

血必净注射液对严重感染患者髓样细胞触发受体-1 表达的影响

陆洋, 沈浩亮, 王林华, 崔晓莉, 赵宏胜

(南通大学附属医院重症医学科, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 观察血必净注射液对严重感染患者髓样细胞触发受体-1 (TREM-1) 的表达及可溶性 TREM-1 (sTREM-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平的影响。**方法** 将入住南通大学附属医院重症医学科的 20 例严重感染患者分为血必净组和对照组, 每组 10 例; 按 2004 年严重感染和感染性休克治疗指南的原则进行综合治疗, 其中血必净组在常规综合治疗基础上加用血必净注射液 50 mL, 每日 3 次, 疗程 5~7 d。检测两组患者治疗前及治疗后 3 d 和 5 d 全血 TREM-1 mRNA 表达及血浆 sTREM-1、TNF- α 、IL-6 水平的变化。**结果** 两组治疗前 TREM-1 mRNA 表达及 sTREM-1、TNF- α 、IL-6 水平比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。治疗后两组 TREM-1 的表达及血浆 TNF- α 、IL-6 水平均较治疗前下降, 且血必净组较对照组下降更为显著, 差异有统计学意义 [TREM-1 mRNA 3 d: 1.065 ± 0.277 比 1.217 ± 0.301 , $t=-3.267$, $P=0.047$; 5 d: 0.912 ± 0.239 比 1.071 ± 0.254 , $t=-5.072$, $P=0.032$; sTREM-1 (ng/L): 146.93 ± 13.76 比 176.22 ± 19.46 , $t=-5.442$, $P=0.033$; TNF- α (ng/L): 77.51 ± 11.28 比 107.72 ± 13.17 , $t=-4.355$, $P=0.032$; IL-6 (ng/L): 288.35 ± 14.59 比 323.89 ± 24.51 , $t=-3.941$, $P=0.028$]。**结论** 早期给予血必净注射液可以下调 TREM-1 的表达及其下游炎症因子的水平, 有较好的控制炎症反应的作用, 对加强改善严重感染患者的全身炎症反应综合征有积极意义。

【关键词】 血必净注射液; 脓毒症; 髓样细胞触发受体-1; 炎症因子; 中西医结合疗法

A study of influence of Xuebijing injection on expression of triggering receptor-1 expression on myeloid cell in patients with severe sepsis LU Yang, SHEN Hao-liang, WANG Lin-hua, CUI Xiao-li, ZHAO Hong-sheng.

Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

Corresponding author: ZHAO Hong-sheng, Email: zxnt@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Xuebijing injection on expression of myeloid cell triggering receptor-1 (TREM-1) and the plasma levels of soluble TREM-1 (sTREM-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in patients with severe sepsis. **Methods** Twenty patients with severe sepsis admitted into Critical Care Medicine Department, Affiliated Hospital of Nantong University were given comprehensive treatments according to the guidelines for management of severe sepsis and septic shock (2004), and they were divided into Xuebijing group and control group (each 20 cases). The Xuebijing injection group was given Xuebijing injection 50 mL, 3 times daily for 5-7 days followed by regular treatments. The changes in blood TREM-1 mRNA expression and plasma concentrations of sTREM-1, TNF- α , and IL-6 were detected before and after treatments on the 3rd and 5th day, and the above indexes were compared between the two groups. **Results** Before treatments, there were no significant differences in TREM-1 mRNA expression and levels of sTREM-1, TNF- α , IL-6 between two groups (all $P>0.05$). The TREM-1 expression and plasma concentrations of sTREM-1, TNF- α , and IL-6 of two groups were declined after treatments compared to their baselines, the degree of decline being more prominent in Xuebijing group [TREM-1 mRNA 3 days: 1.065 ± 0.277 vs. 1.217 ± 0.301 , $t=-3.267$, $P=0.047$; 5 days: 0.912 ± 0.239 vs. 1.071 ± 0.254 , $t=-5.072$, $P=0.032$; sTREM-1 (ng/L): 146.93 ± 13.76 vs. 176.22 ± 19.46 , $t=-5.442$, $P=0.033$; TNF- α (ng/L): 77.51 ± 11.28 vs. 107.72 ± 13.17 , $t=-4.355$, $P=0.032$; IL-6 (ng/L): 288.35 ± 14.59 vs. 323.89 ± 24.51 , $t=-3.941$, $P=0.028$]. **Conclusion** Early implication of Xuebijing injection is of great significance in patients with severe sepsis, it may reduce the expression level of TREM-1 and serum levels of downstream inflammatory mediators, that is beneficial to the control of inflammatory responses and improvement of systemic inflammatory response syndrome in such patients.

