参考文献

[1] 余善法. 充分认识职业紧张危害加强职业紧张预防与管理[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32(2): 81 – 82.
[2] 刘继同, 严俊, 孔灵芝. 生物医学模式的战略升级与精神健康工作的战略地位[J]. 福建论坛 · 人文社会科学版, 2010, (3): 141 – 145.
[3] 涂玲, 张新庆. 我国医务工作者心理健康现状及分析[J]. 医学与哲学, 2009, 30(7): 44 – 46.
[4] Kucukalić A, Bravo-Mehmedbasić A, Dzubur-Kulenović A, et al. Specific differences in trauma related symptoms between the refugees survivors of torture and refugees of war[J]. Psychiatria Danubina, 2004, 16(1 – 2): 55 – 60.
[5] 刘寒, 朱紫青. 上海市某大型国企职工一般心理健康(GHQ)调查分析[J]. 中国医药导报, 2011, 8(11): 144 – 146.
[6] 许筱伦. 传染科患者症状自评得分与全国常模比较分析[J]. 当代护士, 2013(6): 118 – 119.
[7] 李立明. 不同地区人群精神心理健康状况的流行病学调查[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 254.
[8] 王丽, 冯景丽, 高红萍, 等. 包头市医务人员职业紧张及健康状况分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(8): 1055 – 1056.
[9] 艾素梅. 医生职业紧张状况及相关因素分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(8): 1106 – 1107.
[10] 高菲, 赵雪, 刘利, 等. 医生职业紧张、工作倦怠、抑郁症状关系的研究[J]. 实用预防医学, 2012, 19(11): 1612 – 1614.

收稿日期: 2014 – 11 – 19　(张翠编辑　刘铁校对)

· 实验研究 ·

TLR2 及其相关细胞因子在军团菌感染中作用*

张帆, 王素萍, 高向东, 邬惟为, 董洁敏

摘　要: 目的　通过体外实验探讨 Toll 样受体 2(TLR2)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素 1β(IL-1β)、白介素 6(IL-6)在军团菌感染中的作用。**方法**　分离 30 名健康人外周血单核细胞(PBMC), 将每名健康人 PBMC 分为对照组和军团菌刺激组, 军团菌刺激组加入 500 μL 2×10^7/mL 军团菌悬液, 对照组加入 500 μL 磷酸盐缓冲液(PBS), 分别在 18、24、72 h 时获取细胞及上清液, 采用 real-time PCR 法测定细胞中 TLR2、MyD88 mRNA 的表达水平, ELISA 法检测细胞培养上清液 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 含量。**结果**　与对照组比较, 18h 军团菌刺激组 MyD88 mRNA △Ct 值(1.414 0 ± 0.044 9)低于对照组(1.684 4 ± 0.042 6), 24h 军团菌刺激组 TLR2 mRNA △Ct 值(1.347 9 ± 0.056 2)低于对照组(1.425 9 ± 0.038 7), 72h 军团菌刺激组 TLR2 mRNA 和 MyD88 mRNA △Ct 值[(1.504 9 ± 0.018 9)和(1.540 0 ± 0.031 9)]均高于对照组[(1.410 5 ± 0.025 5)和(1.339 2 ± 0.032 2)], 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 18、24、72h 军团菌刺激组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 浓度均高于对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论**　TLR2 及 TNF-α、IL-1β、IL-6 等相关炎性因子可有效抵制军团菌感染, TLR2 介导的天然免疫可能是军团菌感染的保护因素。

关键词: Toll 样受体 2(TLR2); 肿瘤坏死因子-α(TNF-α); 白介素 1β(IL-1β); 白介素 6(IL-6); 军团菌; 感染
中图分类号: R 563　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2015)04-0441-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-04-17

Role of TLR2 and its related cytokines in *Legionella* infection

ZHANG Fan, WANG Su-ping, GAO Xiang-dong, et al (*Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province* 030001, China.)

