

TLR4 基因单核苷酸多态性与哮喘严重度及哮喘相关临床指标的关系

鲁静洁¹, 钱粉红², 殷小伟¹, 殷凯生³, 施毅⁴, 张倩^{1,4*}

(¹南京医科大学附属常州第二人民医院呼吸科, 江苏 常州 213003; ²江苏大学附属江滨医院呼吸科, 江苏 镇江 212001; ³南京医科大学第一附属医院呼吸科, 江苏 南京 210029; ⁴南京军区南京总医院呼吸科, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:探讨 Toll 样受体 4(TLR4)单核苷酸多态性(SNPs)与哮喘发病严重度和哮喘相关临床指标的相关性。方法:在 HapMap 上挑选 *TLR4* 的全部标签 SNPs。连续性招募哮喘患者 318 例。采用 SNPstream 和 Taqmans 法进行基因分型。流式细胞技术检测外周血中 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞及其表面 TLR4 的表达。结果:*TLR4* 的 4 个标签 SNPs rs1927914、rs10983755、rs11536879、rs1927907 与哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞、血清总 IgE 和 hsCRP 无相关性。但是 rs1927914 TT 基因型比 TC 和 CC 基因型的 FEV₁% 要低($P = 0.043$),哮喘发病程度更严重($P = 0.024$)。同样,rs10983755 GG 基因型比 GA 和 AA 基因型、rs1927907 GG 基因型比 GA 和 AA 基因型哮喘发病程度更严重($P = 0.009$ 和 $P = 0.013$)。*TLR4* SNPs 与哮喘患者外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞无相关性,但是和 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞表面 TLR4 的表达量有关。结论:*TLR4* SNPs 和哮喘严重度分级及 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞表面 TLR4 的表达量相关,与哮喘其他表型无相关性。*TLR4* SNPs 可能影响哮喘症状的严重度,这为哮喘的基因治疗提供了一定理论基础。

[关键词] 哮喘;单核苷酸多态性;CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞;Toll 样受体 4

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1231-06

doi:10.7655/NYDXBNS20130911

Association between polymorphisms of Toll-like receptor 4 and asthma severity and asthma-related phenotypes

Lu Jingjie¹, Qian Fenhong², Yin Xiaowei¹, Yin Kaisheng³, Shi Yi⁴, Zhang Qian^{1,4*}

(¹Department of Respiratory Medicine, Changzhou No.2 People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003; ²Department of Respiratory Medicine, Jiangbing Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212001; ³Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ⁴Department of Respiratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:**To evaluate the effects of polymorphisms of Toll-like receptor 4 (*TLR4*) on asthma severity and asthma-related phenotypes in a Chinese Han population. **Methods:**Four tagging single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *TLR4* gene were detected using GenomeLab SNPstream or TaqMans Genotyping in 318 adult asthmatic patients. Peripheral CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells and expression of TLR4 were detected by flow cytometry. Linear regression and Ordinal logistic regression, adjusted for age, gender, smoking status, inhaled corticosteroid treatment and SPT, were applied appropriately. A 2-sided P value < 0.05 was considered significant. **Results:**The distribution of each genetic variant met the conditions of the Hardy - Weinberg equilibrium (HWE). We found no evidences supporting a significant association between *TLR4* SNPs and eosinophil counts, serum hsCRP, total serum IgE levels in asthmatic patients. However, our results revealed that the TT homozygote of rs1927914 was associated with lower FEV₁% in asthmatic patients. An evidently positive association was found between the TT genotype of rs1927914, or the GG genotype of rs10983755 and rs1927907, and asthma severity ($P = 0.024, 0.009, 0.013$, respectively), which indicated that the C allele of

[基金项目] 国家自然科学基金(81270077);中国博士后科学基金资助项目(2012T50894,2012M521936);江苏省医学重点学科开放课题(KF200920);常州市卫生局重大课题(ZD201002);常州市应用基础研究项目(CJ20122005);常州市卫生局重点医学创新人才项目资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail:kezhang0601@163.com

rs1927914, and the A allele of rs10983755 and rs1927907 had a protective effect on asthma severity. Although no significant association between TLR4 SNPs and the CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell counts in peripheral blood from asthmatic patients was found, the expression of TLR4 on the surface of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells was related to TLR4 SNPs. **Conclusion:** TLR4 polymorphisms may influence the severity of asthma. It could be clinically useful for gene therapy of asthma.

