

# 强直性脊柱炎患者外周血 单个核细胞中 Toll 样受体表达及功能的研究\*

王 森,高 硕,徐学静,王 贤,丁 海,陈军浩

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,南京 210008)

**摘要:**目的 研究强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 Toll 样受体(toll like receptors, TLRs)的表达及功能,并探讨 TLRs 在 AS 发病中的作用。方法 通过荧光定量 PCR 的方法检测 21 例 AS 患者及 21 例健康对照者 PBMCs 上 TLR1~TLR10 的表达;采用 ELISA 的方法检测 AS 患者及健康对照者 PBMCs 中 TLRs 介导的细胞因子产生水平,并检测患者及健康对照血浆中细胞因子的水平。结果 与对照组相比,AS 患者组 PBMCs 中 TLR4 的表达水平显著升高,差异具有统计学意义( $P=0.004$ ),其他 TLRs 在两组间的表达差异无统计学意义;AS 患者 PBMCs 中 TLR4 介导的肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 6(IL-6)的产生水平显著增高( $P$  值分别为 0.003 和 0.009);AS 患者血浆中 TNF- $\alpha$  的表达水平较健康对照组显著升高( $P=0.021$ )。结论 AS 患者 PBMCs 中 TLR4 的表达及细胞因子产生能力增强,TLR4 通路可能在 AS 发病过程中起重要作用。

**关键词:**强直性脊柱炎;Toll 样受体 4;肿瘤坏死因子  $\alpha$

中图分类号:R593.23;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)02-060-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.018

## Expression Profiles and Function of Toll-like Receptors in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Ankylosing Spondylitis Patients

WANG Sen,GAO Shuo,XU Xue-jing,WANG Xian,DING Hai,CHEN Jun-hao

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital,  
the Medicine School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Objective To study the expression profiles and function of Toll Like Receptors (TLRs) in peripheral blood mononuclear cells of ankylosing spondylitis (AS) patients, and investigate their function in pathogenesis of AS. **Methods** Quantitative analysis of TLR1-10 mRNA expression in PBMCs from 21 AS patients and 21 healthy controls by RT-qPCR. Investigated the ability of PBMCs from AS patients and healthy controls to produce cytokines in response to TLRs by ELISA, and also using ELISA to test the cytokine levels in the plasma of AS patients and healthy controls. **Results** The expression of TLR4 in PBMCs was significantly increased in AS patients compared to healthy donors ( $P=0.004$ ), and there was no statistical significance for other TLRs expression between the two groups. After challenge with TLR4 ligands, significantly higher level of TNF- $\alpha$  and IL-6 production from PBMCs of AS patients were observed, compared with those from healthy donors ( $P=0.003, 0.009$ ). Also found that the level of TNF- $\alpha$  in plasma of AS patients was higher than healthy donors ( $P=0.021$ ). **Conclusion** Study reveals the expression and function of TLR4 in PBMCs of AS patients was higher than healthy controls, which means that TLR4 pathway may play an important role in pathogenesis of AS.

**Keywords:** ankylosing spondylitis (AS); TLR4; TNF- $\alpha$

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种原因尚不明确的慢性自身免疫性疾病,主要侵犯骶髂关节、脊柱骨突、脊柱旁软组织及外周关节,并可并发关节外表现。AS 在我国的患病率约为 0.3%,男性多于女性,发病年龄通常在 13~31 岁<sup>[1]</sup>。Toll 样受体(toll like receptors, TLRs)是一种典型的模式识别受体,TLRs 激活后通过细胞内的信号转导,诱导特异性的基因表达,分泌细胞因

子和趋化因子。已有研究表明 TLRs 过度激活与自身免疫病的发生及发展有密切的关系<sup>[2]</sup>,但 TLRs 在 AS 患者中的表达及功能还不明确。为此,本研究系统检测了 AS 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)上 TLR1~TLR10 的表达水平及患者体内的细胞因子水平,现报告如下。

