临床研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1241-04

Toll 样受体 4 在小儿扩张型心肌病外周血单核细胞的表达及临床意义初探

谢盛慧,钟家蓉,张 静,李 欣
(重庆医科大学附属儿童医院心内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察扩张型心肌病(Dilated cardiomyopathy,DCM)患儿外周血单核细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)表达情况,初步探讨 TLR4 在小儿扩张型心肌病发病中的作用,为临床治疗小儿扩张型心肌病提供新的思路。方法:应用流式细胞术检测 18 例扩张型心肌病患儿及 17 例健康小儿外周血单核细胞 TLR4 的表达水平。结果:DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4 的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity ,MFI)明显高于健康小儿[(34.67 ± 7.61)vs(22.62 ± 4.28),$P<0.01$],并且 MFI 的高低与心衰程度相关,在心功能Ⅲ/Ⅳ级的 DCM 患儿表达明显高于心功能Ⅰ/Ⅱ级患儿,增高的程度与患儿左室射血分数(Left ventricular ejection fraction,LVEF)的值呈负相关,与心胸比例成正相关。结论:TLR4 与小儿 DCM 的发病有关,且与心脏大小和心功能衰竭有关。

【关键词】小儿;扩张型心肌病;Toll 样受体 4;流式细胞术
【中国图书分类法分类号】R725.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-30

Study on the expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood monocytes in children with dilated cardiomyopathy and its clinical significance

XIE Sheng-hui, et al
(*Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To provide a new way for the management of children with dilated cardiomyopathy (DCM), by observing the expression of Toll-like receptor 4(TLR4)in peripheral blood monocytes in children with DCM , and exploring the role of TLR4 in children with DCM. *Methods*: Expression of TLR4 in peripheral blood monocytes from 17 controls, and 18 children with DCM was compared with the use of flow cytometry. *Results*: The mean fluorescence intensity (MFI)of TLR4 in peripheral blood monocytes was significantly higher in children with DCM compared to controls((34.67 ± 7.61)vs (22.62 ± 4.28), $P<0.01$).Moreover, the MFI levels were correlated with the severity of heart failure , and the MFI of DCM with functional class Ⅲ/Ⅳ heart failure was obviously higher than that with functional

作者介绍:谢盛慧(1983-),女,硕士,研究方向:小儿心肌病。
通讯作者:钟家蓉,女,教授,E-mail:zhongjiarongcq@163.com。

信。同时,可在多水平模型的固定或随机部分引入任何水平上测量到的解释变量,使得研究者能够探讨各水平单位的特征对反应变量的影响,以及对反应变量在高水平单位甚至是低水平单位之间变异的影响。

本资料通过两水平 Logistic 回归分析显示出城市 15 岁及以上居民 2 周患病在街道水平上具有聚集性,如果能得到街道的相关变量,可以分析这些变量对街道级随机效应的解释作用,其结果可以为街道级 2 周患病率的干预工作提供理论依据,并对这些 2 周患病特别高和特别低的街道进行对比分析,为进一步干预提供依据。

参 考 文 献

[1] Goldstein H 著,李晓松译.多水平统计模型[M].第 2 版.成都:四川科学技术出版社,1999.2-48,115-117,131.
[2] J Rasbash J, Browne W, Goldstein H, et al.A user's guide to MLwiN [M](Version 2.1d).Centre for multilevel modeling institute of education University of London, 2002.7.
[3] 李晓松,倪宗瓒.对医学领域层次结构数据拟合线性回归模型时几个问题的探讨[J].华西医大学报,1999,30(1):59-62.
[4] 苟 莉,张菊英,王 敏.多水平统计模型在毒理实验研究中的应用[J].中国卫生统计,2002,19(6):371-372.
[5] 吴晓云,曾 庆,周燕荣.多水平模型最新进展[J].数理医药学杂志,2003,16(2):152-154.
[6] 李新华,张 伟,夏梓红.学龄前集体儿童行为问题影响因素的多水平模型[J].贵阳医学院学报,2006,31(1):38-42.
[7] 高 霞,张菊英,王 敏.四川省城市居民慢性病患病率及影响因素分析[J].现代预防医学,2007,34(20):3821-3822,3827.

(责任编辑:冉明会)

class Ⅰ/Ⅱ. Negative correlation was observed between TLR4 expression and left ventricular ejection fraction; and positive correlation was observed between TLR4 expression and cardiothoracic ratio. *Conclusion*: TLR4 is related to the pathogenesis of DCM, so as the heart size and heart failure.