[Key words] asthma; polymorphism; CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell; toll-like receptor 4

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1231-1236]

哮喘具有遗传易感性,多个基因和环境因子控制其发生发展。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)识别环境中微生物的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)并且桥接人体的天然和获得性免疫,对Th1/Th2平衡和调节性T细胞功能发挥调节作用,从而在哮喘的发生发展中具有重要意义^[1]。TLR4属TLRs家族,识别细菌外膜中的脂多糖(LPS),而后者对哮喘等气道过敏性炎症有重要调节作用^[2-3]。TLR4单核苷酸基因多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)和哮喘的关系各研究报道不一,我们设计了单纯病例研究,分析TLR4 SNPs与中国汉族哮喘患者的发病严重程度及相关临床指标的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

南京医科大学第一附属医院呼吸科门诊连续性招募318例哮喘患者,哮喘诊断参照GINA指南标准,哮喘的严重程度分级根据临床特征分为间歇、轻度持续、重度持续、重度持续。所有哮喘患者至少有1年以上哮喘病史,并且符合以下标准之一:①呼气峰值流速(PEF)日夜变异率 $\geq 20\%$;②吸入短效 β_2 受体激动剂10~20 min后一秒钟用力呼气量(FEV₁)增加 $\geq 12\%$,且绝对值 ≥ 200 ml;③运动后5~15 min FEV₁下降 $\geq 15\%$ 或PEF下降 $\geq 20\%$ 。排除标准为除哮喘外的其他呼吸道疾病,近期上、下呼吸道感染,慢性阻塞性肺病,妊娠,心、肝、肾疾病,糖尿病,肿瘤,近期手术,系统性炎症性疾病(如血管胶原性疾病和炎症性肠病)等。所有患者都填写一份标准调查表,进行肺功能、外周血嗜酸性粒细胞(Eos)计数、胸部X线和其他一些必要的检查。特应症的诊断根据皮肤过敏原点刺试验(SPT)确定。所有受试者均来自南京和周边地区无血缘关系的中国汉族人群,均填写知情同意书。

过敏原皮肤点刺试验液(ALK-Abelló A/S,丹麦);全血DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Blood

Mini kit, Qiagen公司,美国);抗CD3-APC抗体(S4.1)、抗CD4-PE-Cy5.5抗体(S3.5)、抗CD25-FITC抗体(CD25-3G10)(Caltag公司,美国);抗TLR4-PE抗体(HTA125)(eBioscience公司,美国);淋巴细胞分离液(TBD公司,中国);Hotstar Taq酶(Qiagen公司,美国);TaqMan[®] Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems公司,美国);TaqMans SNP Genotyping Assay Mix(Applied Biosystems公司,美国);外切核酸酶I(New England BioLabs公司,英国);碱性磷酸酶SAP(Promega公司,美国);人IgE ELISA定量试剂盒(Bethyl公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 SPT

在前臂腹侧进行SPT,共25种常见气源性过敏原,包括:屋尘螨、粉尘螨、猫毛、狗毛、蟑螂、花粉、豕草、艾蒿和霉菌,以组胺为阳性对照,生理盐水为阴性对照。风团平均直径 > 3 mm视为阳性。

1.2.2 肺功能测定

肺功能测定使用便携式肺功能仪(MicroLab Spiro V 1.34, Micro Medical Ltd, 英国),指导受试者进行用力肺活量测定,记录FEV₁、一秒钟用力呼气量占预计值百分比(FEV₁%)、用力肺活量占预计值百分比(FVC%)和FEV₁/FVC,共3次,取最佳值。

