



外周血单个核细胞TLR4基因表达水平与AS、RA病情活动性的关系分析

钱臣, 徐扬, 蒋逸秋

引用本文:

钱臣,徐扬,蒋逸秋. 外周血单个核细胞TLR4基因表达水平与AS、RA病情活动性的关系分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(2): 180-183.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.02.010>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[血小板参数在判断强直性脊柱炎疾病活动中的价值](#)

The value of the platelet parameters in evaluating the disease activity of ankylosing spondylitis

蚌埠医学院学报. 2018, 43(1): 46-48 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.01.014>

[类风湿关节炎病人外周血中趋化因子受体CXCR4与其配体SDF-1 \$\alpha\$ 的表达研究](#)

Study on the expression of chemokine receptor CXCR4 and its ligand SDF-1 α in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis

蚌埠医学院学报. 2018, 43(12): 1585-1587 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.12.013>

[7关节超声半定量评分评估类风湿关节炎疾病活动度](#)

Value of 7-joint ultrasound semi-quantitative score in the evaluation of rheumatoid arthritis disease activity

蚌埠医学院学报. 2021, 46(9): 1226-1228 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.09.019>

[诱骗受体3在类风湿关节炎病人血清中的表达水平及其临床意义](#)

The expression and clinical significance of serum decoy receptor 3 in patients with rheumatoid arthritis

蚌埠医学院学报. 2017, 42(10): 1330-1332 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.011>

外周血单个核细胞 TLR4 基因表达水平 与 AS、RA 病情活动性的关系分析

钱 臣¹, 徐 扬¹, 蒋逸秋²

[摘要] **目的:** 分析外周血单个核细胞 TOLL 样受体 4 (TLR4) 基因表达与强直性脊柱炎 (AS)、类风湿关节炎 (RA) 病情活动性的相关性。**方法:** 选择 AS、RA 病人各 40 例, 分别为 AS 组、RA 组, 另选取 30 名健康志愿者为对照组。以实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测外周血单核细胞 TLR4 mRNA 表达水平, 并分析其与病情活动性、实验室指标的相关性。**结果:** 外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达水平 AS 组 > RA 组 > 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。AS 组、RA 组中, 活动期病人 TLR4 mRNA 表达水平显著高于稳定期病人 ($P < 0.01$)。Pearson 相关性分析显示, AS 组病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 Bath 强直性脊柱炎病情活动指数 (BASDAI) 评分及血清 ESR、CRP、IL-17 水平呈正相关关系 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与 RF 水平、HLA-B27 阳性率无相关性 ($P > 0.05$); RA 组病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 28 个关节病情活动指数 (DSA28) 积分及血清 ESR、RF、CRP、IL-17 水平呈正相关关系 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。**结论:** AS、RA 病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达明显上调, 且与病情活动性及炎性指标具有相关性。

[关键词] 强直性脊柱炎; 类风湿性关节炎; TOLL 样受体 4

[中图分类号] R 593.2

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.02.010

Association of TLR4 gene expression in peripheral blood mononuclear cells with disease activity of AS and RA

QIAN Chen¹, XU Yang¹, JIANG Yi-qiu²

(1. Department of Orthopaedic, Changzhou Wujin People's Hospital, Changzhou Jiangsu 213002;

2. Department of Sports and Joint, Nanjing First Hospital, Nanjing Jiangsu 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the association of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene expression in peripheral blood mononuclear cells with disease activity of ankylosing spondylitis (AS) and rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** Forty patients with AS (AS group) and 40 patients with RA (RA group) were enrolled. Thirty healthy volunteers were selected as the control group. The expression levels of TLR4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The association of TLR4 with disease activity and laboratory indexes was analyzed. **Results:** The expression of TLR4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of AS group, RA group and control group decreased gradually ($P < 0.01$). In AS group and RA group, TLR4 mRNA expression levels in active stage was significantly higher than those in stable stage ($P < 0.01$). Pearson correlation analysis showed that TLR4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells was positively correlated with Bath ankylosing spondylitis disease activity index score and serum concentrations of ESR, CRP and IL-17 ($P < 0.05$ to

$P < 0.01$), but showed no association with RF concentration and HLA-B27 positive rate ($P > 0.05$); TLR4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with RA was positively correlated with DSA 28 score and serum concentrations of ESR, RF, CRP and IL-17