Abstract: Objective　To explore the role of Toll like receptor 2(TLR2) and its related cytokines in *Legionella* infection by *in vitro* experiment. **Methods**　Peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were obtained from healthy subjects($n = 30$) and were stimulated with live *Legionella pneumophila*(Lp) for 18, 24, and 72 hours. The mRNA expression levels of TLR2 and myeloid differentiation factor 88(MyD88) in PBMCs were determined using real-time reverse transeription PCR(RT-PCR). The expression levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), and interleukin-6(IL-6) were measured with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results**　TLR2 mRNA expression level was not significantly different between stimulation group and control group in 18 hours($P > 0.05$). TLR2 mRNA expression level of stimulation group was significantly higher than that of control group(1.3479 ± 0.0562 vs. 1.4259 ± 0.0387, $P < 0.05$) in 24 hours. The MyD88 mRNA expression level of stimulation group was significantly higher than that of control group(1.4140 ± 0.0449 vs. 1.6844 ± 0.0426, $P < 0.05$) in 18 hours. The MyD88 mRNA expression level was not statistically significantly different between stimulation group and control group in 24 hours($P > 0.05$). TLR2 mRNA and MyD88 mRNA expression levels of stimulation group were significantly lower than those of control group($P < 0.05$) in 72 hours. The concentration of TNF-α, IL-1β and IL-6 for *Legionella* stimulation group were significantly

* **基金项目:** 国家自然科学基金(30872154); 高等学校博士学科点专项科研基金(20040114004)
作者单位: 山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 山西 太原 030001
作者简介: 张帆(1971 –), 女, 山西太原人, 副教授, 博士, 研究方向: 感染免疫。
通讯作者: 王素萍, E-mail: spwang88@163.com
数字出版日期: 2015 – 3 – 16 11:09
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150316.1109.008.html

higher than those of the control group ($P < 0.05$) in 18, 24 and 72 hours. **Conclusion**　Our study showed that TLR2 and its related inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and IL-6 can effectively resist *Legionella* infection and TLR2 mediated innate immunity may be a protective factor for *Legionella* infection.

Key words: Toll like receptor 2; TNF-α; IL-1β; IL-6; *Legionella pneumophila*; infection

军团菌病是 1976 年发现的以群体发热及非典型肺炎为基本特征的急性呼吸道传染病。嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, LP)是引起非典型肺炎的重要病原菌[1]。Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)可识别并结合不同细菌或病毒的分子结构,启动机体天然免疫清除病原微生物[2]。TLR 识别配体后通过髓样细胞分化蛋白 MyD88 依赖性途径向胞内传递信号,产生炎症因子如白介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)、白介素 6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等激活天然免疫系统[3]。研究发现 MyD88 缺陷的小鼠丧失了对 TLR 配体的反应能力,表明 MyD88 在 TLR 信号传导中的作用非常重要[4]。目前 TLR 在军团菌天然免疫中的作用还未明确,本研究通过体外实验分析军团菌刺激健康人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)后 TLR2 及其相关细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)的表达,初步探讨 TLR2 在识别和清除军团菌中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料　PBMC 分离自山西省太原市红十字血液中心提供的 30 名健康人外周血;嗜肺军团菌血清 1 型 ATCC 33152 购自美国标准菌种保藏所。

1.2　主要试剂　人淋巴细胞分离液(美国 Sigma 公司);改良型 RPMI-1640 培养基(美国 Thermo 公司);RNAisoTM Plus 总 RNA 提取试剂(TaKaRa D9108A 宝生物大连有限公司);二乙基焦碳酸酯(diethylprocarbonate, DEPC)(美国 Sigma 公司);RT-PCR 一步法试剂盒(TaKaRa DRRO86A 宝生物大连有限公司);ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.3　菌种复苏　从 −80 ℃低温冰箱将军团菌取出,用无菌环挑取菌落,接种于军团菌 BCYE 培养基,37 ℃、5% CO_2 培养 3 ~ 4d,可观察到军团菌的灰白色菌落。用磷酸盐缓冲液(Phosphate bufferred saline, PBS)制备军团菌悬液,在 A600 的条件下测定军团菌的浓度。