1.2.3 血样采取和DNA提取

于清晨7:00~9:00用无菌真空EDTA抗凝采血管采血5 ml,4℃,1 300 g离心10 min,上层的血浆-70℃保存待测血浆因子,吸取中间的白细胞层,-20℃保存待提取基因组DNA。基因组DNA用QIAamp DNA Blood Mini kit试剂盒提取,按照试剂盒说明严格操作。提取的DNA浓度和纯度在紫外分光光度仪上测定。

1.2.4 基因分型

在国际人类基因组单体型图计划数据库(<http://www.hapmap.org>)中,根据①中国北京汉族人群;② $r^2 = 0.8$;③少数等位基因频率(MAF) > 0.05 标准,运用Tagger-pairwise Tagging算法挑选出TLR4全部标签

SNPs, 分别为 rs1927914、rs10983755、rs11536879 和 rs1927907。rs1927914 和 rs10983755 采用 SNPstream 基因分型法,rs11536879 和 rs1927907 采用 TaqMans SNP 基因分型法,随机抽取 10%的样本复测以确认

分型准确性和符合率。分型成功率 > 96%,符合率为 100%。引物和探针用 Autoprimer design tool(<http://www.autoprimer.com>)设计,由上海 SBS 基因技术公司合成,引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针

Table 1 PCR primers and extension probes

SNPs	Primer	Sequence 5'→3'
rs1927914	Forward	ATTGGAAGTGCTTGGAGGA
	Reverse	TTGTAAAGCTTTTAGGACAGTGTCT
	Probe	GCGGTAGGTTCCCGACATATAGTAGAACTATCTAGGACTTAGCAT
rs10983755	Forward	CCCAGTCCACCACAAAAT
	Reverse	TAGATAGTTCTACTGTAATATCCTCCAAGC
	Probe	GGATGGCGTTCCTATTTCCCTCACAGCTTGGTTTTTGACAC
rs11536879	TaqMans	
rs1927907	TaqMans	

1.2.5 血浆 IgE 和超敏 C 反应蛋白(hsCRP)测定

血浆 IgE 水平用人 IgE ELISA 定量试剂盒检测,严格按试剂盒说明书操作,最低检测水平为 6.51 IU/ml。hs-CRP 测定参照文献[4]。

1.2.6 流式细胞仪检测外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞及细胞表面分子

按试剂盒说明书操作,CD4⁺CD25⁻ 的细胞群根据同型对照设门,CD25^{high} 细胞则根据非 CD4⁺ T 细胞上的低强度 CD25 来定。CD25 表达高于同型对照而低于 CD25^{high} 细胞者定义为 CD25^{low}。具体方法参照文献[5]。

1.3 统计学方法

采用 SAS9.1.3 软件(SAS Institute, Cary, NC, USA) 进行分析。等位基因频率用 goodness-of-fit χ^2 检验哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。连续性资料用线性回归,两分类资料用有序 Logistic 回归分析,并且用年龄、性别、吸烟、用药和 SPT 校正。各基因型中 CD4⁺CD25^{high} T 细胞、TLR4⁺ CD4⁺CD25^{high} T 细胞的比较用方差分析(one-way ANOVA),组间比较用 q 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 哮喘患者一般情况

318 例哮喘患者的一般临床资料见表 2。

2.2 等位基因在哮喘人群中的分布

各等位基因型频率均符合 HWE ($P > 0.05$)。rs1927914、rs10983755、rs11536879 和 rs1927907 的少数等位基因频率(MAF)分别为 41.35%、27.67%、

表 2 哮喘患者一般临床资料

Table 2 Demographic characteristics of asthmatic patients

项目	哮喘患者 ($\bar{x} \pm s$)
年龄(岁)	39.80 ± 14.24
性别[n(%)]	
男	135(42.45)
女	183(57.55)
吸烟[n(%)]	
非吸烟	280(88.05)
吸烟	38(11.95)
SPT 阳性[n(%)]	237(75.00)
哮喘分级[n(%)]	
间隙发作	70(22.01)
轻度持续	50(15.72)
中度持续	87(27.36)
中度持续	111(34.91)
吸入激素[n(%)]	175(55.03)
FEV ₁ %(%)	74.11 ± 23.66
FEV ₁ /FVC(%)	76.18 ± 12.78
Eos($\times 10^6$ /ml)	0.46 ± 0.71
log ₁₀ IgE(IU/ml)	1.82 ± 0.50
hsCRP(mg/L)	2.50 ± 5.79

