

· 论 著 ·

反复呼吸道感染患儿外周血单个核细胞中 TLR2、TLR4 表达情况与 Th1/Th2 免疫应答的关系*

赵淑景¹, 马志平¹, 张金彪², 付 峰², 冯娜娜^{3△}

沧州中西医结合医院: 1. 儿科一区; 2. 实验诊断科; 3. 科教科, 河北沧州 061000

摘 要:目的 探讨反复呼吸道感染(RRTI)患儿外周血单个核细胞(PBMC)Toll 样受体 2(TLR2)、Toll 样受体 4(TLR4)表达情况与辅助性 T 细胞 1(Th1)/辅助性 T 细胞 2(Th2)免疫应答的关系。方法 将 2020 年 12 月至 2022 年 12 月该院收治的 65 例确诊为 RRTI 的患儿纳入研究作为 RRTI 组。另选取同期于该院体检的健康儿童 45 例作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 的信使核糖核酸(mRNA)相对表达水平。采用流式细胞仪检测 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 蛋白表达率。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中 Th1 细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)、Th2 细胞因子白细胞介素-4(IL-4)水平及二者比值(IFN- γ /IL-4)。采用 Pearson 相关分析 TLR2、TLR4 蛋白表达率与血浆 IFN- γ 、IL-4 水平的相关性。结果 RRTI 组血浆 Th2 细胞因子 IL-4 水平高于对照组, 血浆 Th1 细胞因子 IFN- γ 水平低于对照组, IFN- γ /IL-4 低于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。RRTI 组 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 mRNA 相对表达水平及蛋白表达率均高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 相关分析显示, RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 蛋白表达率与血浆 IFN- γ 水平及 IFN- γ /IL-4 均呈负相关($P < 0.05$), 与血浆 IL-4 水平均呈正相关($P < 0.05$)。结论 RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2、TLR4 的表达及血浆 Th1/Th2 细胞因子均可能参与疾病的发生、发展的过程。过度活化的 TLR2 和 TLR4 可能会使 Th1 功能减弱、Th2 功能增强。

关键词:反复呼吸道感染; Toll 样受体; 辅助性 T 细胞; 免疫应答; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.06.005

中图法分类号:R446.63

文章编号:1673-4130(2024)06-0663-04

文献标志码:A

The relationship between the expression of TLR2 and TLR4 in peripheral blood mononuclear cells and Th1/Th2 immune response in children with recurrent respiratory tract infection*

ZHAO Shujing¹, MA Zhiping¹, ZHANG Jinbiao², FU Feng², FENG Nana^{3△}

1. Department of Pediatrics; 2. Department of Laboratory Diagnosis; 3. Department of Science and Education, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei 061000, China

Abstract: Objective To investigate the expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in children with recurrent respiratory tract infection (RRTI) and its relationship with T helper cell 1 (Th1)/T helper cell 2 (Th2) immune response. **Methods** A total of 65 children diagnosed with RRTI who admitted to the hospital from December 2020 to December 2022 were enrolled in the study as the RRTI group, and 45 healthy children who underwent physical examination in the hospital during the same period were enrolled as the control group. The relative expression levels of TLR2 and TLR4 mRNA in PBMCs were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). The expression rates of TLR2 and TLR4 protein in PBMCs were detected by flow cytometry. The levels of Th1 cytokine interferon- γ (IFN- γ), Th2 cytokine interleukin-4 (IL-4) and their ratio (IFN- γ /IL-4) in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between TLR2, TLR4 protein expression rates and plasma IFN- γ , IL-4 levels. **Results** The RRTI group had significantly higher plasma level of Th2 cytokine IL-4 than the control group, significantly lower plasma level of Th1 cytokine IFN- γ than the control group, and significantly lower ratio of IFN- γ /IL-4 than the control group, the differences were all statistically significant($P < 0.05$). The relative expression levels of TLR2

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(20200606)。

作者简介:赵淑景,女,副主任医师,主要从事儿科疾病诊断治疗的研究。△ 通信作者, E-mail:fn1234560922@163.com。

and TLR4 mRNA and protein expression rates in PBMC of children in the RRTI group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that the protein expression rates of TLR2 and TLR4 in PBMC of children with RRTI were both negatively correlated with both plasma IFN- γ levels and IFN- γ /IL-4 ($P<0.05$) and positively correlated with plasma IL-4 levels ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of TLR2 and TLR4 in PBMC and plasma Th1/Th2 cytokines in children with RRTI may be involved in the occurrence and development of the disease. Excessive activation of TLR2 and TLR4 may weaken Th1 function and enhance Th2 function.

