

急性呼吸窘迫综合征患者外周血单核细胞中肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白8样分子2的表达与病情程度相关

黄鹤 冯聪 田昭涛 姚咏明 黎檀实

100853 北京,解放军总医院急诊科(黄鹤、冯聪、黎檀实);250031 山东济南,济南军区总医院急诊重症中心(黄鹤、田昭涛);100048 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所基础部(姚咏明)

通讯作者:黎檀实, Email: lts301@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.06.014

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白8样分子2(TIPE2)是否参与了急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发病过程及其机制。**方法** 采用前瞻性观察性研究方法,选择2013年7月至2015年7月解放军总医院急诊科收治的39例ARDS患者为研究对象,以同期35例健康体检者作为健康对照组。记录患者入院24 h内急性生理学与慢性健康状况评分系统II(APACHE II)评分、血气分析、降钙素原(PCT)和C-反应蛋白(CRP)。采用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测外周血单核细胞(PBMC)中TIPE2和血浆黏病毒抗性蛋白1(MX1)的mRNA表达,采用Spearman等级分析各指标之间的相关性。**结果** 39例ARDS患者入院24 h内APACHE II评分平均为 (25 ± 3) 分, PCT平均为 $(1.85 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$, CRP平均为 $(18.0 \pm 3.0) \text{mg/L}$ 。ARDS组PBMC中TIPE2 mRNA表达水平显著低于健康对照组($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.28 ± 0.15 比 8.87 ± 0.20 , $P < 0.001$),而血浆MX-1 mRNA表达水平显著高于健康对照组($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 39.44 ± 0.46 比 20.10 ± 0.32 , $P < 0.001$)。相关分析结果显示:TIPE2 mRNA与MX1 mRNA表达水平呈显著负相关($r = -0.630$, $P < 0.001$),与APACHE II评分也呈显著负相关($r = -0.781$, $P < 0.001$),而与PCT、CRP均无显著相关性(r 值分别为0.143、0.330,均 $P > 0.05$);MX1 mRNA表达水平与APACHE II评分呈显著正相关($r = 0.893$, $P < 0.001$),而与PCT、CRP无显著相关性(r 值分别为0.230、0.210,均 $P > 0.05$)。**结论** ARDS患者存在TIPE2表达下调,并与病情严重程度呈负相关;提示TIPE2可能参与了ARDS的发病过程。

【关键词】 肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白; 急性呼吸窘迫综合征; 免疫平衡; 干扰素, I型; 急性生理学与慢性健康状况评分系统II

基金项目: 卫生部科研专项经费项目(201302017)

Study of tumor necrosis factor- α induced protein 8 like-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute respiratory distress syndrome correlate with disease severity Huang He, Feng Cong, Tian Zhaotao, Yao Yongming, Li Tanshi

Department of Emergency, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China (Huang H, Feng C, Li TS); Department of Critical Care Medicine, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, Shandong, China (Huang H, Tian ZT); Trauma Research Center, First Hospital Affiliated to Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China (Yao YM)
Corresponding author: Li Tanshi, Email: lts301@163.com

【Abstract】 Objective To demonstrate the effect of tumor necrosis factor- α induced protein 8 like-2 (TIPE2) expression in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and its mechanism. **Methods** A prospective observation was conducted. Thirty-nine patients with ARDS admitted to department of emergency of PLA General Hospital from July 2013 to July 2015 were enrolled, and 35 healthy persons served as control group. The acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) score within 24 hours after admission, blood gas analysis, procalcitonin (PCT), and C-reactive protein (CRP) were recorded. The mRNA expressions of TIPE2 in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and myxoma resistance protein 1 (MX1) in plasma were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlations were analyzed by Spearman rank correlation analysis. **Results** The mean of APACHE II score in 39 patients with ARDS was 25 ± 3 , the mean of PCT was $(1.85 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$, and the mean of CRP was $(18.0 \pm 3.0) \text{mg/L}$. The TIPE2 mRNA expression in PBMC of

