

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.12.1606

慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉患者鼻黏膜嗜酸粒细胞趋化因子及白细胞介素5的表达及相关性分析

哈再古丽·贾汉, 雍 军*

新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 乌鲁木齐 830000

[关键词] 鼻鼻窦炎; 鼻息肉; 嗜酸粒细胞; 白细胞介素-5; 趋化因子

[中图分类号] R 392.32

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2017)12-1606-04

Expression of eotaxin and interleukin-5 in nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and their correlation

Hazaiguli Jiahan, YONG Jun*

Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

[Key words] rhinosinusitis; nasal polyp; eosinophils; interleukin-5; chemokine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(12): 1606-1609]

慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP)为常见慢性鼻-鼻窦炎,是引起患者嗅觉功能减退的主要原因^[1]。研究发现,CRSwNP患者病变组织常伴有嗜酸粒细胞(eosinophil, EOS)浸润,且EOS浸润在鼻息肉的形成及进展中有重要作用^[2]。然而目前CRSwNP患者发生EOS浸润的原因尚未明确。Ba等^[3]研究发现,虽然人外周血中EOS占白细胞比例不及10%,但其对变应原、致炎因子引起的炎性反应有重要的介导作用。EOS为白细胞介素5(interleukin-5, IL-5)的关键效应细胞,IL-5在EOS浸润过程中有促使其趋化、活化和抑制凋亡作用^[4]。也有研究发现,免疫球蛋白E(IgE)介导的I型变态反应是引起细胞活化、EOS浸润的主要原因,而细胞因子IL-5在IgE生成过程中发挥调节作用^[5-6]。目前对于CRSwNP患者鼻黏膜EOS趋化因子(Eotaxin-2)在息肉形成过程中的机制及其与IL-5的关系尚未见报道。因此,本研究对新疆医科大学第一附属医院收治的48例CRSwNP患者展开分析,以探讨CRSwNP患者鼻息肉黏膜Eotaxin-2及IL-5表达

及其相关性。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择2013年1月至2016年3月新疆医科大学第一附属医院收治的48例CRSwNP患者作为研究组,纳入标准:符合慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南中的CRSwNP诊断标准^[5];入组前1周末使用抗组胺药及肾上腺皮质激素;择期接受手术治疗,术中留取鼻息肉黏膜组织;无过敏性鼻炎、变应性哮喘等疾病史。选取同期收治的30例慢性鼻-鼻窦炎不伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis without nasal polyps, CRSsNP)患者作为对照1组,均满足慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南中的CRSsNP诊断标准^[5],经内镜检查无鼻息肉,入组4周内未使用抗组胺药、肾上腺皮质激素及免疫调节药物;30例单纯鼻中隔偏曲患者作为对照2组,纳入患者均无哮喘、变应性鼻炎、支气管扩张、阿司匹林特异反应性、慢性阻塞性肺疾病及自身免疫性疾病,入组4周内无急性呼吸道感染及类固醇药物使用史,均行鼻中隔偏曲矫正术,术中留取下鼻甲黏膜。所有纳

[收稿日期] 2017-06-12 [接受日期] 2017-09-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81460094),新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C076)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81460094) and Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2015211C076)。

[作者简介] 哈再古丽·贾汉,主治医师。E-mail: drlij123@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 0991-4362930, E-mail: yongjun589@163.com

入本研究者均排除严重心肝肾肺疾病、全身性疾病、严重精神疾病、急性上呼吸道感染、合并恶性肿瘤、真菌性鼻窦炎、系统性血管炎、凝血功能障碍。

1.2 标本及取材 研究组:鼻内镜下切除息肉组织,留取鼻息肉黏膜组织标本。对照 1、2 组:鼻内镜下切除下鼻甲组织,留取下鼻甲部分黏膜组织。术中留取组织立即切成小块(3~5 mm³)浸入非液氮型样本 RNA 保存液,-4 ℃ 低温保存,24 h 后去除非液氮型样本 RNA 保存液,-70 ℃ 冰箱保存备用。

