

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.08.002

## 5 岁以下喘息患儿哮喘预测指数与外周血单核细胞 TLR4 表达的相关性研究

姜 朕, 李卫华<sup>△</sup>, 朱 峰, 魏海燕, 齐共健

(江苏省徐州市儿童医院重症医学科 221006)

**[摘要]** **目的** 探讨 5 岁以下喘息患儿外周血单核细胞(PBMCs)表面 Toll 样受体 4(TLR4)及血清白细胞介素 6(IL-6)的表达。**方法** 选取该院门诊或住院患儿共 224 例,其中哮喘预测指数(API)阳性组 116 例,阴性组 108 例。两组患儿均在喘息症状缓解 1 个月 after 分别抽取外周血,流式细胞仪检测 PBMCs TLR4 阳性率,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 IL-6 水平。**结果** API 阳性组患儿 CD14<sup>+</sup> 单核细胞表面 TLR4 阳性率明显高于 API 阴性组[(34.9±10.0)% vs. (30.2±8.8)%];API 阳性组患儿血清 IL-6 水平明显高于 API 阴性组[(46.4±15.1)ng/L vs. (40.5±13.6)ng/L];且两组 TLR4 阳性率和 IL-6 水平均呈线性相关( $P<0.05$ )。**结论** TLR4 的激活诱导 IL-6 等细胞因子表达可能和哮喘的发生、发展有关,TLR4 可能可以作为喘息发展为哮喘的预测指标。

**[关键词]** Toll 样受体 4;白细胞介素 6;哮喘**[中图分类号]** R725.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)08-1012-03

### Correlation between Toll-like receptor 4 in peripheral blood monocytes and asthma predictive index in wheezing children under 5 years of age

Jiang Zhen, Li Weihua<sup>△</sup>, Zhu Feng, Wei Haiyan, Qi Gongjian

(Department of Intensive Care Unit, Xu Zhou Children's Hospital, Xu Zhou, Jiangsu 221006, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of Toll-like receptor 4(TLR4) in peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) and serum interleukin-6(IL-6) in wheezing children under 5 years of age. **Methods** A total of 224 wheezing children under 5 years of age were divided into API(asthma predictive index)-positive ( $n=116$ ) and API-negative groups ( $n=108$ ). Serum level of IL-6 and TLR4 expression on CD14<sup>+</sup> monocytes were measured after wheezing was stable for one month. TLR4 expression on CD14<sup>+</sup> monocytes was quantified via flow-cytometry. Serum level of IL-6 was detected by ELISA. **Results** Serum level of IL-6 and TLR4 expression on CD14<sup>+</sup> monocytes of API-positive group were higher than API-negative group [TLR4(%): 34.9±10.0 vs. 30.2±8.8; IL-6(ng/L): 46.4±15.1 vs. 40.5±13.6]. There was a significant positive correlation between the expression of TLR4 and the content of serum IL-6 in two groups of wheezing children( $P<0.05$ ). **Conclusion** TLR4 may play a role in the pathogenesis of asthma through promoting the expression of IL-6. TLR4 may be a index to predicting asthma in wheezing children.

**[Key words]** Toll-like receptor 4; interleukin-6; asthma

喘息是婴幼儿的一种常见症状,过敏性哮喘是其中的一种重要表型。从喘息患儿中把可能发展为持续性哮喘的患儿识别出来进行早期干预是必要的。然而,由于缺乏特异性的检测指标,很难做到早期识别。哮喘预测指数(asthma predictive index, API)是一种较好的预测婴幼儿哮喘的指标<sup>[1-2]</sup>,目前认为 API 阳性的婴幼儿需按哮喘规范化治疗。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)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。研究表明,哮喘与 TLR4 关系密切,但其与 API 的关系尚不明确<sup>[3]</sup>。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 6 月至 2015 年 5 月在本院门诊就诊和住院治疗的 5 岁以下喘息患儿 224 例。根据 2008 年儿童支气管哮喘诊断与防治指南中 API 标准<sup>[4]</sup>分为 API 阳性组(116 例)与 API 阴性组(108 例)。两组患儿在月龄、性别、病程等一般情况方面差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。