[收稿日期] 2020-04-30 **[修回日期]** 2021-04-15

[作者单位] 1. 江苏省常州市武进人民医院 骨科, 213002; 2. 江苏省南京市第一医院 运动关节科, 210006

[作者简介] 钱 臣 (1974-), 男, 硕士, 主任医师。

[通信作者] 蒋逸秋, 博士, 副主任医师。E-mail: jyq_3000@163.com

[13] TOKUHISA M, ICHIKAWA Y, KOSAKA N, *et al.* Exosomal miRNAs from peritoneum lavage fluid as potential prognostic biomarkers of peritoneal metastasis in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130472.

[14] ZHENG H, ZHANG F, LIN X, *et al.* MicroRNA-1225-5p inhibits proliferation and metastasis of gastric carcinoma through repressing insulin receptor substrate-1 and activation of beta-catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4647.

[15] 王文剑, 于秀淳. 骨肉瘤预后影响因素的 Meta 分析 [J]. 国际骨科学杂志, 2018, 39(1): 45.

[16] SIMPSON S, DUNNING MD, DE BROT S, *et al.* Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics [J]. *Acta Vet Scand*, 2017, 59(1): 71.

[17] LIU M, YANG P, MAO G, *et al.* Long non-coding RNA MALAT1 as a valuable biomarker for prognosis in osteosarcoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Surg*, 2019, 72(1): 206.

(本文编辑 刘璐)

($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** The expression of TLR4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of AS and RA patients is significantly up-regulated, which is correlated with disease activity and inflammatory indexes.

[**Key words**] ankylosing spondylitis; rheumatoid arthritis; Toll-like receptor 4

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)、类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)均为临床常见的慢性炎性自身免疫性疾病^[1-2],其具体发病机制均尚未阐明。TOLL 样受体 4(TOLL-like receptors 4, TLR4)作为参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,是连接非特异性免疫与特异性免疫的桥梁,既往报道^[3-4]显示其在慢性免疫性炎症疾病如 AS、RA 中扮演重要角色。但 TLR4 在 AS、RA 病人中的表达是否存在差异或与 AS、RA 的临床与实验室指标是否存在相关性尚缺乏明确报道。故本文拟测定 TLR4 基因在 AS、RA 病人中的表达情况及其与病情活动性、有关实验室指标的关系。现作报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 5 月至 2017 年 5 月常州市武进人民医院骨科确诊的 AS、RA 病人各 40 例,分别为 AS 组、RA 组;另选取 30 名同期入院体检的健康志愿者为对照组。AS 组中,男女性别比为 3:2,年龄 28~67(44.92±9.55)岁,体质指数 19~28(24.54±2.27)kg/m²,病程 4~9(6.40±1.54)年;RA 组中,男女性别比为 5:3,年龄 35~70(48.59±10.61)岁,体质指数 19~29(24.66±2.40)kg/m²,病程 2~9(5.86±1.69)年;对照组中,男女性别比为 3:2,年龄 29~65(45.88±9.75)岁,体质指数 19~28(24.39±3.05)kg/m²。3 组性别构成比、年龄、体质指数差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 AS 组和 RA 组对应病程差异均无统计学意义($P > 0.05$)。本次研究经我院医学伦理会审核通过。

1.2 对象纳入及排除标准 纳入标准:(1)性别不限,年龄 18~70 岁;(2)AS、RA 组病人符合相关诊断标准^[5];(3)所有研究对象在知情本实验研究的情况下签署知情同意书。排除标准:(1)合并严重的心肝肺肾等重要脏器功能损伤及血液系统疾病;(2)既往长期服用解痉镇痛类药物、糖皮质激素类药物;(3)合并颈胸段后凸畸形或其他原因导致的关节强直,重叠其他风湿性疾病如系统性红斑狼疮、干燥综合征及严重骨关节炎等;(4)合并有感染、其他自身免疫性疾病、严重糖尿病、高血压及严重肝肾疾病;(5)有精神、心理疾病或妊娠、哺乳期妇女。