肺功能为吸入支气管舒张剂之后的数值。

13.32%和 25.64%(表 3)。

2.3 基因型和哮喘相关临床指标的关系

TLR4 4 个位点的 SNPs 与哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞、血清总 IgE 和 hsCRP 无相关性。但是携带 rs1927914 TT 基因型的哮喘患者比携带 TC 和 CC 基因型者的 FEV₁%要低,分别为 67.58% ± 25.00%、71.54% ± 25.01%和 71.13% ± 28.83%($P = 0.043$),携带 rs1927914 TT 基因型的哮喘患者比携带 TC 和 CC 基因型者哮喘发病程度更严重 ($P =$

表3 等位基因在哮喘人群中的分布

Table 3 Tagging SNPs selected from HapMap

SNPs	等位基因	HWE	分型成功率(%)	少数等位基因频率 MAF(%)
rs1927914	T>C	0.93	99.7	41.35
rs10983755	G>A	0.31	99.9	27.67
rs11536879	A>G	0.09	97.3	13.32
rs1927907	G>A	0.32	96.7	25.64

0.024)。同样,携带 rs10983755 GG 基因型的哮喘患者比携带 GA 和 AA 基因型者、携带 rs1927907 GG 基因型的哮喘患者比携带 GA 和 AA 基因型者

哮喘发病程度更严重 ($P = 0.009$ 和 $P = 0.013$, 表4)。

2.4 基因型与哮喘患者外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性

表4 TLR4 基因型和哮喘相关临床指标的关系

Table 4 Association of TLR4 polymorphisms with asthma-related phenotypes

($\bar{x} \pm s$)

SNPs	Eos ($\times 10^6/ml$)	FEV ₁ % (%)	FEV ₁ /FVC (%)	hsCRP (mg/L)	log ₁₀ IgE (IU/ml)	哮喘严重度 n (%)				
						1级	2级	3级	4级	
rs1927914										
TT	0.57±1.12	67.58±25.00	66.72±14.34	2.67±6.87	1.87±0.51	19(17.43)	14(12.84)	33(30.28)	43(39.45)	
TC	0.41±0.33	71.54±25.01	69.07±14.50	2.70±5.81	1.78±0.51	36(23.23)	25(16.13)	41(26.45)	53(34.19)	
CC	0.37±0.29	71.13±28.83	68.55±16.44	1.55±2.43	1.86±0.46	15(27.78)	11(20.37)	13(24.07)	15(27.78)	
P 值	0.157*	0.043*	0.109*	0.370*	0.724*	0.024#				
rs10983755										
GG	0.50±0.92	68.38±25.28	67.55±14.74	2.52±6.09	1.85±0.50	31(18.24)	21(12.35)	50(29.41)	68(40.00)	
GA	0.41±0.33	72.52±26.65	68.82±15.27	2.71±5.93	1.80±0.52	32(26.67)	23(19.17)	30(25.00)	35(29.17)	
AA	0.41±0.26	70.50±23.63	69.27±13.13	1.42±2.36	1.76±0.44	7(25.00)	6(21.43)	7(25.00)	8(28.57)	
P 值	0.398*	0.297*	0.542*	0.606*	0.629*	0.009#				
rs11536879										
AA	0.45±0.59	69.73±24.59	67.99±14.32	2.74±6.40	1.82±0.52	49(21.78)	36(16.00)	62(27.56)	78(34.67)	
AG	0.37±0.30	72.48±28.16	69.14±16.56	1.92±4.08	1.82±0.47	18(23.38)	13(16.88)	21(27.27)	25(32.47)	
GG	0.35±0.49	40.00±21.21	50.85±0.35	5.57±6.55	1.69±0.41	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(100.00)	
P 值	0.570*	0.197*	0.265*	0.547*	0.624*	0.858#				
rs1927907										
GG	0.50±0.90	68.85±25.21	67.78±14.60	2.66±6.12	1.84±0.50	33(18.64%)	23(12.99)	51(28.81)	70(39.55)	
GA	0.42±0.33	71.82±26.82	68.30±15.55	2.03±4.74	1.81±0.52	30(26.55%)	22(19.47)	29(25.66)	32(28.32)	
AA	0.39±0.30	72.54±24.52	70.67±12.86	1.78±2.55	1.78±0.45	7(29.17%)	5(20.83)	5(20.83)	7(29.17)	
P 值	0.536*	0.441*	0.497*	0.410*	0.792*	0.013#				

