

代谢综合征患者血单核细胞 Toll 样受体 4 表达变化

李孝辉¹, 沙婷², 彭城³, 祁春梅³, 李勇³

(徐州医学院第二附属医院 1.检验科,3.心内科,江苏省徐州市 221006;2.徐州医学院,江苏省徐州市 221002)

[关键词] 代谢综合征; 高血压; Toll 样受体 4

[摘要] **目的** 比较代谢综合征(MS)患者及单纯高血压(EH)患者血单核细胞 Toll 样受体 4(TLR4)及血浆高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)的表达。**方法** 采用流式细胞仪检测 62 例 EH 患者及 45 例 MS 患者血单核细胞 TLR4 的阳性率,同时检测血浆 hs-CRP 浓度。并将 TLR4 及 hs-CRP 分别与年龄、性别、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、TLR4、hs-CRP 行单因素相关分析,然后进行多元逐步回归分析。**结果** MS 组 TLR4($5.7\% \pm 1.2\%$)、hs-CRP(5.6 ± 0.9 mg/L)与单纯 EH 组(分别为 $5.3\% \pm 0.9\%$ 、 5.0 ± 0.8 mg/L)患者差异均有统计学意义(t 值分别为 -3.274 、 -2.225 , P 值分别为 0.028 、 0.01);单因素相关分析显示,TLR4 和 hs-CRP 均与 TC、LDL、HbA1c、FBG、餐后 2 h 血糖(2hPBG)呈正相关($P < 0.05$),TLR4 与 hs-CRP 也呈正相关($P < 0.05$);多元逐步回归分析显示,影响 TLR4 最显著因素为 hs-CRP、HbA1c(β 值分别为 0.745 、 0.244 , P 值分别为 0.000 、 0.004),影响 hs-CRP 最显著因素为 TLR4($\beta = 0.943$, $P = 0.000$)。**结论** MS 患者单核细胞 TLR4 阳性率、血浆 hs-CRP 均较单纯 EH 患者高,MS 患者单核细胞 TLR4 阳性率与血浆 hs-CRP 水平呈正相关,TLR4 可能参与了 MS 发生和发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Change of Toll Like Receptor 4 Expression in Blood Mononuclear Cells of Patients with Metabolic Syndrome

LI Xiao-Hui¹, SHA Ting², PENG Cheng³, QI Chun-Mei³, and LI Yong³

(1.Department of Clinical Laboratory, 3.Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221006; 2.Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

[KEY WORDS] Metabolic Syndrome; Hypertension; Toll like Receptor 4

[ABSTRACT] **Aim** To compare the expression of Toll like receptor 4(TLR4) in blood mononuclear cells and plasma high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) between metabolic syndrome (MS) patients and simple hypertensive patients. **Methods** There were 62 EH patients and 45 patients with MS. The TLR4 positive rate in blood mononuclear cells was detected by flow cytometry. We also detected the plasma hs-CRP of the patients. Single factor analysis was performed on TLR4, hs-CRP and other observation indexes (age, sex, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), fasting blood glucose (FBG) and glycated hemoglobin (HbA1c)), and then multi-factor regression analysis was also performed. **Results** TLR4 and hs-CRP were statistically significant between MS group ($5.7\% \pm 1.2\%$ and 5.6 ± 0.9 mg/L) and EH group ($5.3\% \pm 0.9\%$ and 5.0 ± 0.8 mg/L) (t values were -3.274 , -2.225 , P values were 0.028 , 0.01); Single factor analysis showed that TLR4 was positively correlated with TC, LDL, HbA1c, FBG, 2-hour postprandial blood glucose (2hPBG) and hs-CRP ($P < 0.05$), and hs-CRP was positively correlated with TC, LDL, HbA1c, FBG, 2hPBG, TLR4 ($P < 0.05$); Meanwhile, multi-factor regression analysis showed that hs-CRP and HbA1c were the most significant factors which affected TLR4(β values were 0.745 , 0.244 , P values were 0.000 , 0.004), and TLR4 was the most significant factor which affected hs-CRP ($\beta = 0.943$, $P = 0.000$).

Conclusion It is MS patients that have higher TLR4 positive rate in mononuclear cells and plasma hs-CRP compared with EH patients. TLR4 positive rate and plasma hs-CRP levels of MS patients are positively correlated. And TLR4 may be involved in the development and progression of MS.