### 1 材料与方法

\* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助。

作者简介:王 森(1985-),男,博士,主管技师,主要从事免疫学研究,E-mail:slzw1985@163.com。

通讯作者:陈军浩,主任技师,E-mail:nj\_cjh@yahoo.com.cn。

1.1 研究对象 AS患者来源于南京鼓楼医院风湿免疫科及脊柱外科,诊断符合1984年修订的纽约诊断标准。AS患者共21例,男性19例,女性2例,平均年龄36.1岁,HLA-B27均为阳性。对照组为21例本院健康志愿者,男性19例,女性2例,平均年龄36.3岁。两组性别、年龄之间差异无统计学意义。

1.2 试剂及仪器 Trizol等RNA抽提试剂(国药集团化学试剂有限公司);cDNA合成及定量PCR试剂盒(天根生化科技有限公司);人淋巴细胞分离液(国药集团化学试剂有限公司);TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 ELISA试剂盒(BD公司)。定量PCR仪器(Stratagene Mx3005);酶标仪(Bio-Rad IMark)。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs的分离:收集患者及健康对照新鲜外周血1ml,3000 r/min离心5min,吸出上层血浆标记,-80℃保存备用。剩余细胞加入等体积PBS混匀,缓慢铺于含1ml Ficoll的流式管中,配平后2300 r/min离心20min,小心吸出中间层细胞,PBS洗涤两遍后进行细胞计数,调整细胞浓度至 $1.5 \times 10^6$ 个/ml,加入1ml含10g/dl DMSO的FBS中,放入程序性降温盒置于-80℃冰箱24h后转移至液氮中备用。

1.3.2 RNA抽提、逆转录及定量PCR:使用300  $\mu$ l Trizol裂解细胞,然后加入50  $\mu$ l 氯仿,混匀后室温静置10min,4℃ 12000 r/min离心15min,将离心后的上清小心转移至新的离心管中。加入等体积异丙醇,4℃ 12000 r/min离心15min,小心去除上清,每管加入300  $\mu$ l 预冷的75 ml/dl 乙醇(DEPC水稀释),12000 r/min离心10min。弃上清,瞬时离心后小枪头吸净残液,室温干燥10min。每管加10  $\mu$ l DEPC水溶解RNA,置于65℃金属浴锅,5min后放于冰上,按说明配置逆转录Mix,37℃条件下进行15min的逆转录反应,然后在98℃条件下进行5min的酶失活反应。按说明配置定量PCR Mix,引物信息见表1,样本添加完成后上机,设置程序,先按95℃ 15min,接着按95℃ 5s,60℃ 20s,72℃ 20s,进行40个循环,扩增循环结束后,进行熔解曲线检测。

1.3.3 ELISA检测细胞因子水平:使用包被缓冲液按1:250的比例稀释包被抗体,计算所需孔数,在Corning板中每孔加入100  $\mu$ l 包被液,4℃ 孵育过夜。甩掉包被液,每孔加入300  $\mu$ l PBST洗涤3次,每孔加入200  $\mu$ l 样本稀释液,室温封闭1h。准备待测样本及标准品,按说明书溶解及稀释标准品。甩掉封闭液,洗涤3次后每孔添加100  $\mu$ l 样

本、标准品及阴性对照,封板并室温孵育2h。洗涤5次,每孔加入100  $\mu$ l 稀释的Detection及100  $\mu$ l 稀释的HRP,室温孵育1h。甩去工作液,洗涤7次后,每孔加入100  $\mu$ l 显色液,室温避光孵育15min,观察显色情况,每孔加入100  $\mu$ l 终止液。放入酶标仪,使用波长450nm读取A值。

