

· 临床论著 ·

# Toll 样受体 5 在类风湿关节炎患者外周血单核细胞中的表达及意义

张雯鑫<sup>1,2</sup>, 熊金河<sup>2</sup>

1. 成都中医药大学医学与生命科学学院, 四川 成都 610075;

2. 遂宁市中心医院风湿免疫科, 四川 遂宁 629000

**摘要:** **目的** 检测类风湿关节炎(RA)患者外周血单核细胞表面 Toll 样受体 5 (TLR5) 表达水平, 探讨其临床意义。**方法** 选取遂宁市中心医院 2017 年 1 月至 2022 年 8 月确诊为 RA 的患者 140 例, 以及健康对照人群 70 例 (正常对照组), RA 患者依据病情活动评分红细胞沉降率 (DAS28-ESR) 分为高疾病活动组 ( $n=70$ ) 以及中低疾病活动组 ( $n=70$ ), 采用流式细胞术检测 3 组外周血单核细胞表面 TLR5 的阳性率, 采用 ROC 曲线分析单核细胞 TLR5 表达对 RA 的预测价值。**结果** 正常对照组、中低活动组和高活动组单核细胞表面 TLR5 阳性率分别为  $(46.99 \pm 5.79)\%$ 、 $(50.80 \pm 5.96)\%$  和  $(58.86 \pm 6.20)\%$ , 3 组比较差异有统计学意义 ( $F=71.550, P<0.01$ )。ROC 曲线分析显示, TLR5 诊断 RA 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.79, 最佳截断值为 49.50%, 敏感性为 72.86%, 特异性为 73.57%。**结论** 外周血单核细胞表达的 TLR5 参与 RA 发病和维持疾病活动, 对 RA 有一定的预测价值。

**关键词:** Toll 样受体; 类风湿关节炎; 单核细胞; 疾病活动; 流式细胞术

**中图分类号:** R593.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2024)03-0379-04

## Expression and significance of Toll-like receptor 5 in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis

ZHANG Wenxin\*, XIONG Jinhe

\* School of Medical and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China

Corresponding author: XIONG Jinhe, E-mail: xiongjinhe 92134@163.com

**Abstract:** **Objective** To examine the expression levels of Toll-like receptor 5 (TLR5) on peripheral blood monocytes in patients with rheumatoid arthritis (RA), and to explore its clinical significance. **Methods** A total of 140 RA patients, along with 70 healthy controls (normal control group) received in Suining Central Hospital from January 2017 to August 2022 were selected. The RA patients were divided into high disease activity group ( $n=70$ ) and moderate-to-low disease activity group ( $n=70$ ) based on the disease activity score 28-erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR). Flow cytometry was used to determine the positive rate of TLR5 on peripheral blood monocytes among three groups. The predictive value of TLR5 expression on monocytes surface for RA was analyzed using receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results** The positive rates of TLR5 on the surface of monocytes in normal control group, moderate-to-low disease activity group and high disease activity group were  $(46.99 \pm 5.79)\%$ ,  $(50.80 \pm 5.96)\%$  and  $(58.86 \pm 6.20)\%$ , respectively, and there was a statistically significant difference among the three groups ( $F=71.550, P<0.01$ ). The area under the ROC curve for TLR5 in diagnosing RA was 0.79, with a cut-off value of 49.50%, sensitivity of 72.86%, and specificity of 73.57%. **Conclusion** The TLR5 expressed on peripheral blood monocytes is involved in the pathogenesis and maintenance of disease activity and has predictive value for RA.

**Keywords:** Toll-like receptor; Rheumatoid arthritis; Monocyte; Disease activity; Flow cytometry

**Fund program:** Sichuan Provincial Health and Family Planning Commission Key Research Project (16ZD049)

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2024.03.011

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会重点研究项目 (16ZD049)