1.4　外周血单核细胞分离及军团菌处理　用密度梯度离心法分离健康人 PBMC,台盼兰染色计数活细胞数,以每孔 2×10^6 个细胞接种于 24 孔板,于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h。将每名健康人 PBMC 分为对照组和军团菌刺激组,军团菌刺激组加入 500 μL 2×10^7/mL 军团菌悬液,对照组加入 500 μL PBS。孵育 2h 待军团菌进入贴壁细胞后,弃上清,用 1mL PBS 溶液清洗后,加入 1mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液继续培养。分别在 24、48、72 h 时收获细胞及上清液用于后续实验,2 组分别做复孔。

1.5　Real-time PCR 技术检测细胞中的 TLR2 mRNA 和 MyD88 mRNA 的表达水平　参照 RNAisoTM Plus 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,按一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。PCR 引物由大连宝生物工程有限公司设计并合成。TLR2 上游引物:5′-GGAGCATCCGAATTGCATCAC-3′,下游引物:5′-TTATGGCCACCAAGATCCAGAAG-3′;MyD88 上游引物:5′-AAGATGACCCTGGGAGCCCTA-3′,下游引物 5′-GCTCAGGCCAGTCATCATTGAA-3′;β-actin 上游引物:5′-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3′,下游引物:5′-TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG-3′。PCR 反应体系为 25μL。Real time PCR 反应条件:反转录反应 42 ℃ 5min, 95 ℃ 10 s, PCR 反应条件 95 ℃ 5s, 60 ℃ 30 s,循环 40 次;绘制溶解曲线 95 ℃ 15 s, 60 ℃30 s, 95 ℃ 15 s。荧光信号由本底进入指数增长阶段达到荧光阈值所对应的循环数称为 Ct 值,用 △Ct = Ct 样品/Ct β-actin 反应每个样品中 mRNA 的相对表达水平,此值越大,表示其 mRNA 表达越少。TLR2 扩增片段 116 bp, MyD88 扩增片段 131 bp, β-actin 扩增片段 150 bp。

1.6　ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量　按照 ELISA 说明书步骤分别检测细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平。

1.7　统计分析　数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析、t 检验和秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　不同组别 TLR2 mRNA 及 MyD88 mRNA 表达比较(表 1)　与对照组比较, 18h 军团菌刺激组 MyD88 mRNA 和 24h 军团菌刺激组 TLR2 mRNA △Ct 值均低于对照组(均 $P < 0.05$);72h 军团菌刺激组 TLR2 mRNA 和 MyD88 mRNA △Ct 值均高于对照组(均 $P < 0.05$)。

表 1　不同组别 TLR2 mRNA 及 MyD88 mRNA 表达比较

时间(h)	TLR2 mRNA △Ct 值		MyD88 mRNA △Ct 值	
	对照组	军团菌刺激组	对照组	军团菌刺激组
18	1.528 2 ± 0.052 9	1.668 2 ± 0.088 1	1.684 4 ± 0.042 6	1.414 0 ± 0.044 9[a]
24	1.425 9 ± 0.038 7	1.347 9 ± 0.056 2[a]	1.357 1 ± 0.037 2	1.372 1 ± 0.033 1
72	1.410 5 ± 0.025 5	1.504 9 ± 0.018 9[a]	1.339 2 ± 0.032 2	1.540 0 ± 0.031 9[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$。

2.2　不同组别 TNF-α、IL-1β、IL-6 浓度比较（表 2）　与对照组别比较，18、24、72h 军团菌刺激组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 浓度均高于对照组，差异均有统计学意义（ <0.05）。

表 2　不同组别 TNF-α、IL-1β、IL-6 浓度比较

时间(h)	TNF-α		IL-1β		IL-6	
	对照组	军团菌刺激组	对照组	军团菌刺激组	对照组	军团菌刺激组
18	951.99 ± 296.78	1 585.6 ± 841.75[a]	256.54 ± 70.92	1 039.4 ± 620.01[a]	1 558.5 ± 1 253.2	3 277.5 ± 2 139.4[a]
24	486.63 ± 321.39	905.93 ± 502.16[a]	1 494.8 ± 1 218.9	2 001.7 ± 1 442.7[a]	2 134.2 ± 1 478.7	4 739.5 ± 2 566.2[a]
72	794.37 ± 340.15	958.89 ± 396.73[a]	143.69 ± 126.46	547.29 ± 195.36[a]	1 427.0 ± 927.46	2 533.9 ± 1455.9[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$。

