食管癌围手术期 TLR4 表达与术后急性肺损伤的关系

杜 琎, 石开虎*, 胡定辉, 李 航, 刘尊涛, 王 炜
(南京中医药大学附属中西医结合医院 心胸外科, 江苏 南京 210028)

[摘 要] **目的:** 探讨食管癌围手术期 Toll 样受体 4(TLR4)表达与术后急性肺损伤(ALI)的关系。**方法:** 选取行手术治疗的 45 例食管癌患者,根据术后是否发生 ALI 分为 ALI 组和无 ALI 组,比较两组患者临床资料及手术相关指标,分别于手术单肺通气前(T1)、单肺通气 90 min(T2)、单肺通气转为双肺通气后 30 min(T3)、术后 24 h(T4)时采集中心静脉血,以流式细胞仪检测血浆 TLR4 的表达,同时检测血清中 IL-1β、IL-8、TNF-α 炎症因子的浓度,分析 TLR4 及炎症因子的表达与急性肺损伤的关系。**结果:** 有 12 例患者术后发生 ALI,其发生与患者的年龄、术前肺功能、手术时间、单肺通气时间、术中出血量有关;ALI 患者围手术期 T2、T3、T4 时间点的 TLR4 表达显著上调,相应时间点的 IL-1β、IL-8、TNF-α 浓度也明显升高。**结论:** 食管癌围手术期 TLR4 的高表达与术后急性肺损伤密切相关。

[关键词] 食管肿瘤; 外科手术; Toll 样受体 4; 急性肺损伤; 围手术期
[中图分类号] R619.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)08-0988-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.026

The Relationship between the Expression of TLR4 of Esophagus Cancer in the Perioperative Period and Postoperative Acute Lung Injury

DU Jin, SHI Kaihu, HU Dinghui, LI Hang, LIU Zuntao, WANG Wei
(*Department of Cardiothoracic Surgery, The Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the relationship between the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) of esophagus cancer in the perioperative period and postoperative acute lung injury (ALI). **Methods**: 45 patients with esophagus cancer who received operative treatment in the hospital from Jan. of 2014 to Apr. of 2017 were selected as objects of the study, and the statistical analysis on relevant preoperative and intraoperative clinical indicators was performed, then the patients were divided into two groups based on whether it had postoperative ALI: Group A (the group with ALI) and Group B (the group without ALI). And the central venous blood was collected before the operation of one-lung ventilation (T1), 90 min after one-lung ventilation (T2), 30min after transferring from one-lung ventilation to two-lung ventilation (T3), 24 h after operation (T4), and the expression of TLR4 was detected by use of flow cytometer, meanwhile the concentrations of inflammatory factors (IL-1β, IL-8, TNF-α) in the serum were detected, thereby the relationship between the expressions of TLR4 and inflammatory factors and ALI was observed and analyzed. **Results**: ALI occurred in 12 cases, and it was associated with patients' age, preoperative lung function, operation time, time of one-lung ventilation and intraoperative amount of bleeding. TLR4 showed a significantly up-regulated expression in T2, T3

*通信作者 E-mail:aytcs@vip.163.com
网络出版时间:2018-08-21 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.026.html

and T4, and the concentrations of IL-1β, IL-8, TNF-α at these time points also showed an obvious increase. **Conclusion**: The high expression of TLR4 of esophagus cancer in the perioperative period is closely related to postoperative ALI.

[**Key words**] esophagus neoplasms; operation; Toll-like receptor 4; acute lung injury; perioperative period