代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 已成为现代社会危害人类健康的主要疾病之一^[1]。有研究显示, MS 患者发生心脑血管事件的危险性显著大于单纯性高血压病 (essential hypertension, EH) 和糖尿病患者, 其危害巨大, 控制也相当困难^[2]。其发病机制复杂, 目前尚不完全明确。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是一种介导天然免疫的跨膜信号传递受体, 其在炎性细胞活化的信号转导中起重要作用, 是联系天然免疫与获得性免疫的桥梁^[3]。本研究比较了 MS 和单纯 EH 患者血单核细胞 TLR4 表达的特点, 从炎症角度揭示了 MS 的部分发病机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象

患者均来自 2013 年 7 月至 2014 年 11 月间徐州医学院第二附属医院内科门诊或住院的 107 例初发原发性高血压患者, 其中合并 MS 患者 45 例, 为 MS 组; 单纯 EH 患者 62 例, 为单纯 EH 组。EH 患者诊断均符合《2010 版中国高血压防治指南》^[4], MS 诊断符合 2007 年《中国成人血脂异常防治指南》^[5]。患者一般资料见表 1。所有入选患者均为初诊, 未服用任何降压、调脂、降糖药物。经病史及实验室检查排除继发性高血压、心功能不全、急性感染性疾病、结缔组织病、恶性肿瘤、肾脏病、冠心病等。

1.2 标本采集

入选患者均空腹测量收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、体质指数 (BMI = 体重/身高²)、腰围 (waist circumference, WC)、静脉采血 15 mL, 用于总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, HbA1c)、TLR4、高敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 的检测, 然后予 75 g 葡萄糖粉溶于水口服, 2 h 后再次静脉抽血 5 mL, 测餐后 2 h 血糖 (2-hour postprandial blood glucose, 2hPBG)。

1.3 血单核细胞 TLR4 检测

抗凝全血 150 μ L, 加入红细胞裂解液, 混匀 10 min, 离心, 1 mL PBS 液重复洗涤细胞 2 次, 每管加入 20 μ L PE 标记的鼠抗人 TLR4 单抗 (USA, eBioscience 公司, 购自北京中山生物公司), 混匀后室温

避光孵育 30 min; PBS 液洗涤 1 次, 将经荧光染色的细胞离心沉淀, 每管内加入多聚甲醛固定 10 min, 放于 4℃ 温度保存。离心弃去保存液, PBS 液调整细胞密度为 2×10^9 /L, 上流式细胞仪检测。用 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪检测, 每管获取 10000 个细胞。

1.4 血糖、血脂、hs-CRP 及 HbA1c 检测

采用 Calendar 7600 全自动生化分析仪, 试剂为 CENTRONIC-JMBH 公司产品。采空腹外周静脉血, 按生化常规测定入选患者血脂、血糖、HbA1c 水平。

1.5 统计学分析

使用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 指标间关系正态分布资料采用 Pearson 相关分析, 非正态分布资料采用 Spearman 相关分析, 数据间回归分析采用多元线性逐步回归分析。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况比较

两组患者年龄、性别、SBP、DBP 均无统计学差异, 但 BMI、TG、TC、LDL、HDL、HbA1c、FBG、2hPBG 均有统计学差异 (表 1)。

表 1. 两组患者一般情况比较
Table 1. Comparison of patient characteristics between the two groups

项 目	单纯 EH 组	MS 组	<i>t</i> / <i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
年龄 (岁)	49.8 \pm 6.2	50.6 \pm 6.6	-0.592	0.555
男/女 (例)	38/24	26/19	-0.364	0.716
WC (cm)	94.5 \pm 7.1	82.8 \pm 3.9	-11.182	0.000
BMI (kg/m ²)	28.3 \pm 2.9	23.8 \pm 1.8	-10.044	0.000
TC (mmol/L)	4.9 \pm 0.7	6.6 \pm 0.6	-12.236	0.000
TG (mmol/L)	1.3 \pm 0.2	2.3 \pm 1.2	-5.813	0.000
LDL (mmol/L)	3.3 \pm 0.8	4.4 \pm 0.6	-8.911	0.000
HDL (mmol/L)	1.6 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	9.976	0.000
HbA1c	5.0% \pm 0.3%	5.8% \pm 0.8%	-7.313	0.000
FBG (mmol/L)	5.1 \pm 0.6	6.2 \pm 1.1	-6.725	0.000
2hPBG (mmol/L)	6.6 \pm 0.6	9.1 \pm 2.4	-7.852	0.000
SBP (mmHg)	154.7 \pm 9.2	157.4 \pm 9.7	-1.507	0.135
DBP (mmHg)	94.8 \pm 5.8	96.7 \pm 7.1	-1.523	0.131