1.3 试剂 兔抗人 Eotaxin-2 多克隆抗体(ant-127,北京博奥派克生物科技有限公司),兔抗人 IL-5 多克隆抗体(200-05-2 μg,上海酶研生物科技有限公司)。二步法抗兔/小鼠通用型免疫组织化学 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),IL-5 ELISA 试剂盒(深圳市晶美生物工程有限公司),IgE ELISA 试剂盒(上海岚派生物科技有限公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4 观察指标

1.4.1 Eotaxin-2 水平及 EOS 浸润情况的检测 采用免疫组织化学 H-E 染色测定 Eotaxin-2 水平。石蜡包埋组织连续切片,厚度 5 μm,切片脱蜡水化,PBS 冲洗 2~3 次,每次 5 min。滴加过氧化酶阻断液室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,弃 PBS。切片滴加 50 μL DAB 底物,室温孵育 10 min,弃上清。滴加一抗,4 ℃ 过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 3~5 min,弃 PBS;滴加 DAB 显色剂,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,弃 PBS。滴加 50 μL 链霉素抗生物素-过氧化酶溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,弃 PBS。滴加 100 μL DAB 溶液,镜下观察,自来水冲洗,苏木精复染,返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。于光学显微镜下观察 Eotaxin-2 阳性表达情况,阳性细胞呈棕黄色,自上皮、腺体周围各取 10 个高倍视野,采用 BI-2000 图像分析系统对染色结果进行分析,计算阳性细胞数目。H-E 染色检测 EOS 浸润情况,光学显微镜下观察 EOS,每张切片随机取 5 个高倍视野,计算 100 个炎性细胞内 EOS 的数目,取平均值表示其浸润程度,即每个高倍视野中 EOS 数目。

1.4.2 IL-5 测定 组织匀浆制备,取鼻黏膜组织剪成小块,1 g 加 1 mL 生理盐水,电动玻璃匀浆器研磨 15 min,高速冷冻离心机 4 ℃ 1 000~1 350×g 离心 10 min,取上清。采用双缩脲比色法测定组织匀浆总蛋白质,应用 UV-160A 紫外分光光度计进行测定,采用

ELISA 测定 IL-5 水平,具体测定方法参照 IL-5 ELISA 试剂盒说明书。组织匀浆 IL-5 水平(ng/g)=样本 IL-5 浓度(ng/L)/样本总蛋白浓度(g/L)。

1.4.3 血清总 IgE 测定 入院后采集 3 组外周静脉血各 3 mL,采用 ELISA 测定血清总 IgE 水平,具体测定方法参照 IgE ELISA 试剂盒说明书。

1.4.4 外周血 EOS 计数测定 采集静脉血 3 mL,采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 BC-5500 型全自动血细胞分析仪测定患者外周血 EOS 计数。

1.5 统计学处理 数据均录入 SPSS 19.0 软件进行分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。EOS 浸润程度、IgE、Eotaxin-2 及 IL-5 相关性分析采用 Pearson 相关性分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 3 组患者基本情况 研究组纳入 CRSwNP 患者 48 例,其中男 29 例,女 19 例;年龄 21~74 岁,平均(46.1±4.7)岁;病程 2~11 个月,平均(5.1±1.1)个月;鼻息肉分型:I 型 7 例、II 型 35 例、III 型 6 例。对照 1 组纳入 CRSsNP 患者 30 例,其中男 19 例,女 11 例;年龄 21~76 岁,平均(47.1±5.1)岁。对照 2 组纳入单纯鼻中隔偏曲患者 30 例,其中男 20 例,女 10 例;年龄 20~75 岁,平均(45.9±4.5)岁。

2.2 3 组患者 EOS 浸润情况的比较 研究组(图 1A)患者鼻息肉黏膜组织均可见明显组织水肿,细胞成分少,组织表面见假复层纤毛柱状上皮及鳞状上皮组织转化,上皮下息肉基质严重水肿;大量 EOS 浸润,聚集成团,H-E 染色后胞质呈棕褐色,主要分布于黏膜上皮及小血管周围,胞质红染,可见 2~3 个分叶核。对照 1 组(图 1B)患者鼻黏膜组织轻微水肿,上下层疏松结缔组织内见散在成纤维细胞和少量炎性细胞,多为浆细胞、中性粒细胞、淋巴细胞,见少量 EOS 浸润。对照 2 组(图 1C)患者鼻黏膜组织微血管见少量淋巴细胞,基本无 EOS 浸润。