表1 引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
TLR1-for	TTCACAGTGTCTGGTACACGCAT	101
TLR1-rev	ACCGTGTCTGTTAAGAGATTATTGGA	
TLR2-for	GCCTCTCCAAGGAAGAATCC	144
TLR2-rev	TCCTGTGTGGACAGGTCA	
TLR3-for	ACAACCTAGCACGGCTCTGGA	124
TLR3-rev	ACCTCAACTGGGATCTCGTCA	
TLR4-for	AATCTAGAGCACTTGGACCTTTCC	116
TLR4-rev	GGGTTACGGGACAGGTCTAAAGA	
TLR5-for	CCATAGATTTTTCTCCAACCAATA	141
TLR5-rev	TCATACATTTTCCCAGTCCACT	
TLR6-for	CATCTATTGTGAGTTTCAGGCAT	121
TLR6-rev	GCTTCATAGCACTCAATCCCAAG	
TLR7-for	GGAGGTATTTCCACGAACACC	141
TLR7-rev	TGACCCAGTGGAAATAGGTACAC	
TLR8-for	AAACTTGACCCAACCTCGATACCTAA	101
TLR8-rev	GATCCAGCACCTTCAGATGAGG	
TLR9-for	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA	151
TLR9-rev	AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT	
TLR10-for	AAGAAAGTTCCTCCGAGACTT	131
TLR10-rev	TGTTATGGCATAGAATCAAACTCTCA	
GAPDH-for	GGTATCGTGAAGGACTCATGAC	188
GAPDH-rev	ATGCCAGTGAGCTCCCGTTCAGC	

1.4 统计学分析 患者组与对照组之间差异比较用Student's *t* 检验。当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义,图中用“\*”标示;当 $P < 0.01$ 时为差异有统计学非常显著性意义,图中用“\*\*”标示。统计学分析及作图使用GraphPad Prism5软件完成。

2 结果

2.1 AS患者外周血PBMCs中TLRs的表达情况 见图1。

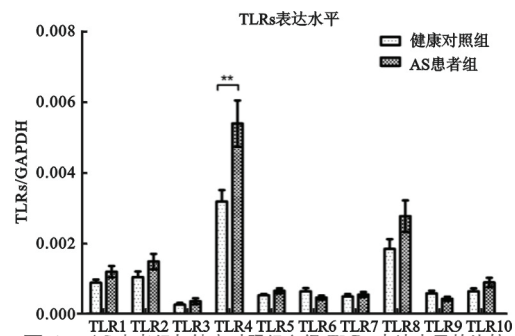


图1 AS患者组与健康对照组之间TLRs表达水平的比较

本研究使用定量 PCR 的方法检测了 21 例 AS 患者 PBMCs 中 TLR1~TLR10 的表达情况,发现与对照组相比只有 TLR4 的表达有显著增高,两组之间差异有统计学意义( $P=0.004$ ),而其他 TLRs 的表达在两组之间差异无统计学意义。

2.2 AS 患者外周血 PBMCs 中 TLR4 介导的细胞因子产生水平增高 见图 2A。由于 AS 患者 PBMCs 中 TLR4 的表达升高,本研究同时检测了

TLR4 介导的细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 和 IL-10 的产生情况,发现在 TLR4 配体 LPS 激活 PBMCs 的情况下,患者组 PBMCs 中 TNF- $\alpha$  产生水平显著高于对照组,两组之间差异有统计学意义( $P=0.003$ )。与对照组相比,AS 患者组 IL-6 的产生水平也显著高于对照组,两组之间差异有统计学意义( $P=0.009$ ),见图 2B。而 IL-12 和 IL-10 的产生水平在两组之间的差异无统计学意义。

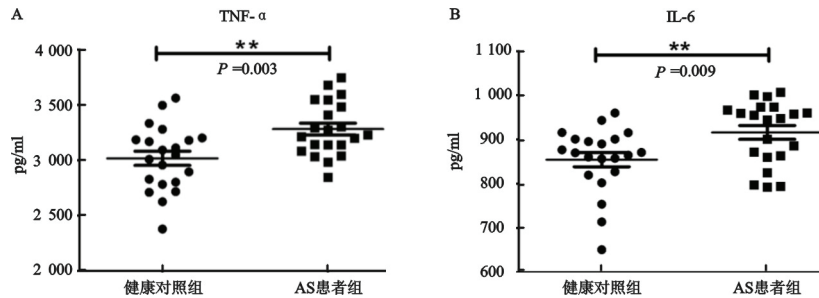


图2 AS患者组与健康对照组之间 TLR4 介导的细胞因子产生水平比较

2.3 AS 患者血浆中细胞因子的表达水平 本研究还使用 ELISA 的方法检测了 AS 患者组和健康对照组血浆中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 和 IL-12 的水平,发现 TNF- $\alpha$  的表达水平在患者组明显升高,两组之间差异有统计学意义( $P=0.021$ ),见图 3,其他三种细胞因子低于检测下限。

