

· 基础研究 ·

TLR-4、TLR-9 mRNA 在变应性鼻炎 儿童扁桃体组织中的表达

胡彬雅¹, 赵斯君¹, 任基浩², 祝益民¹, 彭湘粤¹, 董友棣¹

(1. 湖南省儿童医院 耳鼻咽喉科, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学湘雅二医院 耳鼻咽喉科, 湖南 长沙 410011)

摘要: **目的** 分析 Toll 样受体-4 (TLR-4) 和 Toll 样受体-9 (TLR-9) mRNA 在变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 儿童扁桃体组织中的表达及意义。**方法** 应用 RT-PCR 检测 20 例变应性鼻炎 (第 1 组)、20 例慢性鼻窦炎 (第 2 组) 和 20 例无鼻部疾病正常儿童 (第 3 组) 的扁桃体组织中 TLR-4、TLR-9 mRNA 的表达情况。**结果** TLR-4、TLR-9 mRNA 在第 1 组儿童扁桃体组织中均有表达, 其中 TLR-4 mRNA 在第 1 组、第 2 组儿童组织中的相对含量较第 3 组表达增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 第 1 组较第 2 组增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TLR-9 mRNA 在第 1 组的相对含量与第 2 组及第 3 组间相比, 第 1 组表达明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 其中第 2 组与第 3 组中的 TLR-9 mRNA 含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** TLR-4、TLR-9 可能在变应性鼻炎儿童扁桃体增殖过程中起重要作用。

关键词: 变应性鼻炎; Toll 样受体; 扁桃体

中图分类号: R765.21; R34

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)05-0327-04

Expression of TLR-4, TLR-9 mRNA in palatine tonsil of children with allergic rhinitis

HU Bin - ya, ZHAO Si - jun, REN Ji - hao, et al.

(Department of Otorhinolaryngology, Children's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of Toll-like receptor (TLR)-4 and TLR-9 mRNA and its significance in hypertrophy of palatine tonsil in children with allergic rhinitis (AR). **Methods** Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for determining the expression of TLR-4, TLR-9 mRNA in the specimens of palatine tonsil from children with AR ($n = 20$), chronic sinusitis ($n = 20$) and healthy children ($n = 20$) without any nose diseases as control. **Results** The expression of both TLR-4, TLR-9 mRNA got enhanced in the specimens of AR group. The expression of TLR-4 mRNA in AR group and chronic sinusitis group was more predominant than that in the control group ($P < 0.05$), while the difference between the former two groups was also statistically significant ($P < 0.05$). The expression of TLR-9 mRNA in AR group was stronger than those of the chronic sinusitis group and the control group ($P < 0.05$), while the difference between the later two groups was statistically insignificant ($P > 0.05$). **Conclusion** TLR-4, TLR-9 may play an important role in tonsillar hypertrophy in children with AR.

Key words: Rhinitis, allergic; Toll-like receptor; Palatine tonsil

腭扁桃体 (简称扁桃体) 是咽淋巴环中最大的一对, 是咽黏膜相关淋巴组织的重要组成部分, 处于外源性病菌入侵机体的门户

基金项目: 湖南省科技厅课题资助项目 (2009RS3011)。

作者简介: 胡彬雅, 女, 主治医师。

通讯作者: 胡彬雅, Email: zhizi628@126.com.

位置,是产生免疫应答的重要场所^[1]。扁桃体产生淋巴细胞,抵御侵入人体的细菌、病毒和其他抗原物质。其功能不仅在于局部免疫,还在于它与全身其他淋巴器官之间发生密切的联系,是一个具有免疫活性的器官。