3　讨　论

军团菌肺炎在非典型肺炎中是病情最重的一种，一般人群病死率为 1% ~25%，医院感染病例可高达 30% ~50%[5]。WHO 已将其列入传染病报告范围，其生物危害和社会危害大，是防制突发公共卫生事件不可忽视的重要问题。LP 是胞内菌，常通过气溶胶感染人群，侵犯肺泡上皮细胞及巨噬细胞并在其中增殖最终导致机体感染。目前利用 TLR 基因缺失的小鼠模型来研究 TLR 与军团菌感染关系中最多的是 TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR9[6-7]。本研究通过体外实验用军团菌刺激人 PBMC，测定 TLR2 及其重要的信号转导分子 MyD88 的表达，结果显示 18h 军团菌刺激组 MyD88 mRNA 及 24h 军团菌刺激组 TLR2 mRNA △Ct 值在均低于对照组，提示 TLR2 及 MyD88 的 mRNA 表达量在一定时间内高于对照组，初步说明 TLR2 及其信号转导分子 MyD88 参与了军团菌的天然免疫过程。Girard 等[8]发现军团菌 LPS 具有独特的结构如脂肪酸链的长度、缺少负电荷、具有疏水的外核等，其内毒素活性较大肠埃希菌 LPS 弱。TLR4 并不是能够识别所有的革兰阴性菌，由于军团菌 LPS 的特殊疏水性，使其与 TLR4 的结合较差，而主要被 TLR2 所识别。TLR2 活化后可产生一系列炎性细胞因子从而激活天然免疫系统，杀伤入侵病原微生物。TNF-α、IL-1β、IL-6 均是由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子，参与正常炎症反应和免疫反应。国内外人群研究均发现嗜肺军团感染者 IL-6、TNF-α、IL-8 和 IL-10 的水平明显升高[9-10]。本研究通过体外实验发现军团菌刺激组 TNF-α、IL-1β、IL-6 的浓度在 18、24 和 72h 均高于对照组，提示当 TLR2 识别并且结合军团菌后，会激活 MyD88 依赖的信号转导通路产生相应细胞因子，参与军团菌的清除。本研究通过体外实验用军团菌刺激健康人 PBMC，模拟体内的感染过程，结果发现军团菌能够在一定时间范围内诱导细胞 TLR2 及 MyD88 表达和相关细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的升高，从而有效抵制军团菌感染，提示 TLR2 介导的天然免疫可能是军团菌感染的保护因素，可为今后的研究提供有益的参考。

参考文献

[1] Diederen B. *Legionella spp*. and Legionnaires′disease[J]. Journal of Infection, 2008, 56: 1 – 12.

[2] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(3): 179 – 190.

[3] 余益本，王建平. TLR 信号通路研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2012，28(12)：1331 – 1334.

[4] Baccala R, Hoebe K, Kono DH, et al. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity[J]. Nat Med, 2007, 13(5): 543 – 551.

[5] Anbumani S, Gururajkumar A, Chaudhury A, et al. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical and environmental sources in a tertiary care hospital[J]. Indian J Med Res, 2010, 131: 761 – 764.

[6] Akamine M, Higa F, Arakaki N, et al. Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in *in vitro* responses of macrophages to *Legionella pneumophila*[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(1): 352 – 361.

[7] Braedel-Ruoff S, Faigle M, Hilf N, et al. *Legionella pneumophila* mediated activation of dendritic cells involves CD14 and TLR2[J]. Innate Immunity, 2005, 11(2): 89 – 96.

[8] Girard R, Pedron T, Uematsu S, et al. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 2): 293 – 302.

[9] Fernández-Serrano S, Dorca J, Coromines M, et al. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(5): 813 – 820.

[10] 任吉莲，王桂琴. TNF-β、IL-6、IL-8 和 sICAM-1 与嗜肺军团菌感染关系的研究[J]. 中国微生态学杂志，2008，4(20)：178 – 179.

收稿日期：2013-03-28　（郭薇编辑　刘铁校对）

中国公共卫生 CPH