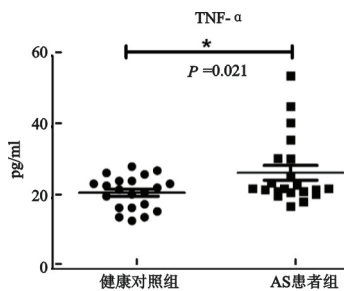


图3 AS患者组与健康对照组血浆中细胞因子的表达水平

3 讨论 AS 是以骶髂关节和脊柱附着点慢性炎症为主要症状的疾病,与 HLA-B27 呈强相关,属于自身免疫性疾病,可引起葡萄膜炎等关节外症状<sup>[3]</sup>。研究表明 TLRs 与自身免疫病的发生及发展有密切的关联,如系统性红斑狼疮及类风湿性关节炎患者 TLRs 的表达与功能异常,但 TLRs 在 AS 患者发病过程中作用方式及机制仍不明确。本研究系统检测了 AS 患者 PBMCs 中 TLR1~TLR10 的表达,发现与健康对照相比,TLR4 表达有明显上调。进一步检测 TLR4 的功能,发现在 TLR4 配体 LPS 激活的情况下,AS 患者 PBMCs 中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的产生显著增高。本研究还检测了患者血浆中细胞因子的表达情况,发现与健康

对照相比患者血浆中 TNF- $\alpha$  的表达上调。

毋静等<sup>[4]</sup>人检测发现 TLR2, TLR4 在 AS 患者 PBMCs 中表达高于健康对照,本研究也发现 TLR4 的表达显著高于健康对照,TLR2 的表达有上升趋势,但没有统计学差异,两者之间的不同可能是由于纳入的样本都有限所致。与之相比本研究全面的检测了 TLR1~TLR10 的表达,并从中发现 TLR4 在 AS 患者 PBMCs 中上调最为显著。苏虹等<sup>[5]</sup>人研究了 AS 患者 TLR4 的表达及血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-12 的表达,发现 TLR4 mRNA 表达高于正常对照,但 TNF- $\alpha$  水平无明显变化。与之不同的是本研究发现患者血清中 TNF- $\alpha$  表达明显上升,这与其他国内外的研究结果相符<sup>[6~8]</sup>,并且本研究还发现了 PBMCs 中 TLR4 介导的 TNF- $\alpha$  产生水平增高。另外本研究也分析了 TLR4 的表达与患者 C 反应蛋白、血细胞沉降率之间的关系,但未见有明显相关性。由于本研究纳入标本有限,患者中 HLA-B27 均为阳性,且大多数为男性,无法比较 HLA-B27 阳性和阴性之间、不同性别之间 TLR4 的表达及功能是本研究的一个局限。

TNF- $\alpha$  是一种典型的炎性细胞因子,主要由单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞产生。在机体受到感染、损伤等刺激时,适度的 TNF- $\alpha$  升高可以调节免疫功能、杀伤靶细胞,从而对机体起到保护作用。但过量的 TNF- $\alpha$  被认为参与系统性红斑狼疮、AS 等多种自身免疫性疾病的发生发展<sup>[9,10]</sup>。本研究中发现 AS 患者血浆及 PBMCs 中 TLR4 介导的 TNF- $\alpha$  增高,这也再次证明了 TNF- $\alpha$  的升高与 AS 相关。同时本研究也发现 (下转 67 页)

- MCH[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(4): 40-42.
- [13] 李珍, 李从荣, 蔡璇, 等. 武汉地区泌尿道感染病原菌的分布及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 135-137.  
Li Z, Li CR, Cai X, et al. Analysis of clinical distribution and drug resistance of pathogen in urinary tract infections in Wuhan[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(5): 135-137.
- [14] Bert F, Larroque B, Paugam-Burtz C, et al. Pretransplant fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and infection after liver transplant, France[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(6): 908-916.
- [15] Kang CI, Wi YM, Lee MY, et al. Epidemiology and risk factors of community onset infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 312-317.