Toll 样受体是一个介导天然免疫的古老家族,能识别病原体所携带的高度保守的病原体相关分子模式(Pathogen Associated Molecular Pattern , PAMP),同时还能激发免疫细胞合成共刺激分子,活化 T 细胞,调节 Th0 细胞向 Th1 或 Th2 细胞增殖分化,导致机体发生 Th1 或 Th2 免疫反应,影响特异性免疫应答的强度和方向^[2]。变应性鼻炎是儿童常见的呼吸道疾病,与下气道炎性疾病(如哮喘、气管炎等)密切相关。许多学者认为 TLRs 与哮喘、变应性鼻炎等的发病有关,所以研究 TLRs 在处于上呼吸道门户位置的扁桃体中的表达具有重要意义。因此,笔者应用 RT-PCR 技术检测 TLR-4 、TLR-9 mRNA 在变应性鼻炎患儿扁桃体及外周单核细胞中的表达情况,旨在探讨 Toll 样受体在变应性鼻炎患儿扁桃体增殖过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究采用的扁桃体组织来自 2009 年 6 ~ 8 月在湖南省儿童医院耳鼻咽喉科行扁桃体切除术的患儿,共 60 例,其中男 33 例,女 27 例;年龄 3 ~ 12 岁,平均 7 岁。随机分为 3 组,每组 20 例,第 1 组为变应性鼻炎组;第 2 组为慢性鼻窦炎组;第 3 组为无鼻部疾病的正常对照组。所有病例根据病史、鼻内镜检查、鼻窦 CT 扫描、变应原检测进行诊断,并排除其他鼻部疾病。

1.2 方法

常规手术,将术中切取的扁桃体部分组织收入无菌 EP 管, - 70℃ 保存备用。将手术切取的新鲜扁桃体组织先于 750 ml/L 酒精溶液中涮洗 10 s,再于 RPMI 1640 不完全培养基(Sigma)中涮洗 10 s,无菌条件下剪除四周组织,然后将扁桃体实质剪碎,于 200 目筛网中研磨,用 100 ml/L FCS RPMI

1640 制成 PTC 单细胞悬液。
1.3 RT-PCR 检测 TLR-4 、TLR-9 mRNA 的表达

分别提取第 1 组、第 2 组和第 3 组中 PTC 的总 RNA ,紫外分光光度计定量。每个标本分别取 RNA 5 μg ,常规逆转录成 cDNA 。再以第一链 cDNA 2 μl 为模板进行 PCR 。根据 PCR 引物的设计原则,参考 GeneBank 中人 TLR-4 及 GAPDH 的 mRNA 完全序列,利用 PRIMER5 软件设计基因的引物,引物序列(表 1)。所有引物均由南京金思特合成,并经过聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide ge lelectrophoresis , PAGE)纯化。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min ; 95℃ 30 s , 56℃ 30 s , 72℃ 60 s , 35 次循环; 72℃ 延伸 10 min ; 4℃ 后终止反应。反应产物以 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果经 Gene Too1 s 生物学分析软件进行灰度分析。GAPDH 为内参照。以 TLR-4 、TLR-9 产物带与 GAPDH 产物带总吸光值比值表示基因 mRNA 表达水平的高低。

表 1 扩增基因的 PCR 引物序列和 PCR 产物大小

名称	序列	长度(dB)
FW TLR-4	ATAAGTGTCTGAAC TCCCTC	456
RE TLR-4	GCTCATTCTTACCCAGT	
FW TLR-9	TGGACTTCCTGCTGGAGGTG	329
RW TLR-9	CTGCGTTTTGTGCAAGACCA	
GAPDH F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
GAPDH R	TCCACCACCTGTTGCTGTA	

1.4 统计分析

实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异以 SPSS 12.0 软件行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在同一个反应体系内,内参照 GAPDH 有明显扩增,第 1、2 组扁桃体组织中 TLR-4 mRNA 相对含量 (0.801 ± 0.025 、 0.563 ± 0.014) 较第 3 组 (0.414 ± 0.017) 表达增高,差异有统计学意义 ($F = 85.62$, $P < 0.01$),且第 1 组较第 2 组表达增强,差异

有统计学意义($F = 86.04$, $P < 0.01$) (图 1) 。第 1 组 TLR - 9 mRNA 相对含量(1.125 ± 0.015) 较 第 2 组、第 3 组(0.578 ± 0.014 , 0.571 ± 0.015) 表达

增高,差异有统计学意义($F = 116.71$, $P < 0.01$) ,但第 2 组与第 3 组相比,TLR-9 mRNA 含量无明显改变,差异无统计学意义($F = 7.674$, $P > 0.05$) (图 2) 。