通信作者: 熊金河, E-mail: xiongjinhe 92134@163.com

出版日期: 2024-03-20

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制迄今尚未完全明确,研究显示天然免疫在RA的发病以及病情进展中均发挥重要作用<sup>[1]</sup>。Toll样受体(Toll-like receptor, TLRs)家族是一组介导天然免疫的受体分子,通过识别内源性配体和微生物成分来参与抗感染、抗肿瘤等免疫反应。研究显示TLRs与多种免疫性及炎症性疾病有关<sup>[2-6]</sup>。TLR5主要表达在上皮细胞、未成熟树突状细胞以及单核/巨噬细胞表面,当与相应受体结合后会激活核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),进而刺激炎症因子的分泌<sup>[7]</sup>参与炎症反应。研究显示TLR5在RA患者单核细胞中表达升高,但未分析TLR5对RA的预测价值。本研究依据RA病情活动度评价表(DAS28)评分将RA患者分为高活动组和中低疾病活动组,对患者单核细胞表面TLR5分子进行流式细胞术检测,探讨TLR5在RA患者单核细胞中的表达及预测价值。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 选取遂宁市中心医院2017年1月至2022年8月就诊的RA患者140例,女性124例,男性16例,年龄16~67(43.15±11.90)岁,病程0.2~19(7.50±5.03)年。纳入标准:(1)符合1987年美国风湿病学会(ACR)标准或者2009年ACR/欧洲抗风湿病联盟(EULAR)关于RA分类标准;(2)DAS28-红细胞沉降率(ESR)评分 $\geq 2.6$ 。排除标准:(1)合并其他自身免疫疾病、肾功能衰竭、心功能衰竭;(2)患有感染性疾病(肺炎、肺结核、病毒性肝炎等);(3)近1个月内接受改善病情的抗风湿药物(DMARDs)或生物制剂的治疗。

所有患者均完善检测血常规、凝血功能、肝肾功能、尿常规、C反应蛋白(CRP)、ESR、感染标记物、类风湿因子(RF)、抗角质蛋白抗体(AKA)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体等检查;依据DAS28-ESR评分标准将RA分为高活动组(DAS28 $\geq 5.1$ )以及中低活动组(2.6 $\leq$ DAS28 $< 5.1$ )<sup>[8-9]</sup>;高活动组70例,男性7例,女性63例,年龄17~67(42.48±12.25)岁;中低活动组70例,男性9例,女性61例,年龄16~63(43.60±11.75)岁;对照组70例,男性10例,女性60例,年龄19~75(41.64±13.12)岁,为来自遂宁市中心医院体检中心检验结果正常的人群。3组年龄和性别比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究获得遂宁市中心医院伦理委员会批准(审批号2016-16),所有入组患者均签署知情同意书。

1.2 仪器和试剂 低速离心机(德国PRIMO R公

司),流式细胞分析仪(美国BD公司),手动单道移液枪(大龙),Lexa标记的人TLR5单克隆抗体(美国BD公司),FITC标记的抗人CD14抗体(美国BD公司),阴性标记的IgG抗体(美国BD公司)。

1.3 检测方法 空腹状态下采集静脉血2 mL,每份血液样品配置2支流式检测专用试管,记号笔标识为检测管(试管1)和对照管(试管2),每支检测管均加入50  $\mu$ L肝素抗凝的全血,并加入红细胞裂解液,静置25 min,采用低速离心机离心5 min,弃去上清液,随后以PBS液洗涤2次,震荡重悬,然后按下列方式分别加入抗体:试管1加入用FITC标记的抗人CD14抗体10  $\mu$ L+Lexa标记抗人TLR5单克隆抗体10  $\mu$ L,试管2加入相应阴性对照IgG抗体。各组完成加样后避光处静置30 min,低速离心弃去上清液,PBS溶液洗涤2次,最后加入400  $\mu$ L PBS溶液,经振荡使单核细胞重悬,立即上流式细胞仪检测,每支样管均采集10万个有核细胞的散射光和荧光信号,前向散射/侧向散射设定单核细胞区,采集CD14<sup>+</sup>TLR5<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>比值作为单核细胞表面TLR5表达水平。