*:线性回归分析,经年龄、性别、吸烟、用药和 SPT 校正;#:有序 Logistic 回归分析,经年龄、性别、吸烟、用药和 SPT 校正。

T 细胞和 TLR4⁺ CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞的关系

哮喘患者外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞/CD4⁺ T 细胞的比值在 TLR4 4 个位点的基因型中均无差异(图1)。但是,TLR4⁺CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞/CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞的比值在 TLR4 rs1927914、rs10983755、rs1927907 的基因型中有差异(图2)。

3 讨论

本研究中发现,TLR4 rs1927914 TT 基因型与哮喘患者低 FEV₁% 相关,rs1927914 TT 基因型、

rs10983755 GG 基因型、rs1927907 GG 基因型和哮喘发病严重度有关,虽然 TLR4 SNPs 和哮喘患者外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞比例无关,但与 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞表面 TLR4 的表达有关。

众所周知,哮喘的主要免疫学特征是过度 Th2 反应的 Th1/Th2 平衡紊乱^[6]。TLR4 通过激活宿主天然免疫和获得性免疫对抗细菌性感染,从而在宿主防御中发挥重要作用,但是不适当的 TLR4 应答会导致急性炎症反应^[7]。TLR4 与 LPS 结合后被激活,通过其下游一系列衔接分子的磷酸化和去磷酸化,激活转录因子核因子 κB(NF-κB),最后导致干

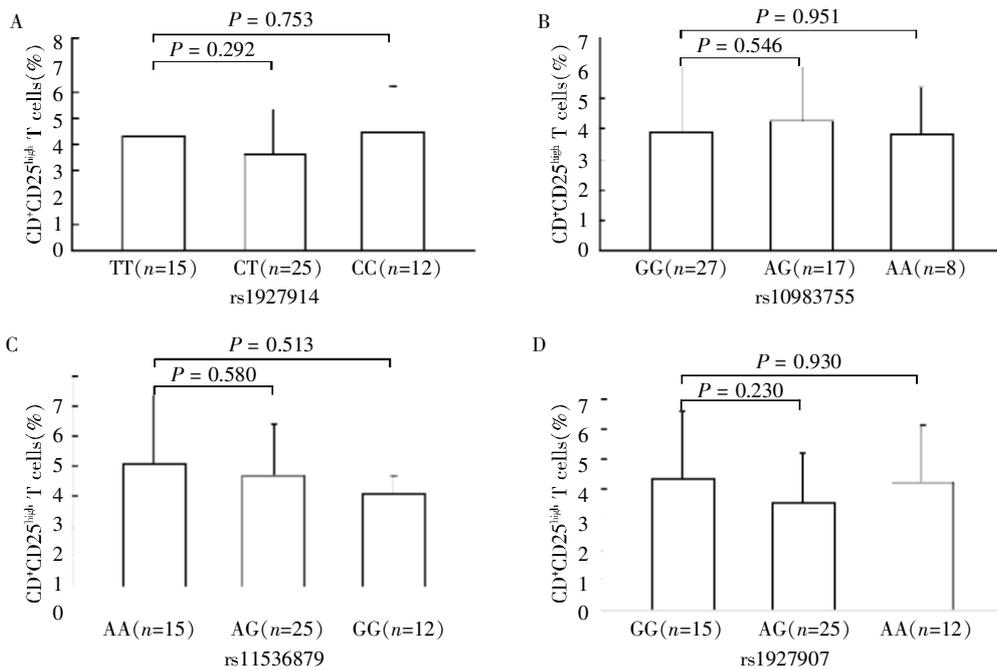


图 1 基因型和哮喘患者外周血 CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞的关系

Figure 1 Association of TLR4 polymorphisms with CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in peripheral blood from asthmatic patients

