

论著 · 临床研究

复发性单纯疱疹患儿外周血 Toll 样受体和细胞因子的变化

汤建萍, 孙磊

(湖南省儿童医院皮肤科, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 通过检测复发性单纯疱疹患儿外周血单个核细胞(PBMC)Toll 样受体(TLR)表达水平及血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平来探讨 TLR2 和 TLR9 在儿童复发性单纯疱疹中的作用。方法 采用流式细胞术检测复发性单纯疱疹患儿 PBMC 上 TLR2 和 TLR9 表达水平,同时采用 ELISA 法检测其血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平,并探讨其相关性。13 例正常儿童为对照组。结果 ①复发性单纯疱疹患儿 PBMC 上 TLR2 和 TLR9 表达水平明显高于正常儿童($P < 0.01$)。②复发性单纯疱疹患儿血清 IL-6 和 IL-10 水平明显升高,TNF- α 水平明显降低,与对照组比较,差异有非常显著性($P < 0.01$)。③复发性单纯疱疹患儿 TLR2 和 TLR9 表达水平与其血清 IL-6 和 IL-10 水平存在线性相关关系($P < 0.01$)。结论 ①TLR2 和 TLR9 可能共同参与了儿童复发性单纯疱疹时人体对单纯疱疹病毒的识别,激活 TLR 信号通路。②儿童复发性单纯疱疹时 TLR2 和 TLR9 可能介导了血清 IL-6、IL-10 的产生和释放。

[中国当代儿科杂志,2009,11(9):722-724]

[关键词] 复发性单纯疱疹;外周血单个核细胞;Toll 样受体;细胞因子;儿童
[中图分类号] R752.1⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)09-0722-03

Expression of blood Toll-like receptors and cytokines in children with recurrent herpes simplex

TANG Jian-Ping, YANG Yu-Jia, SUN Lei. Department of Dermatology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Email: jpingtang@126.com)

Abstract: Objective This study examined the expression of Toll-like receptors (TLR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in children with recurrent herpes simplex, in order to investigate the role of TLR2 and TLR9 in recurrent herpes simplex. **Methods** The expression of TLR2 and TLR9 in PBMC was examined by flow cytometer, and serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α were detected using ELISA in 22 children with recurrent herpes simplex and in 13 age-matched healthy volunteers. **Results** The expression of both TLR2 and TLR9 obviously increased in children with recurrent herpes simplex compared with that in healthy controls ($P < 0.01$). Serum levels of IL-6 and IL-10 increased, while serum TNF- α levels decreased significantly in children with recurrent herpes simplex compared with those in healthy controls ($P < 0.01$). There were positive correlations between TLR2 and TLR9 expression and serum IL-6 and IL-10 levels in children with recurrent herpes simplex ($P < 0.01$). **Conclusions** TLR2 and TLR9 in PBMC may participate in the recognition of herpes simplex virus and activate the signal pathway of TLR in children with recurrent herpes simplex. The production and release of IL-6 and IL-10 might be mediated by TLR2 and TLR9.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (9):722-724]

Key words: Recurrent herpes simplex; Peripheral blood mononuclear cell; Toll-like receptor; Cytokine; Child

儿童复发性单纯疱疹(recurrent herpes simplex, RHS)是一种由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)引起的常见儿童病毒性皮肤病,一般由 HSV1 感染引起,常累及面部,HSV 感染人体后可长期潜伏于局部神经节内,当机体受到某种刺激或免疫功能低下时在同一部位复发。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是天然免疫系统中的跨膜受体,可非特异性地与病原相关分子结合,启动信号转导,最终导致核因子- κ B 激活,引发炎症介质表达,因而成为联系天然免疫和获得性免疫的纽带,可能在病毒性疾病中发挥重要作用。为了探讨儿童 RHS 的发病机制,本研究调查了 RHS 患儿外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)TLR2 和 TLR9 表达水平及与血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平

[收稿日期]2008-12-13;[修回日期]2009-02-07
[基金项目]湖南省科技厅课题(05FJ3026)。
[作者简介]汤建萍,女,博士,主任医师。主攻方向:小儿皮肤病和过敏性疾病。

的关系。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

22 例儿童 RHS 病例来自湖南省儿童医院皮肤科门诊,其中男 9 例、女 13 例,年龄 3 ~ 13 岁,平均 5.9 岁,符合《临床皮肤病学》RHS 诊断标准^[1],并排除了内科疾病。所有患者就诊时均为发作期,采血前 4 周内均未曾使用免疫调节药物。病程 6 个月至 11 年,平均 3.1 年;复发次数 2 ~ 13 次,平均 6.7 次;所有患儿均取血清进行 HSV1 和 HSV2 IgG 和 IgM 检测,其中 HSV 抗体阳性 18 例,阳性率 81.8%,均为 HSV1 阳性,其中 IgG 和 IgM 双阳性 13 例,单纯 IgM 阳性 5 例。正常对照组 13 例为湖南省儿童医院儿童保健所体检的正常儿童,其中男 5 例、女 8 例;年龄 3 ~ 7 岁,平均 4.3 岁。受试前 4 周无细菌、病毒和真菌等感染,且未曾使用免疫调节药物。