ARDS patients was significantly down-regulated as compared with that of healthy control group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.28 ± 0.15 vs. 8.87 ± 0.20 , $P < 0.001$), and the MX1 mRNA expression in plasma was significantly higher than that of healthy control group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 39.44 ± 0.46 vs. 20.10 ± 0.32 , $P < 0.001$). It was shown by correlation analysis results that the TIPE2 mRNA expression was negatively correlated with MX1 mRNA expression ($r = -0.630$, $P < 0.001$), so as APACHE II score ($r = -0.781$, $P < 0.001$), but no correlation was found between TIPE2 mRNA and PCT as well as CRP (r value was 0.143 and 0.330, respectively, both $P > 0.05$). The MX1 mRNA expression was positively correlated with APACHE II score ($r = 0.893$, $P < 0.001$), but no correlation was found between MX1 mRNA and PCT as well as CRP (r value was 0.230 and 0.210, respectively, both $P > 0.05$). **Conclusion** TIPE2 expression was decreased in ARDS patients, which negatively correlate with disease severity, and indicate TIPE2 might be involved in the pathogenic process of ARDS.

【Key words】 Tumor necrosis factor- α induced protein; Acute respiratory distress syndrome; Immune homeostasis; Type I interferon; Acute physiology and chronic health evaluation II

Fund program: Ministry of Health Research Projects of China (201302017)

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是指严重感染、创伤、休克等肺内外疾病发生后出现的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征,病死率高达 27%~45%^[1-2]。ARDS 的发病机制目前尚不明确,但已确认它是全身炎症反应综合征(SIRS)的一部分。在 ARDS 病程中,机体炎症反应失调,大量炎性细胞迁移和聚集,并释放炎性介质作用于肺泡毛细血管膜,导致其通透性增加^[3]。急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II)评分、降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)作为评价危重患者病情程度和感染的指标已在临床广泛使用^[4]。

肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 样分子 2(TIPE2)作为一种负性调节蛋白,其在炎症反应中具有重要的调控作用。TIPE2 被认为是一个保持免疫稳态的新型基因,从属于肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 (TNFAIP8)家族, TIPE2 在淋巴组织中优先表达,在基因敲除小鼠可以导致多器官炎症,体外研究也证实 TIPE2 能够抑制活化蛋白 1(AP1)和核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活, TIPE2 缺乏细胞通过 Toll 样受体(TLR)和 T 细胞抗原受体(TCR)促进炎症反应^[5-6]。我们假设 ARDS 患者 TIPE2 表达与正常人有差异,并参与 ARDS 发病的病理生理过程。因此本研究通过对比 ARDS 患者与正常人群外周血单核细胞(PBMC)中 TIPE2 和血浆中 I 型干扰素(IFN)诱导基因黏病毒抗性蛋白 1(MX1)的 mRNA 表达,明确 IFN- α 诱导基因与 TIPE2 的关系,及二者与 APACHE II 评分、PCT、CRP 之间的关系,探讨 TIPE2 在 ARDS 中的作用及其机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料:采用前瞻性观察性研究方法,选择 2013 年 7 月至 2015 年 7 月解放军总医院急诊科收治的 39 例 ARDS 患者,以 35 例健康体检者为对照。

1.1.1 纳入标准:年龄>18 岁;X 线胸片显示双肺有渗出性改变;ARDS 诊断符合 2012 年柏林标准^[7]。

1.1.2 排除标准:急性左心衰竭、肺部肿瘤、过敏性肺炎、肺结核;免疫系统疾病肺部受累;长期使用激素或免疫抑制剂;肝肾功能不全;糖尿病。

1.1.3 伦理学:本研究符合医院伦理委员会制定的各项伦理学标准,并通过医院伦理委员会批准,按规定签署受试者知情同意书。

1.2 观察指标及方法:为排除抗菌药物对 TIPE2 表达的影响,于抗菌药物使用前抽取外周血备检。

1.2.1 评估指标:记录患者入院 24 h 内 APACHE II 评分;患者入院后常规检测血气分析、PCT 及 CRP。

1.2.2 PBMC 的培养:取受试者外周血 10 mL,经密度梯度离心法获得 $5 \times 10^9/L$ 的 PBMC。

1.2.3 实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PBMC 中 TIPE2 和血浆 MX1 的 mRNA 表达:采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,去除 RNA 样本中的 DNA,并反转录成 cDNA。TIPE2、MX1 和内参照 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列由上海吉凯公司设计并合成。扩增条件:95℃ 10 s, 40 个循环;95℃ 5 s, 60℃ 41 s。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,采用 RT-PCR 仪测定相对定量值(RQ)。采用溶解曲线分析确保扩增产物的特异性,RQ 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,实验重复 3 次,取均值。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件分析数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Mann-Whitney 检验;相关分析采用 Spearman 等级相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

