 ^a	6.7 \pm 1.2	8.9 \pm 0.6 ^a	7.1 \pm 0.2 ^a	15.8 \pm 1.2	27.6 \pm 1.6 ^a	16.8 \pm 1.2 ^a

^a: $P < 0.05$, 与治疗前比较。

表 2 两组患者的 TLR2、TLR3 和 TLR4 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR2			TLR3			TLR4		
		治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗前	治疗后 3 d	治疗后 7 d
病例组	42	3.1 \pm 0.6	2.7 \pm 0.8 ^{ab}	2.6 \pm 0.7 ^{ab}	3.5 \pm 0.6	3.2 \pm 0.6 ^{ab}	2.6 \pm 0.8 ^{ab}	3.2 \pm 0.6	2.8 \pm 0.6 ^{ab}	2.6 \pm 0.6 ^{ab}
对照组	42	3.2 \pm 0.6	2.9 \pm 0.5 ^a	2.8 \pm 0.9 ^a	3.6 \pm 0.9	3.4 \pm 0.9 ^a	3.2 \pm 0.9 ^a	3.3 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7 ^a	2.8 \pm 0.9 ^a

^a: $P < 0.05$, 与治疗前比较; ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

发生之间的关系,分析其参与 NRDS 发病的机制,并进一步观测患儿的预后,探讨 TLRs 与患儿病情的相关性,以寻求合适有效的指标预测病情。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月至 2016 年 1 月酉阳县人民医院新生儿科收治的诊断为 NRDS 的患儿共 42 例作为病例组,其中,男 25 例,女 17 例,出生 1~5 d,平均(1.1 \pm 2.7)d;并将同期住院的 42 例非 NRDS 患儿为对照组,其中,男 24 例,女 18 例,出生 1~11 d,平均(5.6 \pm 2.5)d。

1.2 纳入标准和排除标准^[6] 入组病例填写病例收集信息表和知情同意书。纳入标准:(1)出生后 6 h 内出现呼吸困难,并伴有呼气呻吟、低氧血症表现的患儿;(2)试验的胃液泡沫显示阴性的患儿;(3)胸片检查显示肺透气度降低和细颗粒状。排除标准:(1)血液或其他体液培养显示阳性、白细胞增高或降低、C 反应蛋白(CRP)增高等发生感染的患儿;(2)伴有先天性疾病的患儿;(3)肺和胸壁畸形;(4)临床怀疑为代谢性疾病;(5)新生儿脑病。

1.3 方法

1.3.1 指标检测^[7] 所有研究对象,均在纳入试验后第 2 天清晨未进食前进行静脉采血。等血液凝固后采用 4 000 r/min 离心 10 min,分离血清并放置于 Eppendorf 管中,-40 $^{\circ}$ C 冷冻保存待用。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。采用流式细胞术检测 TLRs,具体步骤如下:取乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝的全血 100 μ L,分别加入 20 μ L PE 标记的鼠抗人 TLRs 单克隆抗体,混匀后室温避光孵育 30 min;用 QPREP 标本处理仪进行白细胞固定和红细胞破膜,室温避光 10 min,离心后弃去上清液;用 2 mL 固定洗涤液洗涤 2 次后弃去上清液;用 500 μ L 洗涤液重悬后就可以采用流式细胞仪进行检测。

1.3.2 血常规检查 研究对象静脉采血后进行白细胞计数,特别是中性粒细胞和淋巴细胞(各亚群)检测,并记录收集实验数据。

1.3.3 记录患者的预后 所有患儿采用相同的治疗方法治疗后记录患者不同时间点的预后情况。

1.4 观察指标 (1)由股静脉抽血采集血样,血常规计数、WBC、PMN 和淋巴细胞计数,ELISA 法和流式细胞仪检测对照组和 NRDS 组研究对象血清中 TLR2、TLR3 和 TLR4 的表达情况;(2)ELISA 检测血清中 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 的