2.2 两组患者 TLR4 和 hs-CRP 水平及 TLR4 与 hs-CRP 相关性分析

MS 组患者单核细胞 TLR4 阳性率及血浆 hs-CRP 水平均较单纯 EH 组升高(t 值分别为-3.274、

-2.225, P 值分别为 0.028、0.01)(表 2 和图 1);MS 组 TLR4 与 hs-CRP 正相关($r=0.943,P=0.000$);单纯 EH 组 TLR4 与 hs-CRP 亦呈正相关($r=0.261,P=0.04$)。

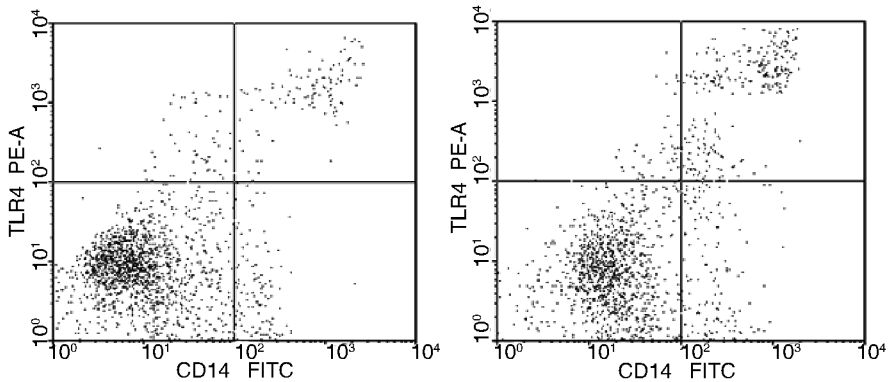


图 1. 流式细胞仪上检测的 CD14⁺单核细胞上 TLR4 的表达 左为单纯 EH 组,右为 MS 组。

Figure 1. The expression of TLR4 on CD14⁺ monocytes by flow cytometry

表 2. 两组患者 TLR4 阳性率及 hs-CRP 水平比较
Table 2. Comparison of TLR4, hs-CRP between the two groups

项 目	单纯 EH 组	MS 组
TLR4	5.3%±0.9%	5.7%±1.2% ^a
hs-CRP(mg/L)	5.0±0.8	5.6±0.9 ^a

a 为 $P<0.05$,与单纯 EH 组比较。

2.3 MS 组 TLR4、hs-CRP 与临床指标相关性分析

MS 组 TLR4 与 TC、LDL、HbA1c、FBG、2hPBG、hs-CRP 呈正相关($P<0.05$);hs-CRP 与 TC、LDL、HbA1c、FBG、2hPBG、TLR4 呈正相关($P<0.05$;表 3)。

2.4 MS 组 TLR4、hs-CRP 与临床各指标多元逐步回归分析

以 TLR4 为应变量,年龄、BMI、TG、TC、LDL、HDL、HbA1c、FBG、2hPBG、SBP、DBP、hs-CRP 为自变量,进行多元逐步回归分析,hs-CRP、HbA1c 进入回归方程(β 值分别为 0.745、0.244, P 值分别为 0.000、0.004),常数项为零。

以 hs-CRP 为应变量,年龄、BMI、TG、TC、LDL、HDL、HbA1c、FBG、2hPBG、SBP、DBP、TLR4 为自变量,进行多元逐步回归分析,最后仅 TLR4 进入回归方程($\beta=0.943,P=0.000$),常数项为零。

表 3. MS 组 TLR4、hs-CRP 分别与临床各指标相关性分析
Table 3. Correlation analysis of TLR4, hs-CRP and other observation indexes

项 目	统计值	TLR4	hs-CRP
性别	r 值	0.262	0.289
	P 值	0.082	0.054
年龄	r 值	0.099	0.046
	P 值	0.516	0.765
WC	r 值	-0.123	-0.140
	P 值	0.422	0.359
BMI	r 值	-0.035	-0.079
	P 值	0.820	0.608
TC	r 值	0.309	0.300
	P 值	0.039	0.046
TG	r 值	0.269	0.222
	P 值	0.074	0.143
LDL	r 值	0.349	0.365
	P 值	0.019	0.014
HDL	r 值	-0.106	-0.102
	P 值	0.488	0.506
HbA1c	r 值	0.848	0.811
	P 值	0.000	0.000
FBG	r 值	0.662	0.608
	P 值	0.000	0.000
2hPBG	r 值	0.703	0.700
	P 值	0.000	0.000
SBP	r 值	-0.136	-0.071
	P 值	0.372	0.643
DBP	r 值	-0.014	0.086
	P 值	0.929	0.576
TLR4	r 值	-	0.943
	P 值	-	0.000