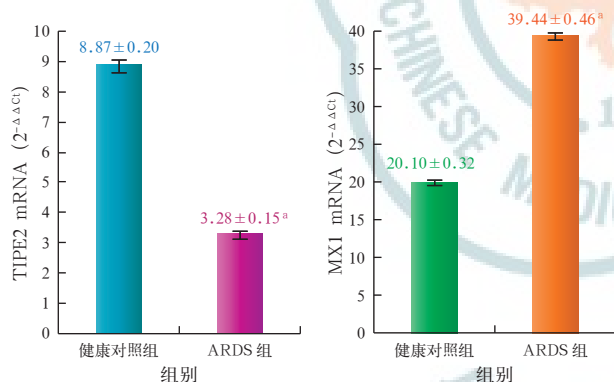
2 结果

2.1 一般资料:入选 39 例患者,男性 24 例,女性 5 例;年龄 18~70 岁,平均(45 ± 10)岁;APACHE II 评分平均(25 ± 3)分;PCT 平均(1.85 ± 0.41) $\mu g/L$,

CRP 平均 (18.0 ± 3.0) mg/L, 氧合指数 $(\text{PaO}_2/\text{FiO}_2)$ 平均 (245.0 ± 16.5) mmHg ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$); 肺内源性 ARDS 19 例, 肺外源性 ARDS 20 例。35 例健康对照者中男性 30 例, 女性 5 例; 年龄 $18 \sim 70$ 岁, 平均 (43 ± 12) 岁。两组性别、年龄比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 说明两组资料均衡, 有可比性。

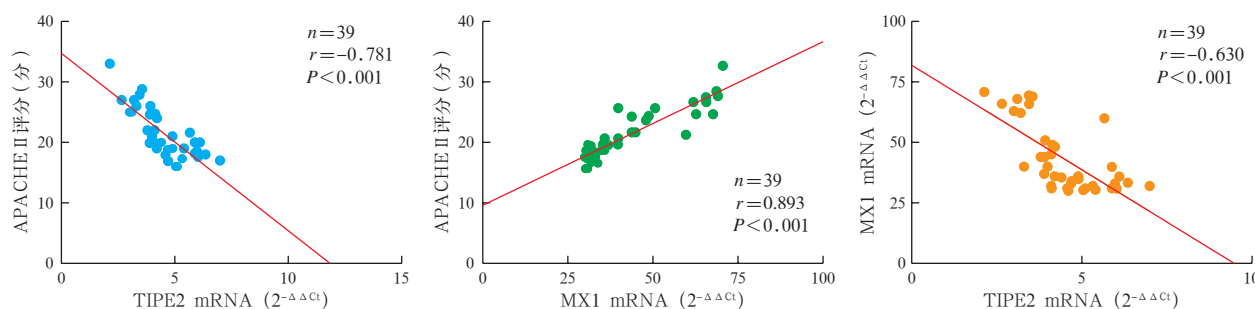
2.2 两组 PBMC 中 TIPE2 和血浆 MX1 的 mRNA 表达 (图 1): ARDS 组 PBMC 中 TIPE2 mRNA 表达显著低于健康对照组, 而血浆 MX-1 mRNA 表达显著高于健康对照组 (均 $P < 0.001$)。

2.3 ARDS 患者 TIPE2 mRNA 和 MX1 mRNA 表达水平与 APACHE II 评分、PCT、CRP 的相关性 (图 2): TIPE2 mRNA 表达水平与 MX1 mRNA 表达水平和 APACHE II 评分均呈显著负相关 (均 $P < 0.001$), 而与 PCT、CRP 无相关性 (r 值分别为 0.143 、 0.330 , 均 $P > 0.05$); MX1 mRNA 表达水平与 APACHE II 评分呈显著正相关 ($P < 0.001$), 而与 PCT、CRP 无相关性 (r 值分别为 0.230 、 0.210 , 均 $P > 0.05$)。



注: ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, PBMC 为外周血单核细胞, TIPE2 为肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 样分子 2, MX-1 为黏病毒抗性蛋白 1; 与健康对照组比较, * $P < 0.001$