1.2 方法

1.2.1 主要设备和试剂 FACS Calibur 流式细胞仪由美国 Becton Dickinson 公司生产,FITC 标记的抗人 TLR2 (CD282) 和 PE 标记的抗人 TLR9 (CD289) 单克隆抗体由美国 eBioscience 公司生产。IL-6,IL-10 和 TNF-α 试剂由美国 Biosource 公司生产,上海森雄科技实业有限公司分装。

1.2.2 TLR2 和 TLR9 测定 对全部受试者取外周静脉 EDTAK2 抗凝血 3 mL, - 70℃ 保存备用。TLR2 和 TLR9 测定采用全血双色免疫荧光直标法,在流式细胞仪上检测。具体测定程序如下:取 Falcon 管分别加入抗凝血 100 μL 及 CD282 (TLR2) - FITC 和 CD289 (TLR9) - PE 各 20 μL,混匀后 4℃ 避光孵育 30 min,加入溶血素 2 mL,混匀,室温暗处反应 8 min,离心 1 500 r/min,5 min 后弃上清液;加

PBS 洗液 2 mL,离心 1 500 r/min,5 min,弃上清液,加 500 μL 1% 多聚甲醛液混匀后上机检测。用前向角/侧向角设定外周血单个核细胞门 R1,收集门内 3 000 个细胞,用 CellQuest 软件分析 R1 门 TLR2 和 TLR9 抗体染色阳性细胞百分率。

1.2.3 IL-6,IL-10 及 TNF-α 测定 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 方法,测定受试者血清 IL-6,IL-10 及 TNF-α 水平,实验时严格按试剂说明书操作。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 11.5 统计软件分析,各组检测结果均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组比较采用两样本的 *t* 检验,TLR 与细胞因子的关系分析采用多元线性回归分析,*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 RHS 患儿 PBMC 上 TLR2 和 TLR9 表达水平

22 例 RHS 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 阳性细胞率分别为 (70.34 ± 9.70)% 和 (96.05 ± 1.39)%,TLR2 和 TLR9 双表达阳性细胞率为 (70.03 ± 9.70)%,与正常对照组比较,其 TLR2,TLR9 表达水平和两者双表达水平均显著增加,*t* 分别 = 5.21,11.285,5.523,均 *P* < 0.01。见表 1 和图 1。

表 1 RHS 患儿 PBMC 上 TLR2 和 TLR9 表达水平
($\bar{x} \pm s, \%$)

	例数	TLR2	TLR9	TLR2 和 TLR9 双表达
正常对照组	13	18.25 ± 1.98	51.79 ± 3.66	15.46 ± 1.86
RHS 组	22	70.34 ± 9.70 ^a	96.05 ± 1.3 ^a	70.03 ± 9.70 ^a

a: 与正常对照组比较, *P* < 0.01

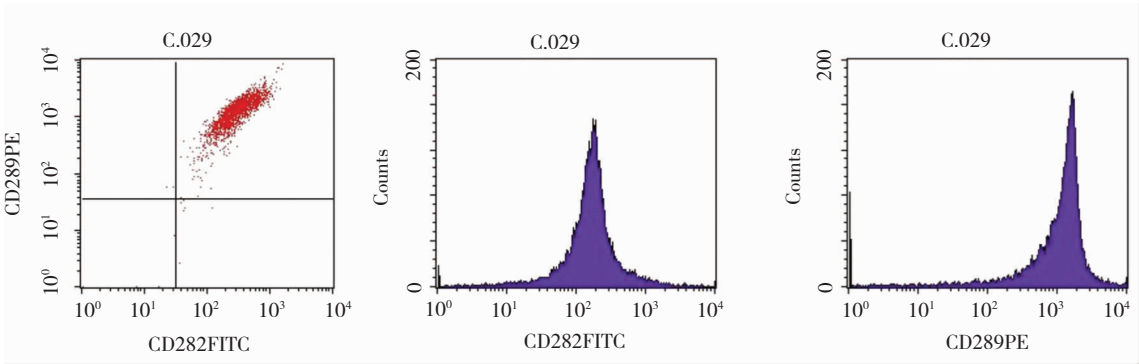


图 1 一例 RHS 患儿 PBMC 上 TLR2 和 TLR9 表达水平

2.2 患儿血清 IL-6,IL-10 和 TNF-α 水平

RHS 患儿血清 IL-6,IL-10 及 TNF-α 水平见表 2,与正常对照组比较,血清 IL-6 和 IL-10 水平明显升高,TNF-α 水平降低,*t* 值分别 = -3.626,4.15, -7.168,均 *P* < 0.01。