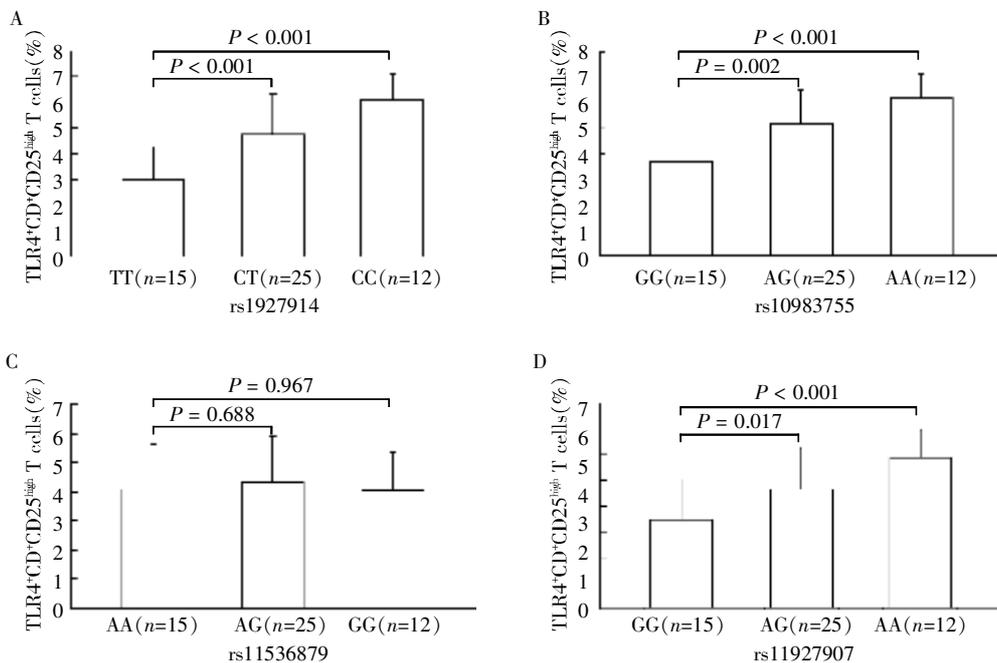


图 2 基因型和哮喘患者外周血 TLR4⁺ CD4⁺CD25^{high} 调节性 T 细胞的关系

Figure 2 Association of TLR4 polymorphisms with TLR4⁺ CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in peripheral blood from asthmatic patients

扰素(IFN)- α 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白介素(IL)-1 β 、6、12 等炎症因子和调节因子的表达与生成,诱导抗原递呈细胞(APC)成熟并且促使 Th0 细胞向 Th1 方向分化^[8]。因此,TLR4 在哮喘的发生发展中具有重要作用,但是关于 TLR4 基因多态性与哮喘易感性的研究结果却不一致^[9-11]。

本研究发现 *TLR4* SNPs 影响哮喘患者的肺功能和发病严重程度,这与 Saçkesen 等^[12]报道的一致。一项基因重组近亲系小鼠的连锁分析发现 *TLR4* 基因与臭氧诱导的肺部渗透和严重有关^[13],*TLR4* 缺陷小鼠不易发生臭氧诱导的气道高反应^[14]。而高臭氧暴露是哮喘肺功能差、气道和全身炎症重的预测指

标^[15]。因此本文猜测 *TLR4* 的遗传变异降低了与臭氧有关的反应,从而影响哮喘患者的肺功能和发病严重度;其次,由于 LPS 可以加重已经存在的哮喘症状,*TLR4* 的遗传变异改变了对 LPS 的反应应答,因此影响哮喘的发病严重度。