Key words: recurrent respiratory tract infections; Toll-like receptors; T helper cell; immune response; children

反复呼吸道感染(RRTI)是儿科常见的呼吸系统疾病。RRTI 患儿 1 年内发生呼吸道感染的次数不在正常范围内,包括上呼吸道感染和下呼吸道感染,而且两次感染间隔时间 7 d 以上。该病病因并不完全清楚,主要与先天性因素、免疫功能低下及微量元素和维生素缺乏等有关^[1]。目前最明确的病因之一是机体免疫功能异常。因幼儿免疫系统尚在发育阶段,再加上呼吸系统解剖结构的特点,RRTI 的疾病好发群体为年龄低于 2 岁的儿童^[2]。如果 RRTI 患儿没有得到及时的治疗或正确的干预,就有可能并发心肌炎、哮喘等疾病,从而对身心健康和生长发育产生不利影响^[3]。RRTI 的发生与机体免疫功能关系十分密切。辅助性 T 细胞(Th)在免疫系统中起着关键作用,而 Th 的亚型 Th1/Th2 细胞因子水平可以反映出机体的免疫应答是否处于平衡状态,与机体的炎症反应、抗肿瘤效应等病理反应有关^[4]。Toll 样受体(TLRs)蛋白家族都属于 I 型跨膜蛋白,它可以通过对病原微生物的保守抗原分子进行识别,从而对细胞内的信号传导通路进行激活,最终产生一系列炎症细胞因子,如白细胞介素-4(IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)等,并激活机体产生免疫细胞应答,它是连接特异性免疫和非特异性免疫的桥梁^[5]。有研究发现,TLRs 具有不同的表型及相应配体,可使 Th 细胞朝不同方向分化,并能够识别相关的细胞表面受体和参与 Th 型免疫应答的调控^[6]。目前,关于 RRTI 患儿外周血单个核细胞(PBMC)TLRs 表达与 Th 免疫应答关系的研究报道较少。因此,本研究拟通过对 RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2、TLR4 的表达进行检测及与对照组进行比较,旨在探讨其与 Th1/Th2 免疫应答的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2020 年 12 月至 2022 年 12 月本院收治的 65 例确诊为 RRTI 的患儿纳入研究作为 RRTI 组。纳入标准:(1)符合《反复呼吸道感染的临床概念和处理原则》中儿童 RRTI 的临床诊断标准^[7];(2)年龄 2~6 岁;(3)临床资料完整;(4)病程 1 年以上。排除标准:(1)3 个月内接触过射线;(2)合并血液类疾病、先天性疾病或家族有遗传性疾病史;(3)3 个月内使用过影响免疫功能的药物或激素类药物;

(4)有严重心、肝、肾等重要器官功能障碍;(5)在此研究前参加过其他研究;(6)在研究中途主动退出。另选取同期体检的健康儿童 45 例作为对照组。RRTI 组中,男 31 例、女 34 例,年龄 2~6 岁、平均(4.57 $\pm$ 1.24)岁;对照组中,男 20、女 25 例,年龄 2~6 岁、平均(5.04 $\pm$ 1.04)岁。两组儿童性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。纳入研究患儿的监护人均对本研究知情同意并签署知情同意书。本研究经本院医学伦理委员会审批通过。

1.2 方法

1.2.1 血液标本采集及处理 RRTI 组于入院后次日(对照组于体检当日)清晨接受 3 mL 空腹静脉血采集。将血液标本置于无菌肝素抗凝管中,采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法,得到 PBMC。