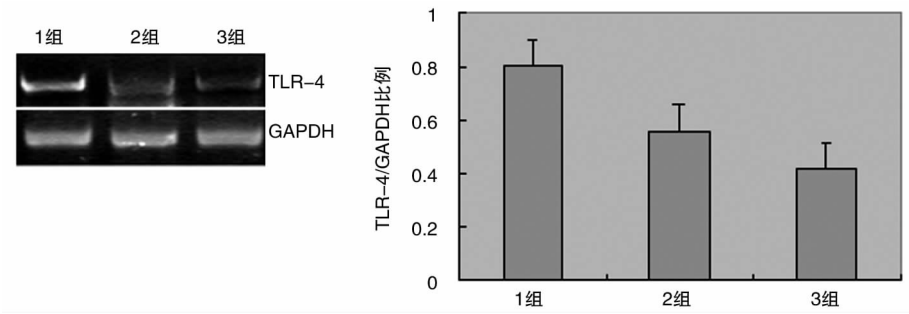


图 1 各组扁桃体组织 TLR-4 mRNA 表达

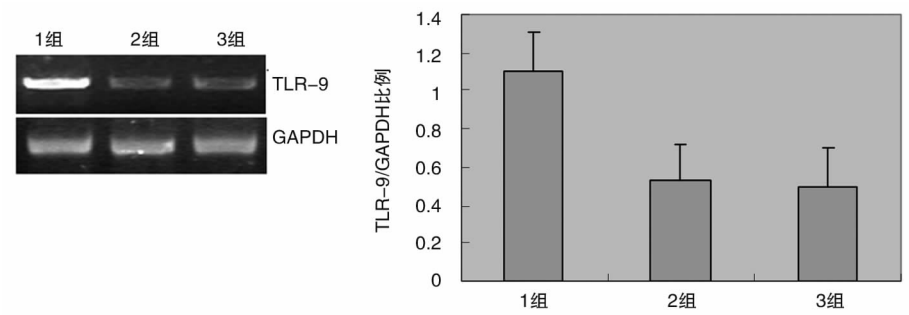


图 2 各组扁桃体组织 TLR-9 mRNA 表达

3 讨论

TLRs 是细胞膜上的一类跨膜蛋白,目前为止人 TLRs 家族的至少 10 个成员已被发现^[3], TLR-4、TLR-9 是人 TLRs 家族的重要成员。TLR-4 主要识别多数革兰氏阴性菌的脂多糖 LPS、热休克蛋白、呼吸道合胞病毒衣壳蛋白等,TLR-9 主要识别细菌和病毒 DNA 中的 Cp G 基序或人工合成的寡脱氧核糖核酸(Cp G oligodeoxynucleotides , Cp G-ODN)^[4]。TLRs 识别其配体后,激活 NF-κB 等核转录因子和蛋白激酶,释放炎症介质激活天然免疫;同时还使抗原呈递细胞表达其刺激分子 CD80、CD86,而最终启动后续的 T、B 细胞介导的特异性免疫^[5]。感染因素在扁桃体炎的发病过程中的作用已成共识。但也有人发现,反复发炎的扁桃体组织中有较多 IgE 的 B 淋巴细胞,因此认为变态反应

在这一过程中也起着重要的作用^[6]。许多学者认为 TLRs 与哮喘、变应性鼻炎等的发病有关,TLRs 是否也在扁桃体组织增生过程中起着重要作用值得探讨。

体外培养的正常小鼠的支气管黏膜上皮细胞层及平滑肌层中发现有 TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5 基因和蛋白的表达^[7]。最近有研究报道季节性变应性鼻炎患者鼻黏膜组织中有 TLR-2、TLR-3、TLR-4 蛋白表达的上调^[8]。本实验研究也发现 TLR-4 基因在正常儿童扁桃体组织中虽有一定表达,但 AR 儿童的扁桃体组织中 TLR-4 基因表达明显上调的现象($P < 0.01$)。因此 TLR-4 可能参与了 AR 儿童扁桃体增殖。以往的实验中已经观察到 AR 大鼠受到 LPS 刺激后可引起过敏症状的加重^[9]。大量流行病学研究发现存在于环境中的病原微生物能对机体的变态反应发生影响^[10-11]。有研究发现 AR 大鼠受到 LPS 刺激后 TLR-4 在鼻