2.3 3 组患者 EOS 计数及 IL-5、Eotaxin-2、IgE 水平的比较 研究组患者鼻黏膜组织 EOS 计数及外周血 EOS 计数、IgE 水平均高于对照 1、2 组,其鼻黏膜组织 IL-5 浓度高于对照 1、2 组,Eotaxin-2 阳性表达率也高于对照 1、2 组,差异均有统计学意义(*P* 均<0.05);对照 1 组鼻黏膜组织 EOS 计数、IL-5 水平及外周血 EOS 计数、IgE 水平高于对照 2 组,差异均有统计学意义

(P 均 <0.05),见表1。研究组(图2A)患者 Eotaxin-2 阳性细胞主要表达于腺体、血管内皮细胞、黏膜固有层浸润的炎性细胞中,阳性细胞数目多,呈棕黄色,颜色较深;对照1组(图2B)上皮组织中 Eotaxin-2 阳性细胞数少于研究组,间质可见弥散 Eotaxin-2 表达;对照2组(图2C)阳性染色浅,分布于浸润炎性细胞或黏膜上

皮。研究组(图2D)鼻黏膜组织见较多 IL-5 阳性染色细胞,为棕黄色或棕色,阳性细胞分布较密,呈丛集性分布,集中于血管、上皮、腺体周围,间质可见散在阳性细胞;对照1组(图2E)鼻黏膜组织 IL-5 阳性细胞较研究组略少,分布稀松;对照2组(图2F)阳性染色细胞少,散在分布于间质及上皮。

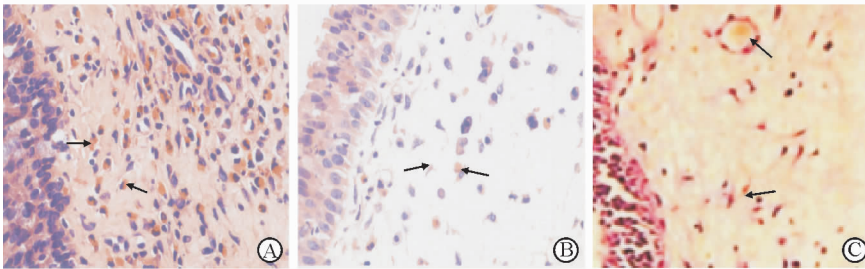


图1 3组患者鼻黏膜组织嗜酸粒细胞(EOS)浸润情况

A: 研究组; B: 对照1组; C: 对照2组. 箭头示 EOS 浸润,胞质呈棕褐色. H-E 染色. Original magnification: $\times 400$

表1 3组患者 EOS 计数及 IL-5、Eotaxin-2、IgE 水平的比较

组别	n	EOS 计数		IL-5 ω_B /(ng \cdot g $^{-1}$)	Eotaxin-2 阳性率(%)	IgE ω_B /(U \cdot L $^{-1}$), $\times 10^3$
		黏膜组织/HP	外周血(L $^{-1}$, $\times 10^9$)			
研究组	48	51.12 \pm 14.26 $^{*\Delta}$	0.22 \pm 0.12 $^{*\Delta}$	9.15 \pm 3.26 $^{*\Delta}$	81.11 \pm 1.11 $^{*\Delta}$	235.02 \pm 0.98 $^{*\Delta}$
对照1组	30	24.09 \pm 1.74 *	0.12 \pm 0.05 *	5.64 \pm 2.11 *	45.23 \pm 1.44 *	142.29 \pm 1.08 *
对照2组	30	5.09 \pm 1.74	0.07 \pm 0.01	3.64 \pm 2.11	10.23 \pm 1.44	42.29 \pm 1.04