1.2.2 指标检测 (1)实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 PBMC TLR2 和 TLR4 信使核糖核酸(mRNA)相对表达水平。在得到 PBMC 后,用异硫氰酸胍(Trizol)法提取细胞总核糖核酸(RNA),反转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA)后进行 qPCR 检测。(2)流式细胞仪检测 PBMC TLR2 和 TLR4 蛋白表达率。将 PBMC 分装在不同的反应管中,分别孵育对应抗体,其阴性对照为 PE 标记的免疫球蛋白 G(IgG),室温避光染色 0.5 h,加入溶血素,混匀后静置 1 min,离心 15 min,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,最后上机检测儿童 PBMC TLR2 和 TLR4 蛋白表达率。(3)酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中 Th1 细胞因子 IFN- γ 、Th2 细胞因子 IL-4 水平及二者比值(IFN- γ /IL-4)。检测使用 IFN- γ 、IL-4 ELISA 试剂盒,操作步骤参考试剂盒说明书。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS20.0 进行统计分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 相关分析 PBMC 中的 TLR2、TLR4 蛋白表达率与血浆 IFN- γ 、IL-4 水平的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组儿童血浆 IFN- γ 、IL-4 水平及 IFN- γ /IL-4

比较 RRTI 组血浆 Th2 细胞因子 IL-4 水平高于对照组,血浆 Th1 细胞因子 IFN- γ 水平低于对照组, IFN- γ /IL-4 低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 两组儿童 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 mRNA 及蛋白表达情况 RRTI 组 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 mRNA 相对表达水平及蛋白表达率均高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组儿童 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 mRNA 及蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	PBMC 中 TLR2		PBMC 中 TLR4	
		mRNA 相对表达水平	蛋白表达率(%)	mRNA 相对表达水平	蛋白表达率(%)
RRTI 组	65	1.24 $\pm$ 0.26	11.20 $\pm$ 1.82	1.22 $\pm$ 0.19	6.62 $\pm$ 0.69
对照组	45	1.04 $\pm$ 0.18	0.77 $\pm$ 0.14	1.04 $\pm$ 0.18	0.82 $\pm$ 0.12
<i>t</i>		4.476	38.311	5.000	55.681
<i>P</i>		<0.01	<0.001	<0.01	<0.001

2.3 PBMC 中 TLR2、TLR4 的蛋白表达率与血浆 IFN- γ 、IL-4 水平的相关性分析 RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 的蛋白表达率与血浆 IFN- γ 水平、IFN- γ /IL-4 均呈负相关($P < 0.05$),而与血浆 IL-4 水平均呈正相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 TLR2、TLR4 的蛋白表达率与 IFN- γ 、IL-4 的相关性分析						
指标	IFN- γ		IL-4		IFN- γ /IL-4	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TLR2	-0.291	0.019	0.467	<0.001	-0.321	0.009
TLR4	-0.315	0.010	0.363	0.003	-0.345	0.005

3 讨 论

RRTI 是指 1 年内上呼吸道或下呼吸道感染次数频繁,超过了一定范围的呼吸道感染。不同的年龄 RRTI 诊断标准不同。反复上呼吸道感染, ≤ 2 岁婴幼儿超过 7 次/年,3~5 岁儿童为超过 6 次/年, ≥ 6 岁儿童为超过 5 次/年或反复下呼吸道感染, ≤ 2 岁婴幼儿超过 3 次/年,3~5 岁儿童超过 2 次/年, ≥ 6 岁儿童超过 2 次/年可诊断为 RRTI^[8]。RRTI 的临床表现有鼻塞、咳嗽等,还常常伴随面色不佳、盗汗及呼吸困难等症状^[9]。流行病学调查显示,我国儿童 RRTI 的发病率为 20% 左右^[10],而且发病率呈逐年增加的趋势,已经成为了低龄儿童死亡的最重要原因之一。免疫、营养、感染及环境等都是导致 RRTI 发生的原因,其中免疫因素与 RRTI 有着密切的联系^[11]。如果不能得到及时的治疗,患儿身心健康和生命安全会受到极大的损害。

IFN- γ 属于 Th1 的代表性细胞因子,能够促进 T 淋巴细胞的分化和成熟,引起巨噬细胞和单核细胞表

表 1 两组儿童血浆 IFN- γ 、IL-4 水平及 IFN- γ /IL-4 比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	IFN- γ (pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN- γ /IL-4
RRTI 组	65	20.37 $\pm$ 5.05	23.99 $\pm$ 6.25	0.92 $\pm$ 0.39
对照组	45	28.22 $\pm$ 6.57	13.76 $\pm$ 4.77	2.34 $\pm$ 1.09
<i>t</i>		7.079	6.812	9.636
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