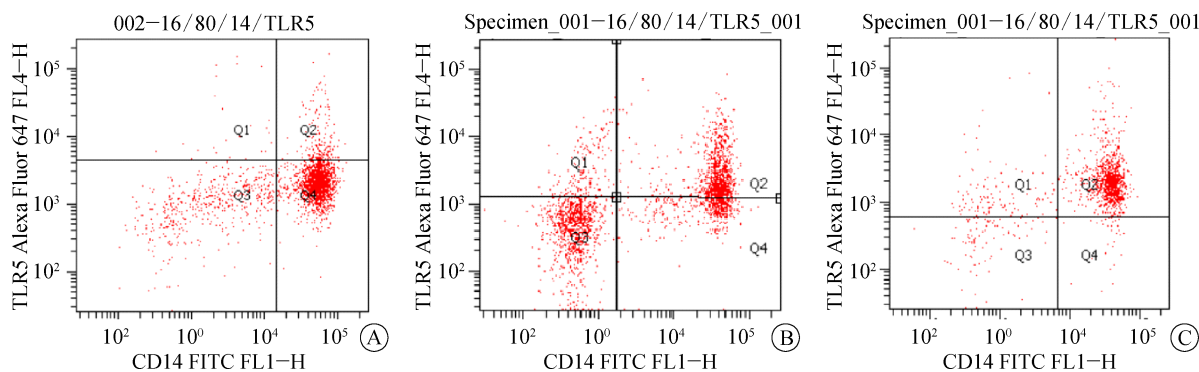
1.4 统计学方法 采用SPSS 26.0软件和GraphPad Prism 5.0软件分析数据。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料采用例表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。采用Spearman法进行相关分析,诊断效能分析采用ROC曲线。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 单核细胞表面TLR5阳性率比较 正常对照组、中低活动组和高活动组单核细胞表面TLR5阳性率(CD14<sup>+</sup>TLR5<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>)分别为(46.99±5.79)%、(50.80±5.96)%和(58.86±6.20)%,3组比较差异有统计学意义( $F=71.550, P<0.01$ )。高活动组和中低活动组患者TLR5阳性率均高于正常对照组,且高度活动组TLR5阳性率亦高于中低活动组( $P<0.05$ )。见图1。

2.2 TLR5与疾病活动参数相关性分析 相关分析结果显示,RA患者TLR5表达水平与DAS28-ESR( $r=0.735, P<0.01$ )、ESR( $r=0.664, P<0.01$ )和CRP( $r=0.620, P<0.01$ )呈正相关性,与发病年龄( $r=0.047, P>0.05$ )及病程( $r=-0.110, P>0.05$ )无明显相关性。

2.3 TLR5诊断效能分析 ROC曲线分析显示,TLR5诊断RA的ROC曲线下面积(AUC)为0.79,最佳截断值为49.50%,敏感性为72.86%,特异性为73.57%。见图2。



注:A为正常对照组;B为中低疾病活动组;C为高疾病活动组。

图1 不同组间单核细胞表面 TLR5 阳性表达流式分析图

Fig. 1 Flow cytometry analysis of TLR5 positive expression on monocyte surface between different groups

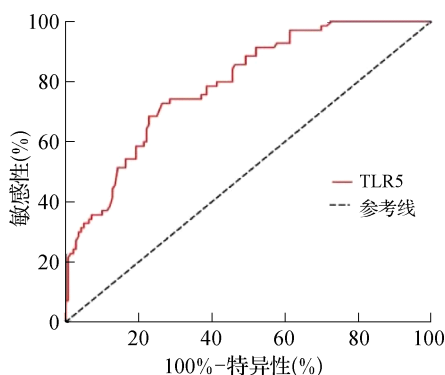


图2 TLR5 诊断 RA 的 ROC 曲线

Fig. 2 ROC curve of TLR5 in the diagnosis of RA

### 3 讨论

TLRs 是介导天然免疫反应的一组受体分子,与相应病原相关分子模式识别后,通过依赖性和不依赖型髓样分化因子(MyD)88 两种途径介导生物学效应,活化 NF- $\kappa$ B 刺激下游信号传导,诱导炎症因子的转录和促炎因子的分泌,从而影响免疫反应<sup>[10]</sup>。不仅如此,TLRs 还通过其他机制影响免疫反应,如幼稚 B 细胞的活化除需要 B 细胞受体和 T 细胞协助外,还需要 TLR 配体的信号;记忆 T 细胞参与免疫反应的强度和质量也受到 TLR9 以及 TLR7/TLR8 的影响。

目前发现 TLR7、TLR4 和 TLR2 在 RA 表达异常,参与 RA 发病<sup>[11-12]</sup>。文献报道 RA 患者外周血中单核细胞表面 TLR5 表达升高,并与疾病活动性存在一定相关性,提示 TLR5 可能参与 RA 发病。在排除感染和药物干扰因素后,本研究显示,无论高疾病活动组还是中低疾病活动组,患者单核细胞表面 TLR5 表达阳性率均高于健康对照组,且高疾病活动组 TLR5