#### 1.2 方法

**1.2.1 CD14<sup>+</sup>单核细胞表面 TLR4 表达检测** 两组喘息患儿均在喘息症状缓解 1 个月 after 采集外周静脉血 10 mL。测定外周血 CD14<sup>+</sup>单核细胞 TLR4 的表达。根据文献报道采用流式细胞仪检测 CD14<sup>+</sup>单核细胞表面 TLR4 的表达<sup>[5]</sup>。FACS VantageSE 流式细胞仪购自美国 BD 公司;FITC anti-human CD14<sup>+</sup>抗体、PE anti-human CD284(TLR4)抗体购自美国 Bionlegend 公司。

表 1 两组患儿一般情况

组别	n	性别(男/女,n/n)	月龄(̄±s,月)	病程(̄±s,月)
API 阳性组	116	73/43	34.4±12.0	11.1±3.4
API 阴性组	108	68/40	34.6±11.3	11.2±3.5
$t/\chi^2$		0.000	-0.09	-0.33
$P$		0.996	0.982	0.742

**1.2.2 血清白细胞介素 6(IL-6)水平检测** 酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清 IL-6 水平,人 IL-6 ELISA 试剂盒购自

加拿大 HCB 公司。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两个样本均数的比较采用 *t* 检验,样本率的比较采用  $\chi^2$  检验,各指标相关性采用直线相关分析法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1** 两组患儿 CD14<sup>+</sup> 单核细胞表面 TLR4 及血清 IL-6 的表达 API 阳性组患儿 CD14<sup>+</sup> 单核细胞表面 TLR4 阳性率明显高于 API 阴性组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。API 阳性组患儿血清 IL-6 水平明显高于 API 阴性组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 两组患儿 TLR4 及 IL-6 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TLR4(%)	IL-6(ng/mL)
API 阳性组	116	34.9 ± 10.0	46.4 ± 15.1
API 阴性组	108	30.2 ± 8.8	40.5 ± 13.6
<i>t</i>		3.700	3.090
<i>P</i>		0.000	0.002

**2.2** PBMCs TLR4 表达水平与血清 IL-6 水平线性相关分析 经线性相关分析表明,在 API 阴性组及 API 阳性组患儿 TLR4 阳性率水平与血清 IL-6 表达水平均呈正相关(图 1),API 阳性组相关系数  $r = 0.861, P < 0.05$ ;API 阴性组相关系数  $r = 0.901, P < 0.05$ 。

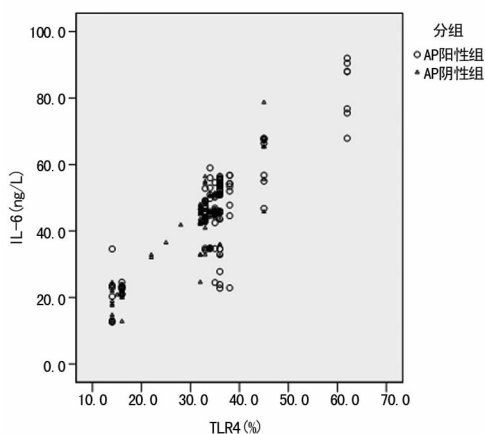


图 1 两组患儿 PBMCs 表面 TLR4 表达和血清 IL-6 水平散点图

**3 讨 论**

目前,婴幼儿喘息主要有 3 种表型<sup>[4]</sup>:(1)早期一过性喘息,表现为在 3 岁前有 1 次以上的喘息,到 3 岁后就无喘息症状,其喘息的机制可能是由环境因素导致肺发育延迟所致,个体过敏证据较少。(2)早期起病的持续性喘息(3 岁前起病),主要表现为与急性呼吸道感染病毒相关的反复喘息。(3)迟发性喘息/哮喘,即真正意义上的支气管哮喘,患儿有典型的特应性背景,哮喘症状常迁延至成人期,气道有典型的哮喘病理特征。从喘息的婴幼儿中把可能发展为哮喘的患儿识别出来存在一定的困难,这也是目前的一大研究热点。Castro-Rodriguez 等<sup>[6]</sup>于 2000 年提出哮喘 API 的概念,其能有效地预测 3 岁内喘息患儿发展为持续性哮喘的危险性,它的应用价值日益受到重视。