面抗原表达,进而参与抗原递呈和特异性免疫识别过程^[12]。IL-4 属于 Th2 的代表性细胞因子,可以刺激 B 细胞分泌 IgE,抑制 IFN- γ 产生,引发肥大细胞脱颗粒,最后导致多种炎症介质释放^[13]。此外, Th1 细胞因子 IFN- γ 对 Th2 细胞因子 IL-4 具有拮抗作用,能诱发 IgE 分泌,减少过敏反应。因此,本研究分析了 RRTI 患儿血浆中 Th1 的代表性细胞因子和 Th2 的代表性细胞因子的水平。结果显示, RRTI 组血浆 Th2 的代表性细胞因子 IL-4 的水平明显高于对照组,血浆 Th1 的代表性细胞因子 IFN- γ 的水平明显低于对照组, IFN- γ /IL-4 明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这表明 RRTI 的发生、发展可能与患儿体内 Th1/Th2 免疫应答失衡有关。Th1 的主要细胞因子 IFN- γ 表达受到抑制, Th2 的主要细胞因子 IL-4 过度活化。

TLRs 不仅表达于免疫细胞的表面,如树突状细胞等,同时还在非免疫细胞表面表达,如成纤维细胞等^[14]。TLRs 与机体炎症和免疫反应过程均有着紧密的联系,而 TLRs 异常表达会导致炎症和免疫反应失衡,进而诱发自身免疫性疾病^[15]。人体中发挥重要作用的 TLRs 分子包括 TLR2 和 TLR4 分子。本研究利用 qPCR 和流式细胞术两种方法对 RRTI 患儿 PBMC 中 TLRs 分子的表达情况进行了检测。研究结果显示, RRTI 组 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 mRNA 相对表达水平及蛋白表达率均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这表明 TLRs 可以参与 Th1/Th2 免疫应答平衡的调节,与李天萍等^[16]的研究结果基本一致。本研究还发现, RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 蛋白表达率与血浆 IFN- γ 和 IFN- γ /IL-4 均呈负相关($P < 0.05$),而与 IL-4 均呈正相关($P < 0.05$)。这提示 TLR2 和 TLR4 可能通过 TLR

信号通路及配体参与 Th1/Th2 分化的调控,使 Th2 过度活化,从而大量释放 IL-4,减少 IFN- γ 的产生,最终引起 Th1/Th2 失衡,导致 RRTI 的发生。

综上所述,RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2、TLR4 及血浆中的 Th1/Th2 细胞因子均可能参与疾病的发生、发展过程。RRTI 患儿 PBMC 中 TLR2 和 TLR4 蛋白表达率的升高,可能会使 Th1 功能受损,Th2 功能增强,导致 Th1/Th2 免疫应答失衡。

参考文献

[1] 郭正红,李合云,陈启斌,等. 血清维生素 A、E 水平及细胞免疫指标与儿童反复呼吸道感染相关性研究[J]. 河北医药,2021,43(24):3762-3765.

[2] ZHOU B, NIU W, LIU F, et al. Risk factors for recurrent respiratory tract infection in preschool-aged children[J]. *Pediatr Res*, 2021, 90(1): 223-231.

[3] ZAR H J, NDURU P, STADLER J A M, et al. Early-life respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in a South African birth cohort: epidemiology and effect on lung health [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(10): e1316-e1325.

[4] 石银月,纵书芳,王洁,等. 反复呼吸道感染患儿血清维生素 A 水平变化及其对 Th1/Th2 平衡的影响[J]. 中国妇幼保健研究,2023,34(2):99-103.

[5] 刘永,李子健,康佳佳,等. Toll 样受体及其与病原微生物感染关系的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2022,54(6):139-147.

[6] 吴少辉,黄晓冬,徐智航. TLRs 信号通路和炎症因子的表达与反复呼吸道感染的关系分析[J]. 中国儿童保健杂志,2021,29(2):205-208.