阳性率亦高于中低疾病活动组。相关分析发现 TLR5 表达水平与 DAS28 评分、ESR、CRP 存在正相关性。

TLR5 受体可表达在单核/巨噬细胞表面,其模式识别受体为鞭毛蛋白<sup>[13-14]</sup>,当 TLR5 与鞭毛蛋白结合后,通过激活 NF- $\kappa$ B 下游信号介导氧化应激、器官损伤以及全身炎症反应。RA 为非细菌性炎症,但研究显示 RA 热休克蛋白 70(HSP70)和血清高迁移率族蛋白-1(HMGB1)是 TLR5 的内源性配体,当患者单核细胞 TLR5 与内源性配体结合后,通过激活 NF- $\kappa$ B 而刺激肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  产生,并可引起白细胞介素(IL)-6 和 IL-10 等炎症因子升高<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  被认为在 RA 发病中处于中心环节,其在患者滑膜炎性改变,以及软骨的降解中都发挥着重要作用,尤其关节滑液中异常升高的 TNF- $\alpha$  对 RA 发病起着主导作用;IL-6 不仅参与急性反应蛋白的产生,损伤关节软骨组织,高水平的 IL-6 还可以促进类风湿因子和其他炎症细胞因子的合成,从而促进炎症反应,加重 RA 患者关节软骨病变。Hussain 等<sup>[15]</sup>发现 TLR5 可通过参与 TLR4 受体复合物参与环境因素导致的肺损伤,因此不排除 TLR5 同样通过 TLR4 受体复合物介导对 RA 患者的组织损伤。TLR5 还通过其他直接和间接机制参与和维持 RA 炎症:如参与幼稚 B 细胞的活化,促进滑膜区单核细胞的浸润和破骨细胞的成熟,在 RA 的血管发生中发挥明显作用等<sup>[16]</sup>。

有研究显示 TLRs 家族 TLR4 对强直性脊柱炎和 RA 有预测价值<sup>[17]</sup>,另有文献报道 TLR5 亦可以作为中老年膝关节骨关节炎的诊断标志物<sup>[18]</sup>,但关于 TLR5 对 RA 的预测价值目前未有报道。本研究采用 ROC 曲线分析发现,TLR5 诊断 RA 的 AUC 为 0.79,当截断值为 49.50%时,其诊断 RA 的敏感性 72.86%,

特异性 73.57%,提示单核细胞表面 TLR5 对于 RA 有一定的预测价值。

综上所述,本研究发现不同活动组患者 TLR5 阳性表达率均高于健康对照组,并且 TLR5 表达水平与 DAS28、ESR 及 CRP 呈正相关,单核细胞 TLR5 表达水平有一定的预测 RA 价值。有研究发现屏蔽 TLR5 信号可减轻和消除幽门螺旋杆菌引起的炎症反应<sup>[19]</sup>,理论上阻断 TLR5 信号通路亦有减轻和消除 RA 的炎症效应,值得进一步深入研究。