本课题组之前的研究发现 *TLR4* 在 $CD4^+CD25^{high}$ 调节性 T 细胞表面高表达, $CD4^+CD25^{high}$ 调节性 T 细胞对哮喘的发生发展有重要作用,但是并未深入研究 *TLR4* 的作用^[5]。有研究报道激活 *TLR4* 可以直接或间接地影响调节性 T 细胞的功能,从而影响 Th1/Th2 平衡^[16]。本研究中发现 *TLR4* SNPs 和哮喘患者外周血 $CD4^+CD25^{high}$ 调节性 T 细胞表面 *TLR4* 的表达有关,我们猜想 *TLR4* SNPs 可能通过改变 $CD4^+CD25^{high}$ 调节性 T 细胞表面 *TLR4* 的表达量对哮喘的严重度发生影响。当然,这还需要进一步深入研究来证实。

总之,本文研究发现 *TLR4* SNPs 与哮喘患者的外周血嗜酸性粒细胞、血浆总 IgE、hsCRP 无关,但是与哮喘发病严重度和外周血 $CD4^+CD25^{high}$ 调节性 T 细胞表面 *TLR4* 的表达相关。这提示 *TLR4* 与哮喘有密切关系,为阐明哮喘发生发展的机制提供了依据和思路,为哮喘的基因治疗提供了一定理论基础。

[参考文献]

- [1] 张倩,殷凯生. Toll 样受体、 $CD4^+CD25^+$ 调节性 T 细胞与支气管哮喘的关系[J]. 国际呼吸杂志,2007,27(11):843-846
- [2] Dong L, Li H, Wang S, et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via *TLR4* pathway in alveolar macrophages[J]. J Asthma, 2009,46(3):229-233
- [3] Peters M, Dudziak K, Stiehm M, et al. T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells [J]. Immunol Cell Biol, 2010,88(5):537-544
- [4] Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, et al. High sensitivity C-reactive protein: a predicative marker in severe asthma[J]. Respirology, 2008,13(5):664-669
- [5] Zhang Q, Qian FH, Liu H, et al. Expression of surface markers on peripheral $CD4^+CD25^{high}$ T cells in patients with atopic asthma; role of inhaled corticosteroid[J]. Chin Med J, 2008,121(3):205-212
- [6] 周丹阳,曹琦,黄茂,等. 原花青素抑制哮喘小鼠气道炎症及气道高反应性[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(7):981-985
- [7] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2010,11(5):373-384
- [8] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling [J]. Nat Rev Immunol, 2004,4(7):499-511
- [9] Hsieh YY, Wan L, Chang CC, et al. *STAT2* * C related genotypes and allele but not *TLR4* and *CD40* gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma[J]. Int J Biol Sci, 2009,5(1):74-81
- [10] Reijmerink NE, Bottema RW, Kerckhof M, et al. *TLR*-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy [J]. Allergy, 2010,65(2):199-207
- [11] Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, et al. Toll-like receptors and *CD14* genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children [J]. Tissue Antigens, 2008,71(5):417-425
- [12] Saçkesen C, Karaaslan C, Keskin O, et al. The effect of polymorphisms at the *CD14* promoter and the *TLR4* gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma [J]. Allergy, 2005,60(12):1485-1492
- [13] Kleeberger SR, Reddy S, Zhang LY, et al. Genetic susceptibility to ozone-induced lung hyperpermeability: Role of Toll-like receptor 4 [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000,22(5):620-627
- [14] Garantziotis S, Li Z, Potts EN, et al. *TLR4* is necessary for hyaluronan-mediated airway hyperresponsiveness after ozone inhalation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010,181(7):666-675
- [15] Khatri SB, Holguin FC, Ryan PB, et al. Association of ambient ozone exposure with airway inflammation and allergy in adults with asthma[J]. J Asthma, 2009,46(8):777-785
- [16] Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of $CD4^+CD25^+$ T cell-mediated suppression by dendritic cells[J]. Science, 2003,299(5609):1033-1036

[收稿日期] 2013-05-17