[7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑

委员会.反复呼吸道感染的临床概念和处理原则[J]. 中华儿科杂志,2008,46(2):108-110.

[8] 丁国宏,马珍,姚萍. 儿童反复呼吸道感染的营养相关危险因素及风险模型构建[J]. 中国妇幼保健,2022,37(17):3236-3239.

[9] 任康轶,任洛,邓昱,等. 2013—2018 年重庆地区 2 066 例急性下呼吸道感染住院患儿呼吸道合胞病毒流行特征分析[J]. 中国当代儿科杂志,2021,23(1):67-73.

[10] 马磊琳,杨士广,樊倩倩,等. 血清维生素 D 水平在反复呼吸道感染患儿中的变化及其与免疫功能的关系[J]. 中国实验诊断学,2021,25(2):162-164.

[11] 向垣诚. 急性上呼吸道感染严重程度与患者鼻腔灌洗液中白介素-8 和嗜中性粒细胞含量的相关性分析[J]. 医学临床研究,2019,36(8):1460-1461.

[12] 吴建刚,陈玉梅,陈美元,等. 哮喘患儿呼吸道感染特征及其与 α -干扰素治疗前后 Th1、Th2 细胞因子平衡的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(15):1877-1882.

[13] 姜楠,李钦恒,杨东,等. 细菌性肺炎患者外周血 Th1/Th2 细胞因子水平变化及临床意义[J]. 河北医学,2022,28(8):1311-1316.

[14] 关亚男,孙建利,王久吉,等. 脓毒症 Toll 样受体信号通路和细胞免疫炎症因子水平[J]. 中华医院感染学杂志,2021,31(4):486-491.

[15] 李玉华,赵敏. Toll 样受体信号转导通路与急性肺损伤的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(1):115-118.

[16] 李天萍,黄霞飞,杨蕉,等. 呼吸道合胞病毒感染性肺炎患儿的 TNF- α 和 IL-1 β 水平及 TLR4 信号通路作用初步探究[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(6):919-922.

(收稿日期:2023-08-26 修回日期:2023-12-22)

(上接第 662 页)

[12] ROBERTS L M, BUFORD T W. Lipopolysaccharide binding protein is associated with CVD risk in older adults[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2021, 33(6): 1651-1658.

[13] CIREGIA F, BAIWIR D, COBRAIVILLE G, et al. Glycosylation deficiency of lipopolysaccharide binding protein and corticosteroid-binding globulin associated with activity and response to treatment for rheumatoid arthritis[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 8.

[14] HE J, SHI R, DUAN S, et al. Microbial translocation is associated with advanced liver fibrosis among people with HIV[J]. *HIV Med*, 2022, 23(9): 947-958.

[15] 朱智慧,马光,王国良. 冠心病患者 Hp 感染与冠状动脉病变程度和脂代谢及血清 LBP 的相关性[J]. 热带医学杂志,2022,22(12):1671-1674.

[16] 刘伟,支媛,高璐,等. 急性胰腺炎患者血清微小 RNA-340-3p、CXC 趋化因子配体-13 和 CXC 趋化因子配体-16 的表达意义[J]. 陕西医学杂志,2023,52(1):97-100.

[17] 乔敏,李姗姗,刘荣梅,等. CC 趋化因子和 CXC 趋化因子及其受体在结核分枝杆菌感染免疫应答中作用的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2021,37(4):373-377.

[18] TRIPATHY A S, VISHWAKARMA S, TRIMBAKE D, et al. Pro-inflammatory CXCL-10, TNF- α , IL-1 β , and IL-6: biomarkers of SARS-CoV-2 infection[J]. *Arch Virol*, 2021, 166(12): 3301-3310.

[19] FANG J, WANG C, SHEN C, et al. The expression of CXCL-10/CXCR3 and effect of the axis on the function of T lymphocyte involved in oral lichen planus [J]. *Inflammation*, 2019, 42(3): 799-810.

[20] LIOE T S, XIE Z, WU J, et al. The Mycobacterium tuberculosis prolyl dipeptidyl peptidase cleaves the N-terminal peptide of the immunoprotein CXCL-10 [J]. *Biol Chem*, 2023, 404(6): 633-643.

(收稿日期:2023-10-12 修回日期:2024-01-10)