食管癌是常见的恶性肿瘤,全世界每年约新发48 万病例,死亡约 30 万人,位居恶性肿瘤死亡率的第 6 位,治疗方案是以手术治疗为主的综合治疗[1-2]。食管癌手术创伤较大,术后常伴有严重并发症,肺部并发症是主要死亡原因[3]。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)在食管癌术后并发症中出现最早,往往进一步发展为急性呼吸窘迫综合症(acute respiratory distress syndrome, ARDS),患者出现顽固性低氧血症及肺部广泛浸润性改变,病死率超过 30%[4]。因此,阐明食管癌术后 ALI 的机制,控制其发展、减轻肺损伤成为食管癌术后治疗的关键。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)的一种, 是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,能够识别来源于微生物的具有保守结构的分子并激活机体产生免疫应答,在机体炎症反应、缺血再灌注损伤等过程中有重要意义[5-6]。在 TLRs 受体中,TLR4 参与多种炎症的跨膜信号转导过程,与肺机械性损伤、缺血再灌注损伤、肺部感染、肺纤维化的发生发展关系密切[7]。目前虽有食管癌术后 ALI 的相关研究,但对于 TLR4 与食管癌术后 ALI 的关系却未见相关报道。因此,本研究选用 45 例食管癌手术病例,分析围手术期 TLR4 及相关炎症因子的表达变化与术后 ALI 的联系,初步探讨食管癌术后 ALI 的发生机制,为早期防治术后肺损伤提供依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料

择取 2014 年 1 月 ~2017 年 4 月收治手术的食管癌患者 45 例,男 36 例、女 9 例,平均年龄(65.2 ±8.4)岁,平均病变长度为(4.3 ±2.6)cm。所有患者术前均行胃镜检查并经病理证实为食管癌或贲门癌,其中鳞状细胞癌 42 例、腺癌 3 例。肿瘤位置位于食管上段者 3 例、中段 28 例、下段及贲门癌 14 例。所有患者均按照临床路径进行术前检查和准备,包括呼吸功能锻炼、雾化吸入及术前预防性使用抗生素等呼吸道准备,其中 15 例行完全胸腹腔镜下食管癌根治术,20 例行左进胸单切口食管癌根治术,7 例行上腹部正中、右胸后外侧切口(Ivor-Lewis 术式),3 例行上腹部正中、右胸后外侧、颈部三切口(McKeown 术式)。根据术后是否发生 ALI 将患者分为 ALI 组和无 ALI 组,收集两组患者的性别、年龄、吸烟指数、术前第 1 秒用力肺活量(FEV1)、最大通气量(MVV)、术前动脉血气氧分压、二氧化碳分压、手术时间、单肺通气时间及术中出血量等相关指标。

1.2　标本的收集与处理

分别于单肺通气前(T1)、单肺通气 90 min 时(T2)、单肺通气转为双肺通气后 30 min 时(T3)、术后 24 h(T4)4 个时间点采取两组患者的中心静脉血 4 mL,2 mL 用于流式细胞仪检测 TLR4 水平,另 2 mL 用于检测 IL-1β、IL-8、TNF-α 水平。

1.3　标本的检测

1.3.1　TLR4 表达的检测　(**1**)血液标本使用 EDTA 抗凝管保存,充分混匀后置于 4 ℃冰箱保存;(**2**)取 EDTA 抗凝血液标本 100 μL 加入单克隆抗体 anti-human TLR4、APC anti-human CD14(美国 EB 公司)各 20 μL,阴性对照标本不加以上抗体,而加入对照试剂 IgG PE(美国 EB 公司)10 μL;(**3**)充分混匀,室温避光染色 30 min;(**4**)加入红细胞裂解液 2 mL,避光静置 15 min 后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;(**5**)加入 1% 多聚甲醛 100 μL,流式细胞仪测定 TLR4 表达百分率。

1.3.2　炎症因子的检测　采用 ELISA 试剂盒检测血清标本中 IL-1β、IL-8、TNF-α 的浓度。

1.4　ALI 诊断标准

术后 7 d 内,观察 ALI 的发生情况,ALI 的诊断标准根据 1994 年欧美联席会议制定:(**1**)急性起病,(**2**)胸部 X 线摄片双肺浸润,(**3**)肺动脉楔压 < 2.5 kPa(19 mmHg)或无充血性力衰竭的临床证据,(**4**)PaO_2/FiO_2 <40 kPa(300 mmHg)。

1.5 统计学处理

选择统计学软件包 SPSS 19.0 进行数据处理，临床计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示，数据比较采用单因素方差分析，组间比较采用独立样本 t 检验；两变量之间的的相关性采用 Spearman 相关分析。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