黏膜中的表达进一步增强 ($P < 0.01$)。Eisenbarth 等^[12]用小剂量的 LPS 刺激哮喘模型小鼠,发现小鼠体内 Th2 细胞因子分泌增多,Th2 免疫反应增强;而 LPS 刺激同样致敏条件下的 TLR-4 基因缺陷小鼠,却未能发现 Th2 免疫反应的增强。因此,笔者认为在一定条件下,AR 儿童扁桃体组织隐藏病原微生物激活 TLR-4,导致 Th2 免疫反应的增强,从而引发并加重变态反应,进而刺激扁桃体组织发生增殖。TLR-9 主要介导细菌的 Cp G-ODN,而这一识别有助于 Th1 反应的发展。有研究^[13]对哮喘模型动物在激发前或激发时,进行静脉注射或者气管内滴入 Cp G-ODN,通过组织学的分析以及对支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的计数,可以证实气道内炎症水平降低了,而且 Th2 因子 IL-4、IL-5 产生受到抑制,Th2 因子 IFN- γ 和 IL-12 水平升高,血清中总 IgE 水平降低。有研究^[14]提示 DC 细胞有可能在 TLR-9 与 Cp G-ODN 结合后参与促进 Th1、抑制 Th2 的反应。AR 儿童扁桃体组织中 TLR-9 表达明显增高,TLR-9 激活可诱导 Th1 免疫活化,分泌 I 型干扰素,并激活自然杀伤细胞引起较强 CD₈⁺ T 细胞反应^[15]。扁桃体组织中 TLR-4、TLR-9 表达均上调,两者间究竟有无联系,究竟与扁桃体组织增殖有着怎样的相关性,仍需要进一步研究。

变应性鼻炎儿童扁桃体可以表达 TLR-4、TLR-9 的 mRNA,再次印证了扁桃体在呼吸道天然免疫中的重要地位。笔者认为,儿童扁桃体肥大发病过程中,存在变态反应,且较炎症反应更易刺激扁桃体增殖。由此,在以后的临床工作中,当以整体的观念来看待天然免疫系统和特异性免疫系统的关系。同时对 TLRs 的深入研究也将能有助于以后进一步阐明特异性免疫性疾病的发病机理。

参考文献:

- [1] 王成硕,董震,杨占泉. 腭扁桃体中 $\beta 2$ 防御素的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2004,(3): 129-131.
- [2] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21(3): 335-376.
- [3] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675-680.
- [4] Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. Science, 2004, 303(5663): 1522-1526.
- [5] Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development [J]. Nat Immunol, 2000, 1(3): 199-205.
- [6] Claeys S, Cuvelier C, Van Cauwenberge P. Immunohistochemical analyses of the lymphoepithelium in human nasopharyngeal associated lymphoid tissue (NALT): preliminary results [J]. Acta Otolaryngol, 1996 (suppl), 523(11): 38-43.
- [7] Bachar O, Adner M, Uddman R, et al. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways [J]. Eur J Immunol, 2004, 34(4): 1196-1207.
- [8] Fransson M, Adner M, Erjefält J, et al. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis [J]. Respir Res, 2005, 6(1): 100-109.
- [9] 刘颖,郑春泉,余洪猛,等. 脂多糖对大鼠实验性变应性鼻炎的影响[J]. 中国实验动物学报,2007,15(4): 289-291.
- [10] Braun CF, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children [J]. New Engl J Med, 2002, 347(12): 869-8771.
- [11] Michel O, Kips J, Duchateau J, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 6(Pt 1): 1641-1646.
- [12] Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, et al. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen [J]. J Exp Med, 2002, 196(12): 1645-1651.
- [13] Broide D, Schwarze J, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice [J]. J Immunol, 1998, 161(12): 7054-62.
- [14] Chiang DJ, Ye YL, Chen WL, et al. Ribavirin or CpG DNA sequence-modulated dendritic cells decrease the IgE level and airway inflammation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(5): 575-580.
- [15] Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6): 471-484.

(修回日期:2011-08-02)