【Key words】 Xuebijing injection; Sepsis; Triggering receptor-1 expression on myeloid cell; Inflammatory mediator; Integrated traditional Chinese and western medicine therapy

严重感染和感染性休克是危重病医学领域研究与治疗的主要课题之一, 关于严重感染和感染性休克发生发展的机制研究不断有新的进展。研究发

现, 髓样细胞触发受体-1 (TREM-1) 在脓毒症患者的表达显著升高, 被认为是诊断脓毒症发生的敏感生物学标志^[1-2]。TREM-1 是一种膜蛋白炎症因子受体, 属于免疫球蛋白超家族成员, 选择性表达于髓样细胞 (如中性粒细胞、单核细胞等), 其天然配体尚不明确, 受细菌、真菌及细菌代谢产物脂多

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.06.004

基金项目: 天津市科委科技创新基金资助项目 (778590003032); 江苏省南通市科技计划项目 (HS2013041)

通信作者: 赵宏胜, Email: zxnt@163.com

糖 (LPS) 影响而上调, TREM-1 有一个短的细胞内结构域, 与 Toll 样受体 (TLR) 共同作用, 当与某些配体如细菌细胞壁结合后, 可协同信号转导分子死亡相关蛋白 12 (DAP12), 触发炎症细胞, 通过激活中性粒细胞及单核细胞引起白细胞介素-8 (IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等前炎症因子的分泌, 在炎症反应信号转导通路中发挥放大作用^[3-5]。本研究旨在探讨血必净注射液对于严重感染和感染性休克患者 TREM-1、可溶性 TREM-1 (sTREM-1) 及炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的影响。

1 病例与方法

1.1 一般资料: 选择 2011 年 6 月至 2012 年 6 月收住南通大学附属医院重症医学科的严重感染及感染性休克患者 20 例, 包括肺炎 5 例, 肠道感染 3 例, 腹膜炎 5 例, 胆管炎 4 例, 泌尿系感染 2 例, 软组织感染 1 例; 其中发生感染性休克者 8 例。按随机原则将患者分为两组, 每组 10 例。两组常规治疗方法相同。血必净组: 在常规治疗基础上早期加用血必净注射液 (天津红日药业股份有限公司生产) 50 mL, 每日 3 次, 疗程为 5~7 d。诊断依据及常规治疗方案遵照《2004 严重感染和感染性休克治疗指南》^[6] 及《拯救脓毒症运动: 严重脓毒症和脓毒性休克治疗国际指南 2008》^[7]。

本研究符合医学伦理学标准, 并经医院伦理委员会批准, 所有治疗取得患者或家属知情同意。

1.2 检测指标与方法

1.2.1 血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平测定: 于患者治疗前及治疗 3 d 后抽取静脉血 5 mL, 用乙二胺四乙酸 (EDTA) 或肝素作为抗凝剂, 标本采集后 30 min 内于 2~8℃、1000×g 离心 15 min, 取上清液立即检测, 或进行分装并将标本放于 -80℃ 保存。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平; 人 TREM-1 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。操作严格按试剂盒说明书进行, sTREM-1 测定的灵敏度为 30 ng/L; TNF- α 和 IL-6 的测定灵敏度为 15 ng/L。反应结束时, 在波长 450 nm 处读取酶标仪上的吸光度 (A) 值, 以标准品浓度为横坐标, 以 A 值为纵坐标绘制标准曲线, 根据标准曲线计算各样本的浓度。

1.2.2 TREM-1 mRNA 表达的测定: 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和定量 PCR 法测定外周血 TREM-1 mRNA 表达水平。根据 RAN 液体样本总 RNA 提取试剂盒 (北京艾德莱生物有限公司)

说明书提取全血总 RNA。取 2 μ L 总 RNA 为模板, 参照 RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒 (TaKaRa) 说明书进行 cDNA 合成。PCR 引物根据 GenBank 中人 TREM-1 的 cDNA 序列进行设计, 以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参对照。TREM-1 引物序列为: 正义链 5'-TGTGCGTGTCTTTGTCT-3', 反义链 5'-TGGAATAAGGATGGGAC-3', 扩增产物长度 480 bp; β -actin 引物序列为: 正义链 5'-GTGACCTGACAGACTACCT-3', 反义链 5'-ACAAAGTCCTCAGCACA-3', 扩增产物长度 354 bp。引物由上海生物工程研究所合成。PCR 反应体系为 50 μ L, ROX 25 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 2 μ L cDNA 模板, 双蒸水补足到 50 μ L。95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 扩增 40 个循环。反应完成后取 PCR 扩增产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 结果用 Quantity One 软件测定面积灰度。目的基因相对表达量=目的基因条带灰度/ β -actin 基因条带灰度。