EOS: 嗜酸粒细胞; IL-5: 白细胞介素5; HP: 高倍镜视野. $^*P<0.05$ 与对照2组对比; $\Delta P<0.05$ 与对照1组比较

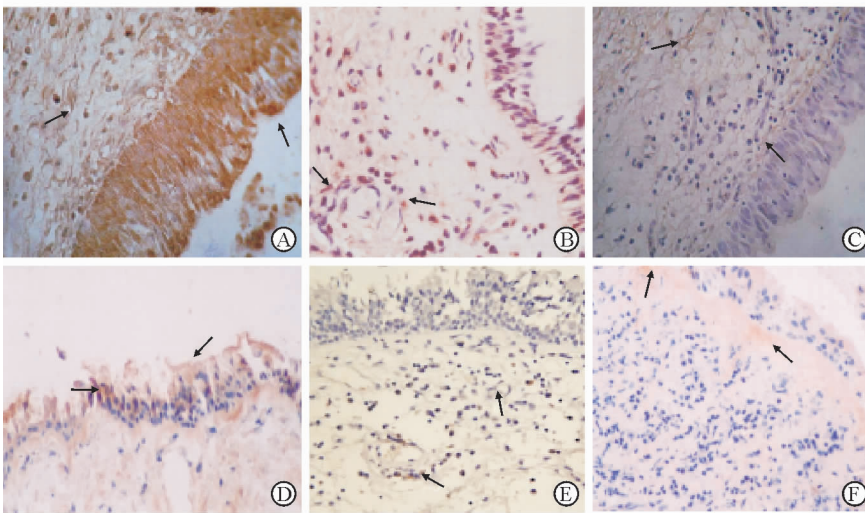


图2 3组患者鼻黏膜组织 Eotaxin-2(A~C)和 IL-5(D~F)的表达情况

A, D: 研究组; B, E: 对照1组; C, F: 对照2组. 箭头示 Eotaxin-2 阳性细胞(A~C)和 IL-5 阳性细胞(D~F). IL-5: 白细胞介素5. H-E 染色. Original magnification: $\times 400$

2.4 CRSwNP 患者鼻黏膜组织 EOS 浸润、IgE 水平和外周血 EOS 计数与 IL-5 的相关性 CRSwNP 患者鼻黏膜组织 EOS 浸润数目($r=0.844, P=0.000$)、外周血 EOS 计数($r=0.721, P=0.001$)、鼻黏膜组织 Eotaxin-2 阳性表达($r=0.668, P=$

0.002)、外周血 IgE 水平($r=0.432, P=0.012$)与鼻黏膜组织 IL-5 表达均呈正相关。

3 讨论

研究报道,约有 80%的 CRSwNP 患者病变组织伴

EOS 浸润,且呈水肿型改变,部分伴中性粒细胞浸润或黏液腺体增生^[6]。Fundová 等^[7]发现,EOS 颗粒富含毒性产物,包括趋化因子、白三烯、血管活性物质、嗜酸细胞阳离子蛋白等,可导致上皮溶解、纤毛停滞、气道低反应性。EOS 活化后嗜酸细胞阳离子蛋白表达上调,炎性浸润程度增加。本研究通过对 CRSwNP 患者鼻息肉黏膜组织 EOS 浸润及外周血 EOS 计数情况进行检测发现,CRSwNP 患者鼻黏膜组织 EOS 浸润程度和外周血 EOS 计数均高于鼻黏膜组织正常者及 CRSsNP 患者,表明 CRSwNP 患者鼻黏膜组织炎性浸润较为严重。

Eotaxin-2 为 EOS 的高选择性趋化因子,可特异性趋化 EOS,促进 EOS 浸润,加速气道炎症进展^[8]。本研究发现,CRSwNP 患者 Eotaxin-2 主要表达于鼻息肉血管内皮细胞、炎性细胞质内,而在腺上皮细胞质、黏膜上皮细胞质中表达相对较少,且其 Eotaxin-2 阳性率高于 CRSsNP 与鼻黏膜组织正常者。分析 Eotaxin-2 在 CRSwNP 患者鼻黏膜组织中高表达的原因,可能与鼻息肉黏膜组织炎性反应加重导致 EOS 趋化于炎性部位,促进 Eotaxin-2、IL-5 等炎性介质释放有关,导致腺体分泌增加,从而引起组织水肿、血管扩张,促进鼻息肉形成。