在哮喘的发病机制方面,TLR4 在哮喘中的生物学作用越来越受到人们的重视。TLR4 是 Toll 样受体家族成员之一。其作为一种模式识别受体,在抗感染与免疫信号的转导过程中起重要作用。当脂多糖等配体与 TLR4 结合后,通过髓样分化因子 88(MyD88)介导下游的信号转导,激活 AP-1、NF- $\kappa$ B 和 IRF3 等转录因子,诱导促炎性细胞因子(如 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等)和趋化性细胞因子(如 IL-8)等多种细胞因子的表达,启动炎症和适应性免疫应答<sup>[7]</sup>。研究表明,TLR4 信号通路的激活可以引起局部慢性炎症反应、氧化应激等增加,从而导致哮喘、代谢综合征、糖尿病等疾病的发生<sup>[8]</sup>。大量的研究表明,TLR4 基因多态性和哮喘的发生及严重程度相关。TLR4 rs1927907 基因多态性和 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面 TLR4 的表达量及哮喘的严重程度相关<sup>[9]</sup>。2015 年 11 月 4 日在美国公共卫生协会会议中,Bravo 等<sup>[10]</sup>报道了 1 项研究前瞻性研究,该研究选取了 1 823 名志愿者,研究了基因多态性和居住环境的关系,研究表明,高应答者(携带 CD14、TNF- $\alpha$  和野生型 TLR4、TIRAP 基因)较低应答者(携带 TLR4、TIRAP 和野生型 CD14、TNF- $\alpha$  基因)更容易的哮喘;白人较黑人或非洲裔美国人更容易的哮喘;居住地离马路较近( $< 250$  m)的人群中,高应答者较低应答者更易得哮喘。Lee 等<sup>[3]</sup>观察了 7 389 名中学生发现抗生素暴露及毛细支气管炎病史是哮喘的危险因素,TLR4 rs1927911 多态性可以减轻这种遗传易感性。Kim 等<sup>[11]</sup>研究发现,房尘螨可以通过 TLR4/PKC $\delta$ /ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制中性粒细胞凋亡,促进 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、G-CSF、GM-CSF 等炎症因子的表达,从而介导过敏性鼻炎、哮喘等的发生。Liu 等<sup>[12]</sup>研究表明,房尘螨可以同时激活 TLR2 和 TLR4 受体,调整肺泡巨噬细胞激活模式,导致 Th2 为主导的优势免疫,从而介导了哮喘的发生。Th1/Th2 亚群数目和功能失衡是哮喘重要的免疫学特征。近期研究发现,哮喘不仅与 Th1/Th2 细胞功能失调相关,还与 Th17 细胞的激活有着重要关系<sup>[13]</sup>。活化的 Th17 细胞可以进一步激活平滑肌细胞、支气管纤维母细胞及上皮细胞,促使它们分泌 IL-6 等多种细胞因子,导致气道局部慢性炎症反应<sup>[14]</sup>。而诱导 Th17 细胞分化的关键细胞因子就是 IL-6<sup>[15]</sup>。研究表明,IL-6 水平和哮喘的严重程度及肺功能密切相关<sup>[16]</sup>。IL-6 与 TLR4 可以相互影响,在哮喘的发病及进展中起重要作用<sup>[17]</sup>。

目前,TLR4 和喘息的关系方面的研究较少,本研究观察了 API 阳性组与阴性组 PBMCs TLR4 阳性率及血清 IL-6 水平。研究表明,API 阳性组 PBMCs TLR4 阳性率及血清 IL-6 明显高于 API 阴性组,且两组 TLR4 阳性率和 IL-6 水平呈正相关,提示部分喘息患儿通过 TLR4 的激活产生 IL-6 等炎症因子,诱发哮喘的发生、发展。TLR4 可能成为预防喘息患者发展为哮喘的重要干预靶点。另外,喘息患者中可以通过检测患者 PBMCs TLR4 阳性率及相关炎症因子水平预测哮喘的发生,从而早期干预,但仍需要大规模临床试验的证实。