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 (表 1): 两组间性别、年龄、体质量指数 (BMI) 及治疗前急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 有可比性。

表 1 两组严重感染和感染性休克患者一般资料比较

组别	例数	性别 (例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	APACHE II (分, $\bar{x} \pm s$)
		男性	女性			
血必净组	10	5	5	58.6 $\pm$ 26.3	21.5 $\pm$ 5.4	28.9 $\pm$ 3.3
对照组	10	4	6	55.2 $\pm$ 24.5	22.1 $\pm$ 5.2	29.3 $\pm$ 4.9

2.2 两组血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平比较 (表 2): 两组治疗前血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 治疗 3 d 两组血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平均较治疗前下降 (均 $P < 0.05$), 血必净组降低程度较对照组更明显, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.3 两组 TREM-1 mRNA 表达的比较 (图 1): 两组间治疗前 TREM-1 mRNA 比较差异无统计学意义 ($t = 1.235$, $P = 0.138$); 治疗后 3 d 和 5 d 均较治疗前降低; 且血必净组 TREM-1 mRNA 表达较对照组下降更显著, 差异有统计学意义 (3 d: $t = -3.267$, $P = 0.047$; 5 d: $t = -5.072$, $P = 0.032$)。

表 2 两组严重感染和感染性休克患者治疗前后血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	sTREM-1 (ng/L)		TNF- α (ng/L)		IL-6 (ng/L)	
		治疗前	治疗 3 d	治疗前	治疗 3 d	治疗前	治疗 3 d
血必净组	10	191.11 $\pm$ 20.53	146.93 $\pm$ 13.76 ^a	136.57 $\pm$ 19.71	77.51 $\pm$ 11.28 ^a	408.47 $\pm$ 19.55	288.35 $\pm$ 14.59 ^a
对照组	10	193.13 $\pm$ 21.46	176.22 $\pm$ 19.46	140.85 $\pm$ 18.56	107.72 $\pm$ 13.17	407.55 $\pm$ 20.58	323.89 $\pm$ 24.51
t 值		0.126	-5.442	-0.512	-4.355	0.139	-3.941
P 值		0.263	0.033	0.316	0.032	0.237	0.028

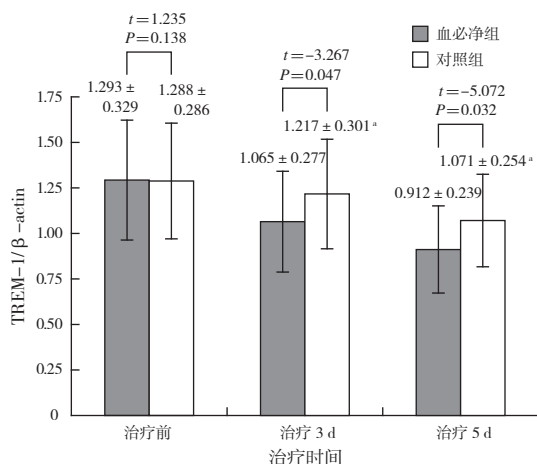
注:与本组治疗前比较,^aP<0.05

图 1 两组严重感染和感染性休克患者治疗前后 TREM-1 mRNA 表达的变化比较

3 讨论

机体在对病原微生物防御反应中产生炎症因子的大量释放和调控失调是引起严重感染、感染性休克甚至多器官功能衰竭的重要原因^[8-9]。TNF- α 、IL-6 是全身炎症反应综合征 (SIRS) 中产生的主要炎症介质,介导了多种器官功能损伤,而 TREM-1 是二者上游信号转导中的重要环节,在激发和扩大炎症反应中的作用日益受到关注^[10]。TREM-1 在结构上含有 1 个胞外 Ig 样结构域,跨膜区 1 个带正电荷的赖氨酸残基,与接头蛋白 DAP12 相互作用^[11]。TREM-1 可分为膜表面型 TREM-1 (mTREM-1) 和 sTREM-1 两种形式。sTREM-1 是 TREM-1 mRNA 剪接突变体编码的无跨膜区的分泌性蛋白质,在感染过程中特异性释放入血,已成为反映炎症的重要指标^[12-13]。Jiyong 等^[14]所做的荟萃分析 (Meta 分析) 认为, sTREM-1 对于诊断细菌感染的敏感性为 0.82 [95% 可信区间 (95%CI) 为 0.68 ~ 0.90], 特异性为 0.86 (95%CI 为 0.77 ~ 0.91)。有研究显示血浆 sTREM-1 水平与序贯器官衰竭评分 (SOFA) 呈正相关,随病程进展,生存组患者 sTREM-1 呈进行性下降,死亡组则呈上升趋势,说明 sTREM-1 水平在