【Key words】Children; Dilated cardiomyopathy; Toll-like receptor4; Flow cytometry

扩张型心肌病(Dilated cardiomyopathy, DCM)发病与病毒感染和自身免疫相关性得到公认，但其具体发病机制尚不清。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是 Toll 样受体家族的成员之一，是一种介导天然免疫反应的跨膜蛋白，是联系天然免疫与获得性免疫的桥梁。近年研究发现 TLR4 在一部分心脏疾病的发病中发挥着一定的作用，但 TLR4 与 DCM 发病的相关性研究很少，在国外仅见少量关于成人的报道，在国内未见任何报道。本文应用流式细胞术检测 DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4 的表达水平，探讨其与 DCM 发病、心脏大小和心衰程度的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 4～12 月本院收住 DCM 患儿 18 例。男 7 例，女 11 例；年龄 2 个月～13 岁，其中心功能Ⅰ级 1 例，心功能Ⅱ级 9 例，心功能Ⅲ级 6 例，心功能Ⅳ级 2 例。均符合 1995 年 WHO/ISFC 制定的诊断标准及全国小儿心肌炎协作组有关小儿 DCM 的诊断参考标准。通过详细的体格检查，超声心动图、心电图及胸片等排除先天性心脏血管病(如主动脉缩窄、主动脉闭锁等)、风湿性心脏瓣膜病、心内膜炎或心包炎等引起的心肌疾病，及其它自身免疫性疾病、恶性肿瘤、感染性疾病。所有 DCM 患儿近 2 个月内未服用类固醇激素、免疫抑制剂等药物。另取 17 例健康小儿作为对照组，均为本院健康体检者，无免疫性疾病及系统性疾病，排除有病毒、细菌等感染或其它重大疾病。DCM 患儿与健康对照组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 检测方法

流式细胞检测仪检测采用藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)交联的 CD14 单克隆抗体标定单核细胞，异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)交联的鼠抗人 TLR4 单克隆抗体检测 TLR4 表达，阴性对照采用与 FITC 交联鼠 IgG2a 抗体。具体按说明书方法进行。具体如下：FITC 交联的鼠抗人 TLR4 抗体及阴性对照，各与 100 μl 全血在室温黑暗处孵育 20 min 后，与适量的红细胞裂解液混合，然后用含牛血清白蛋白和叠氮化钠的去污液洗涤 2 次，用 500 μl 去污液重悬细胞后上流式细胞仪检测。测定单核细胞 TLR4 的平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)。

1.3 统计学分析

统计学处理利用 SPSS11.5 统计软件包进行分析，组间比较用独立样本的 t 检验，计数资料用 χ^2 检验。相关性分析采用 Pearson 法计算相关系数，并进行相关系数的假设检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象的临床资料和实验结果，见表 1、2

2.2 DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4 的表达

DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4MFI 较健康小儿显著增高($P<0.05$)，结果见表 3。

2.3 DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4 的表达与心胸比例

其水平与患儿心胸比例成正相关(r 值为 0.623, $P<0.01$)，见图 1。

2.4 DCM 患儿外周血单核细胞 TLR4 的表达与心衰程度

其水平与患儿 LVEF 的值呈负相关(r 值为 -0.503, $P<0.05$)，见图 2；且在心功能Ⅲ/Ⅳ级的 DCM 患儿的表达明显高于心功能Ⅰ/Ⅱ级患儿($P<0.05$)，见表 3。

3 讨 论

DCM 的发病机制复杂，学说不一，但过度的炎症免疫反应存在 DCM 中，此已成共识。大量的实验研究显示，DCM 发病与病毒感染和感染后的自身免疫损害关系密切。Toll 样受体家族是近年来新发现的连接天然抗病原体反应和适应性免疫的最重要的分子之一，而研究最早也是最多的成员 TLR4 是革兰阴性菌的受体，识别革兰阴性菌脂多糖并开始向胞内传导信号，经过信号级联反应，激活一系列的转录因子，最终诱导调节多种细胞因子基因的转录[1]。