图 1 ARDS 患者与健康对照者 PBMC 中 TIPE2 mRNA (左) 和血浆 MX-1 mRNA (右) 表达的比较



注: ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, TIPE2 为肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 8 样分子 2, MX1 为黏病毒抗性蛋白 1, APACHE II 为急性生理学及慢性健康状况评分系统 II

图 2 ARDS 患者 TIPE2 和 MX1 的 mRNA 表达水平与 APACHE II 评分 (左、中) 以及两个基因表达水平 (右) 之间的相关性

3 讨论

免疫平衡基因包括限制免疫细胞激活和增殖的基因以及控制细胞死亡的基因两大类, 当这些基因缺失或者下调, 免疫平衡失衡, 可发生严重免疫系统疾病。体内免疫平衡由不能互相替代的多重免疫调节基因维持, 而平衡破坏是由于导致 ARDS 发病的基因功能障碍。TIPE2 是一种保持免疫稳态的新型基因, 对固有免疫和获得性免疫具有负向调节的作用^[8]。有研究发现, 慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者随病情严重程度加重, PBMC 中 TIPE2 表达下降, 并与炎症细胞因子呈负相关^[9-10]。本研究显示, ARDS 患者 TIPE2 表达下调, 且与疾病的严重程度呈负相关。

I 型 IFN 是固有免疫的重要成员之一, 是抵抗微生物感染的第一道防线。为确保机体快速瞬时反应, I 型 IFN 的产生被严密调控, 这样, 信号转导过程诱导 I 型 IFN 产生可能发生在初级纤毛^[11-13]。众所周知, 一些病毒如流感病毒 A 和严重冠状病毒优先感染呼吸系统顶部有纤毛的部分^[14]。因此, MX1 和 MX1 绑定蛋白聚集在纤毛可能通过中和固有免疫促进病毒感染。病毒感染引起宿主固有免疫应答的代表是 I 型 IFN 应答^[15]。I 型 IFN 可以产生抗病毒免疫, 诱导抑制病毒的分子机制以及限制感染的扩散^[16]; 同时 I 型 IFN 能够诱导树突细胞持续活化, 因此被认为是 B 细胞和 T 细胞识别的有效刺激物及免疫耐受的关键调节器^[17-19]。以上研究表明 I 型 IFN 在炎症性疾病发病机制中具有重要作用。由于 I 型 IFN 家族包括 14 个 IFN- α 亚型和 IFN- β , 且所有亚型绑定一个感受器。研究证实 MX 基因表达受 IFN- α/β 调节, MX1 是 MX 家族中重要成员, 因此检测血浆 MX1 mRNA 表达可以反映 I 型 IFN 的水平^[20-22]。

本研究结果显示, ARDS 患者血浆 MX1 mRNA 表达水平较健康对照组显著升高, 且与患者的病情严重程度呈正相关; 而 TIPE2 mRNA 与 MX1 mRNA 表达水平呈显著负相关。说明 ARDS 患者 PBMC 中 TIPE2 水平与血浆 I 型 IFN 水平呈显著负相关, 提示 TIPE2 与 I 型 IFN 产物之间关系密切。TLR 信号通路下游产生 I 型 IFN 不同于促炎因子, IFN 调节因子是由 I 型 IFN 产生, 而促炎因子的产生依赖 NF- κ B 通路^[23-24]。TIPE2 是否对产生 I 型 IFN 的信号通路有影响尚需进一步研究。