一定程度上能反映脓毒症的严重程度^[15]。Logistic 回归分析显示, sTREM-1 为影响预后的危险因素之一 [相对比值比 (OR) =

0.893, $P=0.003$]^[5]。Zhang 等^[12]也发现 sTREM-1 较 C-反应蛋白 (CRP) 和降钙素原 (PCT) 对于脓毒症的预测更准确,并且其动态改变可以反映病情严重程度。Kamei 等^[16]研究发现 sTREM-1 在急性胰腺炎患者显著升高,并与疾病严重程度和早期器官功能障碍的发生呈正相关,通过应用化学合成的 TREM-1 阻滞剂酰胺多肽 LP17 治疗胰腺炎,可改善大鼠器官功能障碍,提示 TREM-1 是潜在的抗炎治疗靶点。

本研究结果显示,两组严重感染和感染性休克患者治疗前血浆 sTREM-1 水平和 TREM-1 mRNA 显著高于正常值。研究发现, TREM-1 对炎症反应的放大效应主要是与 TLR 和 / 或 NOD 样受体 (NLR) 相互作用^[17]。LPS 是 TLR4 的主要配体,与其结合激活核转录因子- κ B (NF- κ B) 和丝裂素活化蛋白激酶 (MAPKs),引发多种炎症因子的释放,诱发炎症反应。TREM-1 分子活化后能够使 TLR4 受体集中到 TREM-1 受体附近,增加 TLR4 信号途径关键的受体和效应蛋白的表达,从而放大 TLR4 受体活化所致的炎症反应;同时 TLR4 受体活化,其效应蛋白如 TNF- α 及 IL-1 β 等又能明显上调 TREM-1 分子在细胞表面的表达,从而与相关的炎症因子之间形成“自分泌环”放大效应,诱发“瀑布样”炎症反应的发生^[18-19]。还有研究表明,在敲除 TREM-1 的情况下,TLR4 的炎症反应明显减弱,但较敲除 TLR4 相比,又保留了一定程度的炎症反应,证明了 TREM-1 的“炎症放大器”作用^[20]。因此,对 TREM-1 的调控可起到抑制 TLR4 的作用,从而减少炎症因子产生。mTREM-1 与 sTREM-1 具有相同的胞外区,因此两者均可与相同的配体结合。Gibot 等^[21]给内毒素动物模型注射 mTREM-1/Fc 融合蛋白,发现能抑制 TREM-1 转导通路,从而减少炎症因子的释放并提高实验动物的生存率。本研究中两组患者治疗后 3 d 血浆 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 以及 TREM-1 mRNA 的表达水平较治疗前均同步呈下降趋势,说明在治疗后随着 TREM-1 表达

水平的下降,炎症反应也得到了改善;而血必净组较对照组 sTREM-1、TNF- α 和 IL-6 水平更低,说明血必净在抑制炎症反应中发挥了积极的效应。

血必净注射液的主要成分是红花、赤芍、当归、川芎、丹参等提取物,包括红花黄色素 A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛等,具有拮抗内毒素、下调促炎因子水平、调节免疫反应的作用,并通过保护受损内皮、改善微循环,减轻内毒素攻击所致的组织损伤,对内毒素诱发脓毒症的器官损伤具有明显的保护作用^[22]。研究报道,血必净注射液可以缩短脓毒症病程及减轻症状,减少多器官功能障碍的发生率及死亡率^[23],改善促炎反应与抗炎反应失衡,改善患者的器官功能及预后的作用^[24]。研究认为脓毒症主要是由炎症反应、凝血活化及纤溶抑制相互作用形成的级联反应过程,而血必净注射液可以降低血小板颗粒膜糖蛋白 140 (CD62P)、血栓前体蛋白 (TpP),下调血栓调节蛋白 (TM) 和血管性血友病因子 (vWF) 表达,改善异常的高凝病理状态,阻断脓毒症的发展^[25]。陆地等^[26]认为,血必净注射液可能通过下调 TLR4 蛋白及 TLR4 mRNA 水平抑制下游细胞因子的释放。本研究使用了中等剂量的血必净注射液治疗,观察到患者 TREM-1 的表达和炎症因子水平均有所下降,炎症反应得到了一定的改善,说明血必净注射液对炎症反应的抑制作用机制之一可能是下调 TREM-1 或者是其上游分子的表达,从而影响 TLR4 的表达和 TNF- α 、IL-6 的产生。