45 例患者均手术顺利，其中有 12 例符合术后 ALI 诊断标准，发生率为 26.7%。有 2 例患者于进食后出现颈部吻合口瘘，经治疗后愈合，其余均无严重并发症发生。

2.2 术前临床资料

术前患者相关临床资料比较显示，ALI 组患者的年龄偏大，术前肺功能 FEV1 及 MVV 较无 ALI 组偏低，差异有统计学意义($P < 0.05$)，其余资料比较差异无统计学意义，见表 1。

表 1　两组食管癌患者临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Clinical data comparison of two groups

临床资料	ALI 组	无 ALI 组
性别(男/女)	9/3	27/6
年龄(岁)	64.6 ± 9.6(1)	57.3 ± 6.3
吸烟指数(支/年)	260.0 ± 160.0	272.0 ± 173.0
FEV1(%)	86.8 ± 18.6(1)	95.5 ± 20.1
MVV(%)	80.2 ± 24.3(1)	89.4 ± 22.7
氧分压(mmHg)	87.2 ± 8.9	84.3 ± 7.7
CO_2(mmHg)	32.1 ± 4.8	30.6 ± 5.6

(1) 与无 ALI 组比较，$P < 0.05$

2.3 手术相关指标

两组患者手术相关指标比较，ALI 组患者的手术时间、单肺通气时间、术中出血量明显多于无 ALI 组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；淋巴结清扫数量及术后 24 h 引流量比较，差异无统计学意义，见表 2。

2.4 围术期不同时点血浆 TLR4 表达

围手术期血浆 TLR4 表达结果显示，两组食管癌患者 TLR4 表达在手术开始后均有上升趋势，ALI 组上升趋势明显，T2 和 T3 时间点的 TLR4 表达明显高于无 ALI 组，差异有统计学意义 $P < 0.05$，见表 3。

表 2　两组食管癌患者手术相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　Surgical related indexes of two groups

指标	ALI 组	无 ALI 组
手术时间(min)	260.7 ± 80.2(1)	223.2 ± 76.5
单肺通气时间(min)	133.6 ± 25.2(1)	105.1 ± 20.7
术中出血量(mL)	460.6 ± 267.1(1)	309.1 ± 252.8
淋巴结清扫(枚)	24.5 ± 4.3	25.4 ± 3.9
术后 24 h 引流量(mL)	402.9 ± 247.7	382.6 ± 277.1

(1) 与无 ALI 组比较，$P < 0.05$

2.5 围术期不同时点血清 IL-1β、IL-8、TNF-α 水平

两组患者围手术期血清 IL-1β、IL-8、TNF-α 的浓度均逐渐升高，以 T2、T3 时间点最为明显，ALI 组患者的血清 IL-1β、IL-8、TNF-α 升高幅度明显高于无 ALI 组，差异有统计学意义 $P < 0.05$，见表 4。

表 3　两组食管癌患者围术期不同时点血浆 TLR4 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3　The expression of TLR4 in two groups

检测时间点	TLR4 表达(%)	
	ALI 组	无 ALI 组
T1	20.4 ± 15.9	19.7 ± 16.3
T2	50.1 ± 25.7(1)(2)	22.6 ± 15.3
T3	54.4 ± 23.9(1)(2)	24.1 ± 16.2
T4	34.7 ± 15.6(2)	30.3 ± 17.5(2)

(1) 与无 ALI 组比较，$P < 0.05$；(2) 与 T1 时点比较，$P < 0.05$

表 4　两组食管癌患者围术期各时间点 IL-1β、IL-8 及 TNF-α 水平($\bar{x} \pm s$，ng/L)