1.3 病情评估 AS、RA 病情活动性分别采用 Bath 强直性脊柱炎病情活动指数(Bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASDAI)评分^[6]、28 个关节病情活动指数(disease activity score in 28 joints, DSA28)积分^[7-8]评估,其中 BASDAI 评分≤4 分、>4 分分别为 AS 稳定期、活动期;DAS28 积分 < 2.6 分、≥2.6 分分别为 RA 稳定期、活动期。

1.4 外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 检测 所有对象抽取空腹静脉血 3 mL,肝素抗凝,以 Ficoll 密度梯度离心处理提取单个核细胞,调整细胞数为 5×10^9 个/升,接种于 24 孔细胞培养板后置于 37 °C 培养箱中培养 4 h。取 1 mL 培养后的细胞悬液,以 TRIzol 一步法提取总 mRNA,并逆转录为 cDNA,取等量逆转录产物进行 TLR4 mRNA 荧光定量 PCR 测定。反应条件:94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,30 次循环;72 °C 延伸 5 min 后,4 °C 5 min。引物由大连 Takara 生物公司设计并合成,引物序列:上游 5'-ACT TGG ACC TTT CCA GCA AC-3',下游 5'-TTT AAA TGC ACC TGG TTG GA-3'。取 PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中,120 V 电压电泳 30 min。以 β -actin 与 TLR4 的吸光度比值作为 TLR4 mRNA 的相对表达量。

1.5 实验室指标检测 所有对象另抽取空腹静脉血 3 mL,室温静置 20 min 后进行离心处理,3 000 r/min 离心 20 min,离心半径 15 cm,收集上层血清标本置于 -80 °C 冰箱保存统一待测。采用乳胶凝集试验法测定血清类风湿因子(RF)水平,Western 法测定血清红细胞沉降率(ESR)水平,速率散射比浊法测定 C 反应性蛋白(C-reactive protein, CRP)水平,酶联免疫吸附法测定白介素(Interleukin, IL)-17 水平;另采用流式细胞仪检测人白细胞抗原(HLA)-B27,结果在正常范围(0~20%)内为阴性,否则为阳性。

1.6 统计学方法 采用 t (或 t')检验、 χ^2 检验、方差分析、 q 检验和 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 各组外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 比较 外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达水平比较,AS 组 > RA 组 > 对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)

(见表 1)。

表 1 各组外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TLR4 mRNA
AS 组	40	0.24 ± 0.09
RA 组	40	0.18 ± 0.04**
对照组	30	0.07 ± 0.02***△△
F	—	69.66
P	—	<0.01
MS _{组内}	—	0.003

q 检验:与 AS 组比较 ** $P < 0.01$;与 RA 组比较 △△ $P < 0.01$

2.2 稳定期和活动期病人 TLR4 mRNA 的差异

AS 组病人平均 BASDAI 评分为(5.10 ± 1.85)分,包括稳定期 21 例、活动期 19 例,TLR4 mRNA 分别为

0.19 ± 0.04, 0.26 ± 0.08, 差异有统计学意义($t' = 3.44, P < 0.01$); RA 组病人平均 DSA28 积分为(4.24 ± 0.99)分,包括稳定期 14 例、活动期 26 例, TLR4 mRNA 分别为 0.14 ± 0.03、0.20 ± 0.05, 差异有统计学意义($t = 4.65, P < 0.01$)。

2.3 各组实验室指标检测结果比较 RA 组血清 ESR、RF、CRP、IL-17 水平显著高于 AS 组、对照组($P < 0.01$); AS 组 ESR、CRP、IL-17 水平显著高于对照组($P < 0.01$), RF 与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$); AS 组 HLA-B27 阳性率显著高于 RA 组、对照组; RA 组、对照组 HLA-B27 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

表 2 各组实验室指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	ESR/(mm/h)	RF/(mg/L)	CRP/(mg/L)	IL-17/(ng/L)	HLA-B27 阳性 [n;百分率(%)]
AS 组	40	31.07 ± 7.46	10.06 ± 2.68	32.66 ± 7.35	24.01 ± 5.22	38(95.00)
RA 组	40	44.90 ± 9.75**	89.13 ± 29.06**	39.23 ± 8.12**	31.31 ± 6.02**	1(2.50)**
对照组	30	12.46 ± 3.74***△△	9.42 ± 2.37△△	4.52 ± 1.00***△△	2.49 ± 0.61***△△	0(0.00)**
F	—	153.60	256.87	254.69	320.29	97.44 [#]
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	58.724	311.943	43.994	23.242	—