本研究发现,CRSwNP 患者鼻息肉黏膜组织 IL-5 含量高于 CRSsNP 患者与鼻黏膜组织正常者,分析可能原因为:IL-5 可特异性作用于 EOS,促进其活化、趋化,抑制其凋亡,同时促进毒性物质释放,延长 EOS 存活时间,加重上皮组织损伤,加速鼻息肉进展^[4]。IgE 是介导变态性反应的关键因子,当机体遭受外源性变应原刺激时,IgE 表达水平上升,从而激活 EOS、肥大细胞因子,加重炎性反应。此外,IgE 可介导迟发相反应,其变应原不仅可激活肥大细胞,同时可延迟激活中性粒细胞、单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞等,促进大量炎性介质、细胞因子释放,引起持续性炎性反应。本研究发现,CRSwNP 患者血清总 IgE 水平高于 CRSsNP 患者与鼻黏膜组织正常者,表明 IgE 介导的变态反应在鼻息肉发病过程中有重要作用,考虑 CRSwNP 患者发病过程中可能存在 IgE 介导的以 EOS 浸润为主的迟发相变态反应炎症。本研究发现,CRSwNP 患者鼻黏膜组织 EOS 细胞数、外周血 EOS 计数、Eotaxin-2 水平均与 IL-5 表达水平呈正相关,表明 CRSwNP 患者鼻息肉的形成及进展可能与 EOS 活化释放 IL-5 炎性介质、

IL-5 抑制 EOS 凋亡有关。

目前尚无研究对 IL-5 与 IgE 表达的关系进行报道,本研究发现,CRSwNP 患者血清 IgE 水平与 IL-5 表达呈正相关,提示 CRSwNP 患者鼻息肉的形成及进展可能与 IL-5 在调节 IgE 生成过程中具有一定作用有关。但本研究样本量小,且尚未对 CRSwNP 患者过敏原进行筛查,尚未分析受试者过敏状态,后续将扩充样本量、进行过敏原穿刺点筛查,以进一步明确慢性鼻-鼻窦炎患者鼻息肉形成的病理机制。

[参考文献]

- [1] 王明婕,周兵,李云川,黄谦. 外周血嗜酸粒细胞比例在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉分类中的作用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2013,48:650-653.
- [2] 郑岩,刘鹏飞,郭丽娟,王恩彤. 嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎白细胞介素 13 及其受体 $\alpha 2$ 的表达与意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,50:230-235.
- [3] BA L, ZHANG N, MENG J, ZHANG J, LIN P, ZHOU P, et al. The association between bacterial colonization and inflammatory pattern in Chinese chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps[J]. Allergy, 2011, 66: 1296-1303.
- [4] 刘新彦,霍占江,牛敬莲,王晖,刘晓燕,张廷录. 曲安奈德鼻喷雾剂对鼻息肉组织中嗜酸性粒细胞及其趋化因子-2 表达的影响[J]. 实用药物与临床,2013,16: 366-368.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南(2008 年,南昌)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,44:6-7.
- [6] 钱进,李雪盛,李厚恩,刘亮,孙建军. 上颌窦后鼻孔息肉中嗜酸性粒细胞浸润与白细胞介素 5 表达[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2011,18:315-317.
- [7] FUNDOVÁ P, FUNDA D P, KOVÁ Ř D, HOLÝ R, NAVARA M, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H. Increased expression of chemokine receptors CCR1 and CCR3 in nasal polyps: molecular basis for recruitment of the granulocyte infiltrate [J]. Folia Microbiol (Praha), 2013, 58: 219-224.
- [8] 李颖,王向东,王鸿,伯铭羽,宋贝贝,范尔钟,等. CC 类趋化因子在慢性鼻窦炎的表达[J]. 首都医科大学学报,2013,34:795-798.