近来，有关 TLR4 及其介导的信号途径在心血管疾病发病中的作用受到关注。在缺血再灌注损伤和心肌梗塞鼠模型中，TLR4 缺陷鼠与对照组比较，前者的心肌细胞死亡明显减少、心肌间质纤维化和心肌肥厚的程度降低，心功能改善，并且血清中炎性细胞因子如 TNF-α、IL-1 等水平降低[2-5]。Meng 等[6]发现，在 TLR4 变异体鼠的血浆和心肌组织中，TNF-α 水平明显降低，心肌因出血性休克受到抑制的程度也明显减轻，可见 TLR4 可能通过有心脏抑制作用的 TNF-α 参与 DCM 的发病。高血压大鼠左室重构时心肌组织 TLR4 的表达明显增高，提示 TLR4 可能参与高血压左室重构的发生发展[7]。急性冠脉综合征患者的外周血单核细胞 TLR4 的表达上调，表明 TLR4 与其发病有一定的相关性[8,9]。以上研究提示，TLR4

表 1 健康小儿组临床资料和 TLR4MFI 值

病例	性别	年龄(月)	LVEF	心胸比	TLR4MFI
1	女	24	70%	0.56	28.01
2	男	48	61%	0.53	20.46
3	女	3	74%	0.55	26.79
4	女	25	69%	0.53	21.40
5	女	36	71%	0.50	20.89
6	男	3	72%	0.55	16.81
7	女	144	65%	0.49	18.27
8	女	120	70%	0.48	25.36
9	男	61	71%	0.53	17.89
10	女	24	68%	0.54	31.2
11	女	11	69%	0.55	24.88
12	女	7	70%	0.54	17.69
13	男	5	72%	0.56	26.21
14	男	13	67%	0.55	21.58
15	女	13	70%	0.54	21.72
16	男	108	66%	0.49	22.92
17	男	37	75%	0.53	16.40

表 2 DCM 组临床资料和 TLR4MFI 值

病例	性别	年龄(月)	病史时间	LVEF	心功能	心胸比	TLR4MFI
1	男	4	7 d	52%	Ⅰ	0.57	16.29
2	女	72	20+ d	45%	Ⅱ	0.71	30.01
3	女	2	15 d	45%	Ⅱ	0.73	42.23
4	男	59	10+ 月	45%	Ⅱ	0.60	23.71
5	男	73	1 月	30%	Ⅱ	0.67	32.10
6	女	31	1+ 年	39%	Ⅱ	0.60	41.95
7	女	91	5 d	46%	Ⅱ	0.65	29.03
8	女	25	2+ 月	46%	Ⅱ	0.73	34.20
9	女	37	2+ 月	47%	Ⅱ	0.69	35.88
10	男	106	5+ 年	46%	Ⅱ	0.53	27.00
11	女	6	10 d	34%	Ⅲ	0.69	34.05
12	女	29	20+ d	39%	Ⅲ	0.70	41.18
13	男	12	10 d	30%	Ⅳ	0.78	44.45
14	女	39	3+ 月	44%	Ⅲ	0.77	44.24
15	女	156	1+ 年	28%	Ⅲ	0.68	39.51
16	女	51	1+ 月	30%	Ⅳ	0.77	38.37
17	男	37	2+ 年	40%	Ⅲ	0.58	38.67
18	男	22	1+ 月	38%	Ⅲ	0.65	31.20

表 3 各组病例外周血单核细胞 TLR4 表达

组别	例数	TLR4MFI
健康小儿组	17	22.62 ± 4.28
DCM 组	18	34.67 ± 7.61*
DCM 组(Ⅰ/Ⅱ)	10	31.24 ± 7.97
DCM 组(Ⅲ/Ⅳ)	8	38.96 ± 4.60▲