变化情况;(3)检测 NRDS 组经治疗后 3 d 和 7 d 的 TLR2、TLR3 和 TLR4 血清学水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间同一指标比较采用重复测量进行方差分析,同组内同一指标治疗前后变化水平采用 t 检验。相关性分析采用 Logistic 回归分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 比较 两组患者的治疗后 3 d 和 7 d 的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与治疗前存在明显差异,而且病例组的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 两组患者的 TLR2、TLR3 和 TLR4 的比较 两组患者治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 TLR2、TLR3 和 TLR4 明显低于治疗前,而且病例组治疗后 3 d 和治疗后 7 d 的 TLR2、TLR3 和 TLR4 明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 影响 NRDS 的 Logistic 回归分析 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与 NRDS 发病具有良好相关性,以及 TLR2、TLR3 和 TLR4 与 NRDS 发病具有良好相关性,见表 3。

表 3 影响 NRDS 的 Logistic 回归分析

项目	β	s	R	P
TNF- α	1.268	0.298	3.221	0.010
IL-6	1.009	0.546	3.424	0.009
JNK	1.115	0.649	3.226	0.010
NF- κ B	1.269	0.366	3.589	0.008
TLR2	1.002	0.499	-4.598	0.002
TLR3	0.998	0.457	-5.679	0.001
TLR4	0.899	0.389	-6.112	0.001

3 讨论

NRDS 的发生与肺表面活性物质上的蛋白有一定关系。肺表面活性物质是由磷脂、蛋白质和中性脂肪组成,并通过肺泡 II 型细胞合成、贮存及分泌^[8],可以明显降低气道中气液界面的表面张力,防止肺泡和细支气管发生萎陷,并且保持气道的开放状态。SP-A 是一种最先在肺泡 II 型上皮细胞中强烈表

达的蛋白,而且其含量很丰富。此物质的表达与呼吸窘迫综合征的发生有密切关系,相关的报道也表明了肺表面活性物质上 TLRs 的表达影响呼吸窘迫综合征的发生,其严重程度需要进一步考究。TLRs 的表达主要在抗原提呈细胞,以及与先天性免疫相关的中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞有关。

TLRs 是一种类似微生物的病原体侵入机体后就会激活细胞而产生免疫防御的天然免疫受体^[9]。当前 TLR 家族共有 11 个受体,分布于人体的各个器官的细胞中,并对不同的病原体发挥不同免疫防御作用。TLR2 和 TLR4 是代表性受体,当病原体入侵人体,以及天然免疫经 TLR 受体激活就会诱发的炎症反应,TLR2 和 TLR4 在这种免疫反应中具有主导作用^[10]。TLR-2 主要识别革兰阳性细菌膜的结构,对此微生物比较敏感,而 TLR-3 主要参与非感染性 ARDS 的病理反应,对 ARDS 引起的感染不敏感,TLR-4 是与内毒素(LPS)结合的受体,对毒素近期的感染比较敏感^[11]。NRDS 是否也通过 TLR 的信号转导目前还未见报道。但是有研究认为,Toll 样受体与胎龄和窒息、缺血缺氧性脑病、新生儿感染、慢性肺损伤等疾病的发生有关。因此本研究中 TLR2、TLR-3 和 TLR4 随着治疗时间的延长,就会越来越低,也说明患者的病情也逐渐减少。

当机体出现感染或疾病后,TLRs 和配体就会很快结合,并产生信号转导的级联反应,引起转录因子 NF- κ B 和 C-Jun 氨基末端激酶的转录反应,这种反应会诱导促炎症细胞因子的产生,并激活抗微生物发生天然免疫应答^[12],从而达到免疫防御的作用。新生儿由于各种器官发育不完全、不成熟,于是特异的免疫功能就不健全,因此,更容易因为病原体的感染而发生疾病,而目前 NRDS 中 TLRs 的表达情况鲜有报道。对 NRDS 固有的免疫功能如粒细胞、单核巨噬细胞数量和功能进行研究,可以进一步了解该病的发生发展过程中 TLRs、TNF- α 、IL-6 等相关免疫因子的变化,从而更深入的研究 TLRs 与 NRDS 的关系具有重要作用。当患者患病后患者的炎症因子也会升高,通过治疗后 3 d 和 7 d 的 TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 血清学水平与治疗前存在明显差异。