**参考文献**

[1] Wi CI, Park MA, Juhn YJ. Development and initial testing of Asthma predictive index for a retrospective study: an exploratory study[J]. *Asthma*, 2015, 52(2): 183-190.  
 [2] Guilbert TW. Identifying and managing the infant and toddler at risk for asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*,

- 2010,126(2):417-422.
- [3] Lee E, Kwon JW, Kim HB, et al. Association between antibiotic exposure, bronchiolitis, and TLR4 (rs1927911) polymorphisms in childhood asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2015, 7(2): 167-174.
- [4] 中华医学会儿科学会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745-753.
- [5] Yang S, Li R, Qu X, et al. Fosinoprilat alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in monocytes[J]. *Cell Immunol*, 2013, 284(1/2): 182-186.
- [6] Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, et al. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(4 Pt 1): 1403-1406.
- [7] Liu Y, Yin H, Zhao M, et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases; a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2014, 47(2): 136-147.
- [8] Lucas K, Maes M. Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation; possible treatments targeting the TLR4 pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(1): 190-204.
- [9] Zhang L, Xu AG, Zhao W, et al. A toll-like receptor 4 (TLR4) variant is associated with asthma severity[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 7849-7854.
- [10] Bravo M, Schurman S, Garantziotis S, et al. Relationships between TLR4 pathway single nucleotide polymorphisms, distance to roadway, and asthma diagnosis and severity[C]. 143 rd APHA Annual Meeting and Exposition, Chicago, American, 2015.
- [11] Kim EH, Lee JS, Lee NR, et al. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis due to house dust mite allergen in normal and allergic rhinitis subjects[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e105814.
- [12] Liu CF, Drocourt D, Puzo G, et al. Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75983.
- [13] Bedoya SK, Lam B, Lau K, et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013 (2013): 986789.
- [14] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1): 8-18.
- [15] Besnard AG, Togbe D, Couillin IA, et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(1): 3-10.
- [16] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(9): 1281-1290.
- [17] Karnati HK, Pasupuleti SR, Kandi R, et al. TLR-4 signaling pathway: MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment[J]. *Vet Res Commun*, 2015, 39(1): 73-78.

(收稿日期: 2016-09-28 修回日期: 2016-12-16)

(上接第 1011 页)

- [5] Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex[J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1004-1017.
- [6] Ivey KN, Srivastava D. microRNAs as developmental regulators[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(7): a008144.
- [7] 李文婷, 舒彬, 刘真, 等. 微小 RNA-155 对脂多糖所致小鼠急性肺损伤的干预作用[J]. *中华烧伤杂志*. 2015, 95(28): 2310-2314.
- [8] Lange M, Hamahata A, Traber DL, et al. A murine model of sepsis following smoke inhalation injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010(391): 1555-1560.
- [9] Cox RA, Burke AS, Jacob S, et al. Activated nuclear factor kappa B and airway inflammation after smoke inhalation and burn injury in sheep[J]. *J Burn Care Res*, 2009(30): 489-498.
- [10] Shwartz MD, Moore EE, Moore FA, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(8): 1285-1292.
- [11] Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex Biology gets more complex[J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1004-1017.
- [12] Kempson SA, Zhou Y, Danbolt NC. The betaine/GABA transporter and betaine: roles in brain, kidney, and liver [J]. *Front Physiol*, 2014(5): 159.
- [13] Farnkvist LM, Lundman BM. Outcomes of diabetes care: a population-based study[J]. *Int J Qual Health Care*, 2003, 15(4): 301-307.
- [14] 薄丽燕. NFAT5 和 Ang- II 及其受体 AT1 在海水吸入型肺损伤中的作用及其机制的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [15] Zhen Liu et al. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(1): 86-92.
- [16] Xiao B, Liu Z, Li BS, et al. induction of miR-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory in the inflammatory response[J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(6): 916-925.

(收稿日期: 2016-09-21 修回日期: 2016-11-19)