由于本研究仍存在局限性,主要是样本量较小,患者病因较多,炎症反应严重程度也不同,因此对于血必净注射液抑制炎症反应的机制途径仍值得进一步探讨。

参考文献

- Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers : a review. Crit Care, 2010, 14 (1) : R15.
- Ventetulo CE, Levy MM. Biomarkers : diagnosis and risk assessment in sepsis. Clin Chest Med, 2008, 29 (4) : 591-603.
- Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells) : a new player in acute inflammatory responses. J Infect Dis, 2003, 187 Suppl 2 : S397-401.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge : inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. J Immunol, 2000, 164 (10) : 4991-4995.
- 孙洁,宋诗铨,赵华杰. 脓毒症患者血清可溶性髓系细胞表达的触发受体-1 水平及与预后的关系. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (5) : 305-308.
- 邱海波,刘大为. 《2004 严重感染和感染性休克治疗指南》系列讲座 (1) 2004 严重感染和感染性休克治疗指南概要. 中国危重病急救医学, 2004, 16 (7) : 390-393.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock : 2008. Intensive Care Med, 2008, 34 (1) : 17-60.
- Herzum I, Renz H. Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock. Curr Med Chem, 2008, 15 (6) : 581-587.
- Vincent JL. Clinical sepsis and septic shock--definition, diagnosis and management principles. Langenbecks Arch Surg, 2008, 393 (6) : 817-824.
- Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. Curr Opin Immunol, 2009, 21 (1) : 38-46.
- Derive M, Massin F, Gibot S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a new therapeutic target during inflammatory diseases. Self Nonsell, 2010, 1 (3) : 225-230.
- Zhang J, She D, Feng D, et al. Dynamic changes of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) reflect sepsis severity and can predict prognosis : a prospective study. BMC Infect Dis, 2011, 11 (1) : 53.
- Latour-Pérez J, Alcalá-López A, García-García MA, et al. Prognostic value of the sTREM-1 plasma values in patients with sepsis : a cohort study. Med Intensiva, 2010, 34 (4) : 231-236.
- Jiyong J, Tiancha H, Wei C, et al. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bacterial infection : a meta-analysis. Intensive Care Med, 2009, 35 (4) : 587-595.
- 王洪霞,李真玉. 脓毒症患者血浆可溶性髓系细胞表达的触发受体-1 水平及意义. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (5) : 283-285.
- Kamei K, Yasuda T, Ueda T, et al. Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in experimental severe acute pancreatitis. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010, 17 (3) : 305-312.
- Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, et al. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex. Eur Cytokine Netw, 2011, 22 (1) : 11-14.
- Haselmayer P, Daniel M, Tertilt C, et al. Signaling pathways of the TREM-1- and TLR4-mediated neutrophil oxidative burst. J Innate Immun, 2009, 1 (6) : 582-591.
- Zanzinger K, Schellack C, Nausch N, et al. Regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression on mouse inflammatory monocytes. Immunology, 2009, 128 (2) : 185-195.
- Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. Immunobiology, 2008, 213 (9-10) : 701-713.
- Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1 : its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. Ann Intern Med, 2004, 141 (1) : 9-15.
- 汪慧珍,饶红霞. 血必净注射液治疗脓毒症药理作用研究进展. 中外医学研究, 2010, 8 (8) : 37-38.
- 吴彩军,李春盛. 中药注射液血必净对感染性休克犬促凝物质的影响. 中华急诊医学杂志, 2009, 18 (2) : 140-143.
- 武子霞,李银平,乔佑杰,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠器官功能及死亡率的影响. 天津中医药大学学报, 2007, 26 (2) : 68-70.
- 耿平,夏仲芳,顾健,等. 血必净注射液对严重脓毒症患者早期高凝状态的干预作用. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (6) : 346-349.
- 陆地,茅尧生,吕铁,等. 血必净注射液对重症脓毒症患者 Toll 样受体 4 及下游细胞因子的影响. 中华中医药学刊, 2011, 29 (4) : 776-779.

(收稿日期: 2013-06-20)

(本文编辑: 李银平)