q 检验:与 AS 组比较 ** $P < 0.01$;与 RA 组比较 △△ $P < 0.01$;#示 χ^2 值

2.4 相关性分析 Pearson 相关性分析显示, AS 组病人中,外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 BASDAI 评分及血清 ESR、CRP、IL-17 水平呈显著正相关关系($P < 0.05 \sim P < 0.01$),与 RF 水平、HLA-B27 阳性率无相关性($P > 0.05$); RA 组病人中,外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 DSA28 积分及血清 ESR、RF、CRP、IL-17 水平呈正相关关系($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 3)。

表 3 AS 及 RA 病人病情活动性相关实验室指标与外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 的相关性分析

指标	AS 组		RA 组	
	r	P	r	P
BASDAI 评分	0.456	<0.01	—	—
DSA28 积分	—	—	0.369	<0.01
ESR	0.336	<0.05	0.536	<0.01
RF	0.220	>0.05	0.601	<0.01
CRP	0.385	<0.01	0.362	<0.01
IL-17	0.401	<0.01	0.320	<0.05
HLA-B27 阳性	0.145	>0.05	—	—

3 讨论

1994 年就已在人体细胞中发现了 TLRs,其分为胞膜外区、胞质区和跨膜区三部分,是天然免疫系统中具有特异性的一类 I 型跨膜受体及病原模式识别受体。既往报道^[9-10]显示, TLRs 可识别并结合外源性或内源性配体,组成复合物后活化 TLR 介导的信号转导通路,诱导细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子及趋化型的细胞因子,发生免疫反应,启动抗微生物防御。TLR4 是人类发现的第一个 TLRs 相关蛋白,最初发现 TLR4 仅于髓源性细胞(如单核巨噬细胞)上表达,随着研究的深入,许多学者发现心脏、呼吸道上皮细胞和软骨细胞也均有 TLR4 的表达^[11]。此后逐渐有报道论证了 TLR4 参与了机体多项病理生理过程,尤其在急性炎症反应、细胞信号转导及细胞凋亡中扮演了重要角色。对于慢性自身免疫性疾病而言, TLR4 在系统性红斑狼疮病人外周血单个核细胞和滑膜组织中表达显著升高,且其疾病的活动性与 TLR4 的上调密切相关。近年来,逐渐有学者^[12-13]发现 TLR4 基因表达与 AS、RA 有关, TLR4 主要表达于细胞膜表面,在滑膜细胞细胞

中也有表达,可引起持续的炎性细胞激活,从而放大滑膜炎,加快 RA^[5] 病情进展。国内研究^[14-16] 中证实 LPS/TLR4 可激活 NF- κ B 信号途径,诱导炎症反应,继而加重 RA,因此 TLR4 主要通过促进机体炎症反应参与 RA 的发生发展。

本研究发现 AS 组、RA 组、对照组外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达水平存在明显差异,AS 组、RA 组活动期病人 TLR4 mRNA 表达水平显著高于稳定期病人,证实了 AS、RA 病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达明显上调,AS 上调尤其显著,并可能与疾病活动性有关。分析原因为,AS 肌腱附着点炎症突出、RA 滑膜组织炎性增生和炎症细胞浸润显著,最终均可引起关节组织结构的破坏与功能障碍,而且 RA 的发生发展与 T 细胞过度活化、B 细胞过度刺激引起的大量自身抗体产生有关。TLR4 具有跨膜信号转导功能,能够同时介导触发髓样细胞分化因子 88 的依赖性与非依赖性途径,导致基因编码的促炎细胞因子和趋化因子的激活。还有学者^[17-19] 认为,AS、RA 病人外周血单个核细胞处于活化状态,通过 TLR4 可启动机体炎症反应,合成和释放炎症因子,最终导致关节组织和骨组织的破坏。此外,肽聚糖、脂磷壁酸、脂多糖等外源性配体可与 TLR4 结合,增强 IL-6、IL-17 等促炎细胞因子和趋化因子在 AS、RA 病人滑膜成纤维细胞和外周血单个核细胞中的表达,继而触发关节软骨的炎症或退化。

本研究结果表明 AS 组病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 BASDAI 评分及血清 ESR、CRP、IL-17 水平正相关,RA 组病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与 DSA28 积分及血清 ESR、RF、CRP、IL-17 水平正相关,提示 AS、RA 病人外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 表达与病情活动性及炎症指标具有相关性。但 TLR4 基因影响 AS、RA 病人病情活动性及炎症反应的具体机制还需进一步深入探讨,相关结论仍需扩大样本量、多中心的研究进一步论证。

[参 考 文 献]

[1] 李渊博,许鹏. 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 与类风湿性关节炎发病的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(8): 1128.