利益冲突 无

#### 参考文献

- [1] Badii M, Gaal O, Popp RA, et al. Trained immunity and inflammation in rheumatic diseases [J]. *Joint Bone Spine*, 2022, 89(4): 105364.
- [2] 李娟娟,高惠英.Toll样受体7介导免疫炎症与类风湿关节炎的发病机制[J].*中国临床研究*,2022,35(10):1435-1438.  
Li JJ, Gao HY. Toll-like receptor 7 in immune inflammation and the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Clin Res*, 2022, 35(10): 1435-1438.
- [3] 王彬,邵宽芙蓉,董晨.儿童过敏性紫癜 TLR2、TLR4 表达及其与 Tfh 细胞的相关性[J].*中国临床研究*,2022,35(2):194-197.  
Wang B, Shao KFR, Dong C. Expression of TLR2 and TLR4 and their correlation with Tfh cells in children with Henoch-Schonlein purpura[J]. *Chin J Clin Res*, 2022, 35(2): 194-197.
- [4] 高成,王冰,邵锋,等.Toll样受体9基因多态性与脓毒症易感性的关系[J].*热带医学杂志*,2022,22(7):925-928.  
Gao C, Wang B, Shao F, et al. The relationship between toll-like receptor 9 gene polymorphism and susceptibility to sepsis[J]. *J Trop Med*, 2022, 22(7): 925-928.
- [5] Salim F, Gunawan H, Suwarsa O, et al. Increased expression of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 on peripheral blood monocytes by induction of staphylococcal enterotoxin B during exacerbation of atopic dermatitis patients[J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2023, 16: 301-307.
- [6] 陈训春,李名兰,潘碧云,等.TLR4/NF-κB 信号通路激活 LncR-NARP11-20G6 调控慢性阻塞性肺疾病气道炎症和重塑[J].*安徽医科大学学报*,2022,57(4):586-593.  
Chen XC, Li ML, Pan BY, et al. Role of LncRNA RP11-20G6.3 and TLR4/NF-κB signaling pathway in airway inflammation and remodeling in COPD [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(4): 586-593.
- [7] Thwaites RS, Unterberger S, Chamberlain G, et al. TLR1/2 and 5 induce elevated cytokine levels from rheumatoid arthritis monocytes independent of ACPA or RF autoantibody status[J]. *Rheumatology*, 2020, 59(11): 3533-3539.
- [8] 姜冰,李兴华,呼靖宣,等.类风湿性关节炎患者血清 25-羟维生素 D 水平及与疾病活动度的相关性研究[J].*中国医药科学*, 2021,11(19):5-9,28.  
Jiang B, Li XH, Hu JX, et al. Study on correlation between serum 25-hydroxyvitamin d level and disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. *China Med Pharm*, 2021, 11(19): 5-9, 28.
- [9] Mistry J, Sharif M, Prideaux A, et al. Use of rheumatoid arthritis impact of disease (RAID) in routine care; identification of DAS28 remission and unmet patient-reported outcomes[J]. *Rheumatol Advanc Pract*, 2020, 4(2): rkaa013.
- [10] Lu Y, Li XR, Liu SS, et al. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 72.
- [11] Mullen LM, Chamberlain G, Sacre S. Pattern recognition receptors as potential therapeutic targets in inflammatory rheumatic disease [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 122.
- [12] Swain N, Tripathy A, Padhan P, et al. Toll-like receptor-7 activation in CD8<sup>+</sup> T cells modulates inflammatory mediators in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int*, 2022, 42(7): 1235-1245.
- [13] Rhee JH, Khim K, Puth S, et al. Deimmunization of flagellin adjuvant for clinical application [J]. *Curr Opin Virol*, 2023, 60: 101330.
- [14] 刘宇,尹浩然,耿铭,等.TLR5 的进化、功能及相关疾病研究[J].*中国细胞生物学报*,2021,43(5):1049-1060.  
Liu Y, Yin HR, Geng M, et al. Researches on the evolution, function, and related diseases of TLR5[J]. *Chin J Cell Biol*, 2021, 43(5): 1049-1060.
- [15] Hussain S, Johnson CG, Scierba J, et al. TLR5 participates in the TLR4 receptor complex and promotes MyD88-dependent signaling in environmental lung injury[J]. *Elife*, 2020, 9:e50458.
- [16] Kim SJ, Chen ZL, Chamberlain ND, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis is fostered directly by toll-like receptor 5 ligation and indirectly through interleukin-17 induction [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(8): 2024-2036.
- [17] 钱臣,徐扬,蒋逸秋.外周血单个核细胞 TLR4 基因表达水平与 AS、RA 病情活动性的关系分析[J].*蚌埠医学院学报*,2022,47(2):180-183.  
Qian C, Xu Y, Jiang YQ. Association of TLR4 gene expression in peripheral blood mononuclear cells with disease activity of AS and RA[J]. *J Bengbu Med Coll*, 2022, 47(2): 180-183.
- [18] Han WC, Chen XM, Wang XY, et al. TLR-4, TLR-5 and IRF4 are diagnostic markers of knee osteoarthritis in the middle-aged and elderly patients and related to disease activity and inflammatory factors [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1291-1298.
- [19] Pachathundikandi SK, Tegtmeyer N, Backert S. Masking of typical TLR4 and TLR5 ligands modulates inflammation and resolution by *Helicobacter pylori*[J]. *Trends Microbiol*, 2023, 31(9): 903-915.

收稿日期:2023-07-06 修回日期:2023-09-23 编辑:王宇