本研究通过对 NRDS 患儿体内外周血免疫细胞相关的 TLRs 信号通路分子的检测进行统计分析,发现血清 TLRs (TLR2~4)、TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 水平与 NRDS 发生具有良好的关系。而且 NRDS 的 TLRs(TLR2-4)、TNF- α 、IL-6、JNK 和 NF- κ B 水平与非 NRDS 存在明显差异。而且在治疗后 3 d 升高,而后下降。可见,NRDS 患者的 Toll 样受体对发病具有重要的作用。通过 Logistic 回归分析可知 Toll 样受体中的 TLR2、TLR3、TLR4 与 NRDS 呈负相关,NRDS 越严重,Toll 样受体中的 TLR2、TLR3、TLR4 就会降低,这也表明 Toll 样受体中的 TLR2、TLR3、TLR4 可以激活机体细胞的免疫功能,从而起到防御作用。

综上所述,对 NRDS 的 Toll 样受体分析可以更好的发现 TLRs/JNK/ NF- κ B/TNF- α 信号通路与 NRDS 的相关性。

参考文献

[1] Monique E, Relana MEN, Lucy K, et al. Comparison of

recruitment manoeuvres in ventilated sheep with acute respiratory distress syndrome[J]. *Lung*, 2013, 191(1): 77-86.

- [2] Elmas AT, Tabel Y, Elmas ON. A serum cystatin C predicts acute kidney injury in preterm neonates with respiratory distress syndrome[J]. *Pediatric Nephrol*, 2013, 28(3):477-484.
- [3] Yilmaz S, Inandiklioglu N, Yildizdas D, et al. Mesenchymal stem cell: does it work in an experimental model with acute respiratory distress syndrome? [J]. *Stem Cell Rev*, 2013, 9(1):80-92.
- [4] Funk DJ, Kumar A. Inhaled nitric oxide in patients with the acute respiratory distress syndrome secondary to the 2009 influenza A (H1N1) infection in Canada[J]. *Can Anaesth Soc J*, 2013, 60(2):212-213.
- [5] Roch A, Hraiech S, Masson E, et al. Outcome of acute respiratory distress syndrome patients treated with extracorporeal membrane oxygenation and brought to a referral center [J]. *Inten Care Med*, 2014, 40(1):74-83.
- [6] 何蓉. 高氧肺损伤新生大鼠肺组织中肺表面活性物质相关蛋白-A(SP-A)的 mRNA 和蛋白表达及布地奈德的干预作用[D]. 苏州:苏州大学,2013.
- [7] Ferranti B, Armanino R, Becce C. L'importanza dei toll-like receptors nei tessuti parodontali. Ruolo delle cellule del parodonto nell'attivazione dell'inflammatione locale in seguito ad aggressione batterica [J]. *Dental Cadmos*, 2014, 82(1):9-28.
- [8] Sinha D, Ghosh AK, Mukherjee S, et al. Antigenic relatedness defines Toll-like receptor 2 is crafted on ligand blueprint[J]. *Immunobiology*, 2014, 219(10):798-801.
- [9] Stribos EGD, Werkhoven MBV, Poppelaars F, et al. Renal expression of Toll-like receptor 2 and 4: Dynamics in human allograft injury and comparison to rodents[J]. *Mol Immunol*, 2014, 64(1):82-89.
- [10] Zhang J, Liu S, Rajendran KV, et al. Pathogen recognition receptors in channel catfish: III Phylogeny and expression analysis of Toll-like receptors[J]. *Dev Comp Immunol*, 2013, 40(2):185-194.
- [11] Jursza E, Kowalewski MP, Boos A, et al. The role of toll-like receptors 2 and 4 in the pathogenesis of feline pyometra [J]. *Theriogenology*, 2014, 83(4):596-603.
- [12] Li Y, Ding JY, Ge BX, et al. Simvastatin attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response of rat pulmonary microvascular endothelial cells by downregulating toll-like receptor 4 expression[J]. *Cent Europ J Med*, 2014, 9(1):133-140.

(收稿日期:2016-03-29 修回日期:2016-05-13)