3 讨 论

MS 是心脑血管病的高危因子,是致残、死亡的主要原因之一。近年来随着全球老龄化的加速,MS 的患病率呈逐年上升趋势,有关 MS 的研究也受到各国学者的重视。MS 病理生理机制非常复杂,主要表现为多重危险因素的聚集。就目前来看,从病因学的角度,MS 可能的发病机制有:①胰岛素抵抗(IR)^[6-7];②肥胖和脂肪分布异常;腹型肥胖和脂毒性的作用^[8];③其他一些独立危险因子的聚集(包括氧化应激、激素、遗传和环境等)^[9]。近年来慢性炎症与 MS 的关系逐渐受到重视^[10-11]。

本研究结果显示,MS 患者 hs-CRP 较单纯 EH 患者高,说明 MS 患者体内炎症状态较单纯 EH 患者高。有研究显示,体内慢性炎症状态是 MS 的病因,且推动了 MS 患者心脑血管事件的发生^[12]。

Toll 样受体(TLR)属于 I 型跨膜受体家族,最早在果蝇中被发现^[13],其在先天免疫系统中发挥了关键性作用。它们不仅可直接识别、结合某些病原体及其产物的特定分子结构,而且还能对不同的病原相关分子模式进行识别、结合,并引发一系列信号转导,导致释放大量的炎性介质^[14-15]。TLR4 是其中研究较多的一种。本实验中,MS 患者单核细胞 TLR4 阳性率较单纯 EH 患者高,且 MS 患者 TLR4 与 hs-CRP 有相关性,相关系数为 0.943,多元逐步回归分析结果表明,以 hs-CRP 为应变量,仅 TLR4 进入回归方程,说明 MS 患者体内炎症状态升高可能与 TLR4 表达增加有关。而单纯 EH 组 TLR4 与 hs-CRP 虽然有相关性,但相关系数仅为 0.261,相关关系不是很密切。有实验表明,在通过基因敲除小鼠实验减轻炎性信号通路可减少肥胖相关的胰岛素抵抗^[16]。此外,脂肪 TLR4 的表达随着肥胖而增加,并且通过脂多糖激活诱导核因子 κ B (NF- κ B)活化和细胞因子产生^[11]。因此,在 MS 发病的上述多种病因中均可能有 TLR4 的参与,TLR4 可能是其中的联结点。实验中,我们又以 TLR4 为应变量做多元逐步回归分析,hs-CRP 和 HbA1c 进入回归方程,说明 MS 患者平均血糖对 TLR4 的影响较血脂、血压对 TLR4 的影响大,而胰岛素抵抗是 MS 患者血糖异常的主要原因,这也进一步印证了胰岛素抵抗在 MS 发病中的核心地位。以上实验证明,TLR4 可能介导了 MS 的发生、发展,TLR4 可能成为

MS 治疗的靶点。

[参考文献]

[1] Fu J, Prasad HC. Changing epidemiology of metabolic syndrome and type 2 diabetes in Chinese youth[J]. Curr Diab Rep, 2014, 14(1): 447.

[2] Pîrcălăboiu L, Popa S, Puiu I, et al. The metabolic syndrome-new and old data[J]. Rom J Intern Med, 2010, 48(2): 193-203.

[3] Liu Y, Yin H, Zhao M, et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2014, 47(2): 136-147.

[4] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010 [J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-743.

[5] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5): 390-419.

[6] Avogaro A. Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome[J]. Panminerva Med, 2006, 48(1): 3-12.

[7] Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training[J]. Compr Physiol, 2013, 3(1): 1-58.

[8] Alemany M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome [J]. Nutr Res, 2013, 33(1): 1-11.

[9] Hopps E, Noto D, Caimi G, et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(1): 72-77.

[10] Fuentes E, Guzmán-Jofre L, Moore-Carrasco R, et al. Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(6): 1 611-616.

[11] Purkayastha S, Cai D. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome[J]. Mol Metab, 2013, 2(4): 356-63.

[12] Corrado E, Rizzo M, Aluigi L, et al. Prediction of vascular events in subjects with subclinical atherosclerosis and the metabolic syndrome; the role of markers of inflammation[J]. Int Angiol, 2012, 31(3): 219-226.

[13] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.

[14] Giancchetti E, Fierabracci A. Gene/environment interactions in the pathogenesis of autoimmunity: New insights on the role of Toll-like receptors[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(11): 971-983.

[15] Alexoudi I, Kapsimali V, Vaiopoulos A, et al. Toll-like receptors pathways implication in common autoimmune diseases and therapeutic perspectives [J]. G Ital Dermatol Venereol, 2015, 150(2): 255-260.

[16] Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation[J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 2 992-3 002.

(此文编辑 许雪梅)