综上, 本研究显示, ARDS 患者 PBMC 中 TIPE2 mRNA 表达水平与病情严重程度和血浆 I 型 IFN mRNA 表达水平呈显著负相关。提示 TIPE2 可能参与了 ARDS 的发病机制, 但其参与发病过程的具体机制尚需进一步研究证实。此外, 本研究 ARDS 患者 PBMC 中 TIPE2 mRNA 表达分析是在应用抗菌药物治疗前, 随着治疗时间延长, 治疗药物对患者 TIPE2 表达的潜在影响以及如何参与其发病过程同样需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Zamboni M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time [J]. *Chest*, 2008, 133 (5): 1120-1127. DOI: 10.1378/chest.07-2134.
- [2] 乔良, 刘志. 按柏林新标准分析急诊脓毒症患者发生急性呼吸窘迫综合征的危险因素 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
Qiao L, Liu Z. Analysis of the risk factors of acute respiratory distress syndrome of Berlin new definition in patients with sepsis in emergency department [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
- [3] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149 (3 Pt 1): 818-824. DOI: 10.1164/ajrccm.149.3.7509706.
- [4] 王胜云, 陈德昌. 降钙素原和 C-反应蛋白与脓毒症患者病情严重程度评分的相关性研究及其对预后的评估价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (2): 97-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.004.
Wang SY, Chen DC. The correlation between procalcitonin, C-reactive protein and severity scores in patients with sepsis and their value in assessment of prognosis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 97-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.004.
- [5] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis [J]. *Cell*, 2008, 133 (3): 401-402. DOI: 10.1016/j.cell.2008.04.017.
- [6] Zhang X, Wang J, Fan C, et al. Crystal structure of TIPE2 provides insights into immune homeostasis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16 (1): 89-90. DOI: 10.1038/nsmb.1522.
- [7] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. *JAMA*, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [8] Sun H, Gong S, Carmody RJ, et al. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis [J]. *Cell*, 2008, 133 (3): 415-426. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.026.
- [9] 柴明思, 孙云晖, 姜鹏达, 等. TIPE2 与 IL-8 在慢性阻塞性肺疾病中的表达及临床意义 [J]. *黑龙江医药科学*, 2013, 36 (6): 34-35.
Chai MS, Sun YH, Jiang PD, et al. The expression and clinical significance of the TIPE2 and IL-8 in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Heilongjiang Med Pharm*, 2013, 36 (6): 34-35.
- [10] 宋亚茹, 赵卉, 申璐璐, 等. TIPE2 在慢性阻塞性肺疾病患者外周血单个核细胞中表达的研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32 (3): 193-196. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2012.003.007.
Song YR, Zhao H, Shen LL, et al. Expression level of TIPE2 in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Respir*, 2012, 32 (3): 193-196. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2012.003.007.
- [11] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response [J]. *Biochem J*, 2009, 420 (1): 1-16. DOI: 10.1042/BJ20090272.
- [12] Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (Pt 1): 1-47. DOI: 10.1099/vir.0.83391-0.
- [13] Samuel CE. Antiviral actions of interferons [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14 (4): 778-809, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
- [14] Decker T, Müller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (9): 675-687. DOI: 10.1038/nri1684.
- [15] Mancuso G, Midiri A, Biondo C, et al. Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (5): 3126-3133. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.3126.
- [16] Kaplan A, Ma J, Kyme P, et al. Failure to induce IFN- β production during *Staphylococcus aureus* infection contributes to pathogenicity [J]. *J Immunol*, 2012, 189 (9): 4537-4545. DOI: 10.4049/jimmunol.1201111.
- [17] Pascual V, Farkas L, Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18 (6): 676-682. DOI: 10.1016/j.coi.2006.09.014.
- [18] Koutouzov S, Mathian A, Dalloul A. Type-I interferons and systemic lupus erythematosus [J]. *Autoimmun Rev*, 2006, 5 (8): 554-562. DOI: 10.1016/j.autrev.2006.05.002.
- [19] Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo [J]. *J Exp Med*, 2001, 194 (6): 769-779. DOI: 10.1084/jem.194.6.769.
- [20] Sheikh F, Dickensheets H, Gamero AM, et al. An essential role for IFN- β in the induction of IFN-stimulated gene expression by LPS in macrophages [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96 (4): 591-600. DOI: 10.1189/jlb.2A0414-191R.
- [21] Smith J, Sadeyen JR, Butter C, et al. Analysis of the early immune response to infection by infectious bursal disease virus in chickens differing in their resistance to the disease [J]. *J Virol*, 2015, 89 (5): 2469-2482. DOI: 10.1128/JVI.02828-14.
- [22] Haller O, Staeheli P, Schwemmler M, et al. Mx GTPases: dynamine-like antiviral machines of innate immunity [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23 (3): 154-163. DOI: 10.1016/j.tim.2014.12.003.
- [23] Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37 (2): 306-309. DOI: 10.1002/eji.200637009.
- [24] Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses [J]. *Nature*, 2005, 434 (7034): 772-777. DOI: 10.1038/nature03464.

(收稿日期: 2015-12-01)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)