表 2 患儿血清 IL-6,IL-10 及 TNF-α 水平

($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

分组	例数	IL-6	IL-10	TNF-α
正常对照组	13	37.42 ± 8.78	2.03 ± 0.32	24.95 ± 1.77
RHS 组	22	81.66 ± 4.44 ^a	6.30 ± 0.98 ^a	10.83 ± 1.09 ^a

a:与正常对照组比较,均 *P* < 0.01

2.3 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 表达水平与血清 IL-6,IL-10,TNF-α 水平的关系

将 RHS 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 表达水平分别与相应的血清 IL-6,IL-10 和 TNF-α 水平进行多元线性回归分析,发现患儿 TLR2 水平和 TLR9 水平与血清 IL-6 和 IL-10 水平存在线性相关关系(*F* 值分别 = 15.655 和 55.264,均 *P* < 0.01),但与 TNF-α 无相关性。

3 讨论

在 TLRs 家族中,TLR2 和 TLR9 是目前研究较多的两种重要的模式识别受体。TLR9 主要识别含非甲基化 CpG 基序的细菌和病毒。TLR2 具有广谱识别能力,不但具有促进细胞因子的合成与释放、促进免疫细胞成熟、分化等作用,还在调节机体对入侵病原体的免疫应答水平及抗病毒方面有不容忽视的作用。目前 RHS 发病机制尚不十分清楚。国外研究显示 TLRs 在 HSV 感染中起重要作用。已有动物实验研究发现,在 HSV 感染中,TLR9 识别 HSV 的 CpG DNA,TLR2 识别 HSV 的被膜糖蛋白来启动 TLR 信号转导,最终导致核因子-κB 激活,引发炎症介质表达^[2~8]。采用基因敲除小鼠研究证明 TLR2 能识别 HSV,介导了对 HSV 感染的炎症性细胞因子反应,而且 TLR2 介导的强烈炎症性细胞因子反应能引起宿主死亡^[6]。

本研究运用全血双色免疫荧光直标法观察 RHS 患儿和正常儿童 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 表达情况。结果显示,RHS 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 表达水平明显高于正常儿童(*P* < 0.01),同时 RHS 患儿血清 IL-6 和 IL-10水平明显增加,而 TNF-α

水平降低(*P* < 0.01),提示 HSV 感染时 TLR2 和 TLR9 参与了对 HSV 的识别,在抗 HSV 免疫中起重要作用,Th1 和 Th2 型细胞因子均参与了机体 HSV 感染的炎症反应。同时发现 RHS 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 表达水平与其血清 IL-6 和 IL-10 水平之间存在线性相关关系,提示 TLR2 和 TLR9 可能介导了上述细胞因子的产生和释放。实验中还发现 RHS 患儿 PBMC 表面 TLR2 和 TLR9 双表达水平较正常儿童组明显增加(*P* < 0.01),提示儿童 HSV 感染时 TLR2 和 TLR9 可能同时或先后识别 HSV,触发天然免疫反应,刺激炎症性细胞因子产生,最终引起获得性免疫反应。本研究提示儿童 RHS 时人体可能通过 TLR9 识别 HSV 的 CpG DNA,TLR2 识别 HSV 的被膜糖蛋白来介导 TLR 信号转导,启动天然免疫系统。为阐明儿童 RHS 的发病机制提供了新的理论依据,为临床上寻找新的治疗途径与靶点提供了新的思路。

[参 考 文 献]

[1] 徐文严.生殖器疱疹[M].// 赵辨.临床皮肤病学.第3版.南京:江苏科学技术出版社,2003,541-546.

[2] Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(31):11416-11421.

[3] Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells[J]. J Exp Med, 2003, 198(3):513-520.

[4] Sato A, Linehan M, Iwasaki A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells[J]. PNAS, 2006, 103(46):17343-17348.

[5] Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-α and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis[J]. J Infect Dis, 2007, 196(6):853-860.

[6] Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5):1315-1320.

[7] Gill N, Davies EJ, Ashkar AA. The role of toll-like receptor ligands/agonists in protection against genital HSV-2 infection[J]. Am J Reprod Immunol, 2008, 59(1):35-43.

[8] Hayashi K, Hooper LC, Chin MS, Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA and immune complex (HSV-1-human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 8):2161-2169.

(本文编辑:吉耕中)