注:* 表示 DCM 组与健康小儿比较,$P<0.01$▲ 表示 DCM 组(Ⅲ/Ⅳ)与 DCM 组(Ⅰ/Ⅱ)比较,$P<0.05$

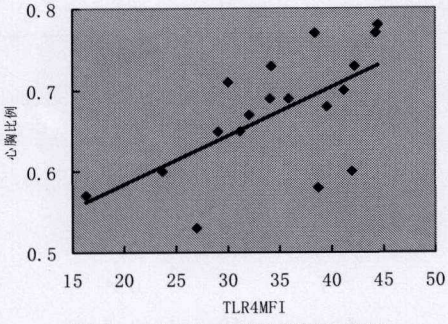


图 1 TLR4 与心胸比例相关分析

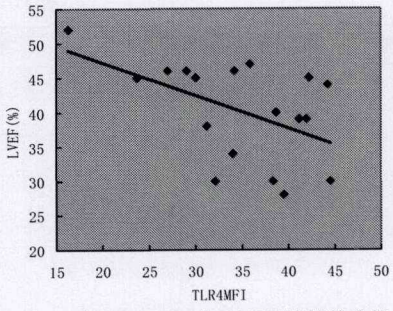


图 2 TLR4 与 LVEF 值相关分析

在心血管疾病的发生和发展中发挥着一定作用,且 TLR4 参与心肌肥厚发展过程。也有实验结果显示,TLR4 在系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、慢性活动性肝炎、溃疡性结肠炎等自身免疫性疾病患者中的表达上调。因此,同样有自身免疫机制参与的 DCM 发病是否也与 TLR4 有关则成为关注的焦点。近年 Saton 等[10,11]报道,在 DCM 成年患者心内膜上 TLR4mRNA 表达增高,提示 TLR4 信号传导途径与心肌病的发病相关。Foldes[12]发现在 DCM 成年患者中,心衰程度越重、外周血单核细胞 TLR4 表达水平越高,证实 TLR4 参与成人 DCM 发病,且与心力衰竭程度相关。

本研究采用流式细胞术, 检测 18 例 DCM 患儿及 17 名健康小儿外周血单核细胞 TLR4 表达水平。结果显示,DCM 患儿 TLR4 表达水平较健康小儿明显升高,且其水平高低与患儿心脏大小及心衰程度密切相关,即心脏越大、心衰越重,TLR4 表达越高。本文说明 TLR4 参与小儿 DCM 发病,且与心脏大小和心衰程度相关。我们推测 TLR4 可能是通过识别 DCM 患儿机体内的病毒相关蛋白和(或)病原微生物产物,使其信号途径激活,产生炎症细胞因子,作用于心脏。

本研究结果初步提示 TLR4 参与小儿 DCM 的发病。但是 TLR4 在 DCM 中究竟起到何作用,是否通过 TLR4 介导的信号转导途径的激活,最终导致炎性细胞因子(如 TNF-α、IL-1 等)的合成和释放,参与 DCM 的发病机制,仍需要研究探索,相信随着这方面深入的研究,DCM 的发病机制将得到更清楚的阐明,治疗思路会进一步拓展。

参 考 文 献

[1] Poltorak A, He X,Smirnova I,et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice :mutations in TLR4 gene[J]. Science, 1998,282(5396):2058-2088.

[2] Timmers L, Sluijter J P, Hoefer I E,et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac functionafter myocardial infarction[J]. Circ Res,2008,102(2): 257-264.

[3] Oyama J,Blais C Jr,Liu X,et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice[J]. Circulation, 2004,109(6):784-789.

[4] Shimamoto A,Chong A J, Yada M, et al. Inhibition of toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation,2006,114(1):1270-1274.

[5] Ha T,Li Y,Hua F,et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload[J]. Cardiovasc Res, 2005,68(2):224 - 234.

[6] Meng X ,Ao L,Song Y,et al. Sigaling for myocardial depression in hemorrhagic shock:roles of toll-like receptor 4 and p55TNF-alpha receptor[J].Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2005,288 (3):R600-R606.

[7] 姜 华,曲 鹏,王纪文,等.高血压大鼠左室重构时 Toll 样受体 4 的表达及作用[J].中国心血管杂志,2008,13(4):273-276.

[8] Methe H, Kim J O,Kofler S,et al. Expansion of circulating toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2005,111(20):2654 - 2661.

[9] 耿红莲,陆慧琦,张玲珍,等.冠心病患者外周血单个核细胞 Toll 样受体 4 表达的测定及临床意义[J].第二军医大学学报,2005,26 (11):1248-1251.

[10] Ramana K V,Willis M S,White M D,et al. Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition [J]. Circulation,2006,114(17):1838-1846.

[11] Saton M, Nakamura M,Akatsu T,et al. Toll like receptor 4 is expressed with enteroviral replication in myocardium form patients with dilated cardiomyopathy [J]. Lab Invest ,2004,84(2):173-181.

[12] Földes G,Von Haehling S,Okonko D O,et al. Fluvastatin reduces increased blood monocyte toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure[J].Int J Cardiol,2008,124(1):80 -85.

(责任编辑:关蕴良)