[2] 林海,周林华,黄承宇,等. 肠道菌群失调与骨质疏松症、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎关系的研究进展[J]. 山东医药,2018,58(16):107.

[3] ZAUNER D, QUEHENBERGER F, HERMANN J, *et al.* Whole body hyperthermia treatment increases interleukin 10 and toll-like

receptor 4 expression in patients with ankylosing spondylitis: A pilot study[J]. *Int J Hyperthermia*,2014,30(6):393.

- [4] 王圆圆,姚茹冰,蔡辉. TLR2、TLR4 与类风湿关节炎[J]. 安徽医药,2015,19(6):1021.
- [5] 谢勇,林红晓. FRAX 评估 RA 患者骨质疏松性腰椎骨折风险及相关因素分析[J]. 颈腰痛杂志,2018,39(6):683.
- [6] 李晓龙,苏振炎,张益宏,等. 注射用重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白联合沙利度胺对强直性脊柱炎患者血清炎症因子的影响[J]. 颈腰痛杂志,2020,41(3):321.
- [7] 周凌,宋婧,陈凌,等. 血清基质金属蛋白酶-3 和 7 个关节超声评分在类风湿关节炎病情活动性评估中的应用[J]. 中华内科杂志,2016,55(7):531.
- [8] 陈栋,孙伟. 重组人 II 型肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白对强直性脊柱炎患者疗效及炎症因子、脊柱活动度的影响[J]. 颈腰痛杂志,2019,40(2):145.
- [9] 俞银贤,陈金伟,阮琪,等. TLR4/NF- κ B 在国人膝关节 OA 关节软骨中表达的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究,2015,12(4):4.
- [10] OUDE NIJHUIS CS, VELLENGA E, DAENEN SM, *et al.* Endothelial cells are main producers of interleukin 8 through toll-like receptor 2 and 4 signaling during bacterial infection in leukopenic cancer patients[J]. *Clini Diagn Lab Immunol*,2015,10(4):558.
- [11] KIM DH, CHOI E, LEE JS, *et al.* House dust mite allergen regulates constitutive apoptosis of normal and asthmatic neutrophils via toll-like receptor 4 [J]. *PLoS One*,2015,10(5): e0125983.
- [12] 李朝顶,许杰,王喜安,等. TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎关系的 Meta 分析[J]. 中华全科医学,2017,15(11):1967.
- [13] 陈利锋,刘辉,王华松,等. 复方芩芎颗粒治疗类风湿性关节炎的机制[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(20):2024.
- [14] 郝喆,倪娟,王欢. IL-38 抑制 LPS/TLR4 诱导炎症减轻类风湿性关节炎的机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(11):1647.
- [15] 董小君,王永辉,侯渊,等. 风湿宁对风寒湿痹证 CIA 大鼠模型滑膜组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(10):123.
- [16] 燕丽君,佟胜全,刘静,等. 芍药总苷介导 TLR4/NF- κ B 信号通路对类风湿关节炎模型大鼠的治疗作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2021,47(2):390.
- [17] 王卫远,李俊芳,李志军,等. 强直性脊柱炎患者外周血单核细胞 TLR2 和 TLR4 表达及其临床价值[J]. 西部医学,2015,27(11):1653.
- [18] 蔡辉,张群燕,姚茹冰. 脂多糖对类风湿关节炎患者外周血单核细胞 TLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白表达的影响[J]. 贵州医科大学学报,2017,42(1):68.
- [19] 陈曾凤,陈勇,兰培敏. 羌防归芍汤对急性期类风湿关节炎患者外周血单核细胞 TLR4、TRAF6、IL-1 β 表达的影响[J]. 中国中医急症,2018,27(1):27.