Tab. 4　IL-1β、IL-8 and TNF-α of two groups at different time points

组别	时间	血清		
		IL-1β	IL-8	TNF-α
ALI 组	T1	58.4 ± 5.9	35.8 ± 8.9	15.1 ± 4.7
	T2	152.2 ± 9.2(1)(2)	130.7 ± 7.6(1)(2)	70.5 ± 3.5(1)(2)
	T3	130.7 ± 8.7(1)(2)	109.5 ± 7.2(1)(2)	45.3 ± 3.7(2)
	T4	72.3 ± 5.8	70.1 ± 10.3(1)(2)	39.8 ± 3.1(1)(2)
无 ALI 组	T1	55.2 ± 4.7	37.7 ± 5.4	19.1 ± 5.5
	T2	80.1 ± 10.1(2)	77.1 ± 6.5(2)	40.3 ± 6.1(2)
	T3	82.8 ± 9.7(2)	60.4 ± 6.1(2)	39.9 ± 4.7(2)
	T4	65.1 ± 11.2	43.3 ± 7.2	23.3 ± 3.1

(1) 与同时点无 ALI 组比较，$P < 0.05$；(2) 与 T1 时点比较，$P < 0.05$

3　讨论

ALI 是胸外科手术的常见并发症,在食管癌手术患者中的发生率约为 15% ~30%,是全身炎症反应综合症(SIRS)的早期表现,部分患者会进一步发展成为 ARDS,病死率接近 50%[8]。食管癌术后 ALI 除与患者年龄、基础肺功能有一定关系外,主要由各类直接或间接的肺损伤导致,包括单肺通气、手术创伤、呼吸机相关性肺损伤、免疫反应、缺血再灌注损伤、输血相关性急性肺损伤等[9]。ALI 的发生机制包括肺血管通透性的改变、血浆和肺内炎症介质的释放、肺部单核细胞和中性粒细胞的激活及补体系统激活后炎性细胞的聚集等。其病理生理特点为肺泡上皮细胞坏死及毛细血管内膜损伤,导致弥漫性肺泡及肺间质水肿,继而发生进行性低氧血症为特点的急性呼吸功能不全。因此,有效控制食管癌术后 ALI 的发展,减轻肺部损伤并减少 ARDS 的发生已经成为针对食管癌手术患者治疗的关键。部分研究表明,TLRs 尤其是 TLR4 作为膜受体门户蛋白能够启动和放大炎症反应,并能通过肺缺血再灌注损伤在急性肺损伤过程中起核心作用[10-11]。TLR4 是一种 I 型跨膜糖蛋白,主要分布于单核 - 巨噬细胞表面,通常被认为是革兰阴性菌外膜上脂多糖的受体,能够识别生物性和非生物性刺激源,在细胞膜上通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88,MyD88)信号传导通路[12]使转录因子 NF-κB 与其抑制分子 I-κB 解离并发生活化,活化的 NF-κB 向细胞核内传导并启动和放大炎症反应,导致多种炎症因子(如 IL-1β、IL-8、TNF-α)大量释放,产生损伤效应[13-15]。

本研究表明患者年龄偏大、术前基础肺功能(FEV1 及 MVV)降低与术后 ALI 的发生密切相关,提示受损的肺功能可能是 ALI 发生的重要影响因素。手术时间、单肺通气时间及术中出血量的增加亦会增加术后 ALI 的风险,原因可能是食管癌手术需要较长的单肺通气时间,单侧肺接受了所有通气和大部分血流,有可能导致通气侧肺泡过度膨胀引起气压伤;术中塌陷侧肺的低氧和低灌注,双肺通气后的缺血再灌注损伤;术中手术操作造成的机械性损伤等均可能引起炎症因子的大量释放,导致术后 ALI 的发生。本研究同时发现,在 ALI 组病人中,TLR4 表达上升趋势明显,在单肺通气 90 min 时(T2)、单肺通气转为双肺通气后 30 min 时(T3)、术后 24 h(T4)时间点均明显高于无 ALI 组,相应时间点的血清 IL-1β、IL-8、TNF-α 的浓度亦明显高于无 ALI 组,这说明各种原因导致的 TLR4 表达上调使患者炎症因子的浓度增加,炎症介质又进一步活化炎症细胞,通过级联瀑布效应加重肺部炎症反应,增大了术后急性肺损伤的可能性。有研究尝试通过 TLR4 信号途径的负性调节来阻断炎症反应的过度放大,从而减轻术后肺损伤,比如目前发现的 TLRs 负性调节因子免疫球蛋白单体 IL-1 相关受体、SIGIRR(TIR8)、短链 MyD88[16]、他汀类药物辛伐他汀[17]、蛋白酶抑制剂乌斯他丁[18-19]和 TLR4 拮抗剂依立托伦(E5564)[10]。