收稿日期: 2015-03-30

修回日期: 2015-12-31

(上接 62 页)患者 PBMCs 中 TLR4 介导的 IL-6 的产生增多, 目前已有 TNF- $\alpha$  的拮抗剂应用于临床治疗 AS<sup>[11]</sup>, 本研究提示抑制 IL-6 也是治疗 AS 的一种策略。另外本研究还提示表明血浆中过量的 TNF- $\alpha$  主要由 TLR4 介导产生, 因此 TLR4 也是治疗 AS 的一个重要靶点; 与直接拮抗 TNF- $\alpha$  相比, 从信号通路的更上游直接抑制 TLR4 的表达可能会取得更好的效果。

综上所述, 本研究系统检测了不同 TLRs 在 AS 患者 PBMCs 中的表达情况, 发现 TLR4 表达上调, 同时 TLR4 介导的炎性细胞因子产生水平增加, 另外患者血浆中 TNF- $\alpha$  水平也升高, 这些结果都表明 TLR4 信号通路在 AS 发病中起重要作用。本研究进一步加深对 AS 发病机制的认识, 并为寻找新的 AS 的治疗靶点及治疗药物提供理论及实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 强直性脊柱炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(8): 557-559.  
Chinese Rheumatology Association. Guide for the diagnosis and treatment of Ankylosing Spondylitis[J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2010, 14(8): 557-559.
- [2] Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal [J]. J Autoimmun, 2007, 29(4): 310-318.
- [3] Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, et al. Ankylosing spondylitis: an overview[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(Suppl 3): 8-18.
- [4] 毋静, 于清宏, 曲源, 等. TLR-2, TLR-4 在强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞中的表达及其临床意义[J]. 新医学, 2011, 42(3): 166-169.  
Wu J, Yu QH, Qu Y, et al. Expression and significance of Toll like receptor 2 and Toll like receptor 4 in the peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis[J]. New Medicine, 2011, 42(3): 166-169.
- [5] 苏虹, 常微微, 徐胜前, 等. 强直性脊柱炎患者 Toll 样受体 4 表达和 sTRAIL, TNF- $\alpha$ , IL-12 水平的研究[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(4): 302-305.  
Su H, Chang WW, Xu SQ, et al. Study on the Relationship between Ankylosing Spondylitis and Toll-like receptor 4, soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2010, 12(4): 302-305.
- [6] 张璐, 邹红云, 余伍忠, 等. 强直性脊柱炎患者 TNF- $\alpha$  表达水平测定分析[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4): 589-592.  
Zhang L, Zou HY, Yu WZ, et al. The expression of TNF- $\alpha$  testing and analysis in the patients with Ankylosing Spondylitis[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2014, 18(4): 589-592.
- [7] 林宁, 林新, 邓之奎. 强直性脊柱炎患者血清基质金属蛋白酶-3, TNF- $\alpha$ , IL-15, CRP 水平及意义的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5): 55-57.  
Lin N, Lin X, Deng ZK. Significance of serum matrix metalloproteinase-3, TNF- $\alpha$ , IL-15 and CRP level in patients with Ankylosing Spondylitis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2007, 22(5): 55-57.
- [8] Sezer U, Erciyas K, Pehlivan Y, et al. Serum cytokine levels and periodontal parameters in Ankylosing Spondylitis[J]. J Periodontal Res, 2012, 47(3): 396-401.
- [9] Postal M, Appenzeller S. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. Cytokine, 2011, 56(3): 537-543.
- [10] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease [J]. J Pathol, 2008, 214(2): 149-160.
- [11] Arends S, Spoorenberg A, Brouwer E, et al. Clinical studies on bone-related outcome and the effect of TNF-alpha blocking therapy in Ankylosing Spondylitis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(3): 259-268.

收稿日期: 2016-01-07

修回日期: 2016-02-01