因此,食管癌术后 TLR4 的高表达可能是造成食管癌术后急性肺损伤的重要机制,对围手术期 TLR4 表达的检测可以评估术后 ALI 的风险,及时阻断围手术期 TLR4 的表达能抑制肺组织炎症介质的释放,减轻肺组织的病理损害,有可能达到预防和治疗食管癌术后急性肺损伤的目的,具有重要的临床意义和应用价值。

4　参考文献

[1] ILSON D H. Oesophageal cancer: new developments in systemic therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(6): 525 - 532.

[2] 陈龙奇. 食管癌国际 TNM 分期解读与评价[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(3): 237 - 240.

[3] LICKER M, FANCONNET P, VILLIGER Y, et al. Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery[J]. Current Opinion in Anasthesiology, 2009, 22(1): 61 - 67.

[4] SU C F, KAO S J, CHEN H I. Acute respiratory distress syndrome and lung injury: pathogenetic mechanism and therapeutic implication[J]. World Crit Care Med, 2012, 1(2): 50 - 60.

[5] CHEN R, FU S, FAN XG, et al. Nuclear DAMP complex-mediated RAGE-dependent macrophage cell death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(3): 650 - 655.

[6] KATAOKA H, KONO H, PATEL Z, et al. Evaluation of the contribution of multiple DAMPs and DAMP receptors in cell death-induced sterile inflammatory responses[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104741.

[7] FERRARI R S, ANDRADE C F. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015(189):590987.

[8] BAUDOUIN S V. Lung injury after thoracotomy[J]. Br J Anaesth,2003,91(1):132 - 142.

[9] 陈婷,魏福生,姜敏,等. 胸科手术单肺通气相关性肺损伤机制研究进展[J]. 江西医药, 2017, 52(2): 186 - 188.

[10] 黄继义,刘才文,林建东,等. TOLL 样受体 4 对脂多糖致急性肺损伤大鼠炎症因子的影响[J]. 西南国防医药, 2014, 24(1): 23 - 26.

[11] 赵宁,李华伟,李毅,等. TOLL 样受体 4 在肺缺血再灌注损伤免疫机制调控中作用[J]. 国际免疫医学杂志, 2016, 39(3): 271 - 274.

[12] SENDER V, STAMME C. Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization [J]. Commun Integr Biol, 2014,7(28):e29053.

[13] FU S L, HU Y H, LEE P Y, et al. Dioscorin isolate from dioscorea alata activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 137 - 144.

[14] ZHANG P, SHAO L, MA J. Toll-Like Receptors 2 and 4 predict new-onset atrial fibrillation in acute myocardial infarction patients[J]. Int Heart J, 2018,59(1):64 - 70.

[15] AVLAS O, SRARA S, SHAINBERG A, et al. Silencing cardiomyocyte TLR4 reduces injury following hypoxia [J]. Exp Cell Res, 2016,348(2):115 - 122.

[16] SHAM H P, YU E Y, GULEN M F, et al. SIGIRR, a negative regulator of TLR/IL-1R signaling promotes Microbiota dependent resistance to colonization by enteric bacterial pathogens [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(8): e1003539.

[17] 杨文萍,孔冰冰,赵欣,等. 辛伐他汀对脓毒症小鼠肺损伤的保护作用[J]. 实用药物与临床,2017,(20)07: 733 - 736.

[18] YANG Q, LIU X, LIU M, et al. Ulinastation-mediated protection against zymosan-induced multiple organ dysfunction in rats [J]. Biologicals, 2010, 38(5): 552 - 556.

[19] WANG S Y, Li Z J, WANG X, et al. Effect of ulinastatin on HMGB1 expression in rats with acute lung injury induced by sepsis[J]. Genetics and Molecular Research, 2015,16(2):4344 - 4353.

(2018-01-15 收稿,2018-05-27 修回)

中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 丁廷森