

- [25] 温玉明,陈润良,王昌美. 腮腺多形性腺瘤腺体切除范围的病理依据[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 10(5): 359-360.
- [26] BRON L P, OBRIEN C J. Facial nerve function after parotidectomy [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1997, 123:1091-1096.
- [27] 张军生,刘延考,夏春鹏. 腮腺手术与面神经功能损伤及术后修复的关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(17):3234-3238.
- [28] SHEHATA E A. Extra-capsular dissection for benign parotid tumours [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010, 39:140-144.
- [29] KOCH M, ZENK J, IRO H. Long-term results of morbidity after parotid gland surgery in benign disease [J]. Laryngoscope, 2010, 120:724-730.
- [30] 刘华,李龙江,温玉明,等. 涎腺肿瘤 3461 例临床病例分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 20(4):475-477.
- [31] ALBERGOTTI W G, NGUYEN S A, ZENK J, et al. Extracapsular dissection for benign parotid tumors: a meta-analysis[J]. Laryngoscope, 2012, 122:1954-1960.
- [32] PIEKARSKI J, NEJC D, SZYMCZAK W, et al. Results of extracapsular dissection of pleomorphic adenoma of parotid gland [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62:1198-1202.
- [33] DALLERA P, MARCHETTI C, CAMPOBASSI A. Local capsular dissection of parotid pleomorphic adenomas[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 1993, 22: 154-157.

(收稿日期:2017-01-04)

## 应用功能分类基因芯片检测变应性鼻炎差异性表达基因\*

彭杨<sup>1</sup> 李献清<sup>2</sup> 邱前辉<sup>2</sup>

[摘要] 目的:应用功能分类基因芯片技术研究变应性鼻炎差异表达基因。方法:分别提取、检测 8 例变应性鼻炎及 8 例正常对照的下鼻甲黏膜组织的总 RNA,合成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 芯片扫描,检测出两组间的差异表达基因。结果:通过对 84 个与过敏及哮喘发病相关基因的分析,发现 67 个基因表达下调,17 个基因表达上调,差异具有统计学意义的差异性表达基因为 2 个(STAT6、BCL6)。结论:用功能分类基因芯片可检测变应性鼻炎中异常表达的基因。

[关键词] 鼻炎,变应性;功能分类基因芯片

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.11.012

[中图分类号] R765.21 [文献标志码] A

### Detection of differentially expressed gene of allergic rhinitis based on RT<sup>2</sup> profiler PCR array

PEN Yang<sup>1</sup> LI Xianqing<sup>2</sup> QIU Qianhui<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China; <sup>2</sup>Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Guangdong General Hospital and Guangdong Academy of Medical Sciences)

Corresponding author: QIU Qianhui, E-mail: qiuqianhui@hotmail.com

**Abstract Objective:** The aim of this study is to detect differentially expressed gene of allergic rhinitis (AR) based on RT<sup>2</sup> profiler PCR array. **Method:** The real-time PCR array containing 84 genes were used to compare inferior turbinate samples obtained from AR patients ( $n=8$ ) and healthy individuals ( $n=8$ ). **Result:** The results showed that 67 genes were down regulated and 17 genes were up regulated in AR inferior turbinate after analysis of 84 genes related to allergy and asthma. STAT 6 and BCL6 were recognized as differentially expressed genes. **Conclusion:** The real-time PCR array can provide new insight into the pathophysiological processes involved in AR.

**Key words** rhinitis, allergic; real-time PCR array

\* 基金项目:广东省自然科学基金项目(No: S2013010016130);广州市科技计划项目:产学研协同创新重大专项(No:201604020187)

<sup>1</sup>南方医科大学研究生院(广州,510515)

<sup>2</sup>广东省人民医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:邱前辉, E-mail: qiuqianhui@hotmail.com

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是一种由于特异性个体接触致敏原后由 IgE 介导的鼻黏膜慢性炎症反应性疾病,其临床症状表现为喷嚏、清水样涕、鼻塞和鼻痒等,在我国大陆地区患病率为 4%~38%<sup>[1-2]</sup>。随着高密度表达谱芯片等技术的

快速发展,越来越多的证据提示<sup>[3]</sup>,AR的发病与多基因异常表达及多条生物学通路调控有关。然而高密度表达谱芯片往往筛选出大量差异表达基因,而其中与研究对象无关的基因会干扰结果分析。近年来,功能分类基因芯片的发展将微阵列技术与特定生物学通路结合,剔除表达谱芯片上大量与研究对象无明显相关的信息,重点检测已被证实与特定疾病高度相关的基因,更加有效便利且具有针对性。该方法已成为研究疾病发病机制的一种新的趋势<sup>[4]</sup>。

本研究采用功能分类基因芯片中的过敏和哮喘相关的实时荧光定量 PCR 芯片 (Allergy & Asthma Real-time PCR Array), 针对 TH2 细胞因子、转录因子及 NK 细胞等相关基因进行检测,通过比较 AR 组及对照组的下鼻甲样本,找出 AR 组中差异性表达的关键基因,为深入客观揭示 AR 的发病机制提供证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

正常对照组:8例下鼻甲黏膜组织均来自我院住院的鼻中隔偏曲患者,男3例,女5例,年龄(33.13±13.29)岁。下鼻甲样本的采集在获得了医院伦理委员会伦理讨论以及患者知情同意后执行。所有患者根据 AR(2015,天津)诊断标准<sup>[5]</sup>和支气管哮喘防治指南<sup>[6]</sup>为参考纳入分组,结合病史及临床症状,通过肺功能检测仪(Sensors Medics, Vmax 622)进行肺功能、支气管激发及舒张试验检查,并且根据德国 Medwiss 公司生产的敏筛过敏原检测系统进行静脉血过敏原筛查。鼻窦 CT 检查未见鼻窦炎症改变;无 AR 家族史,无食物及药物过敏史,无特异性皮炎史;所有标本收集前,患者均未用抗炎药、抗组胺及皮质类固醇激素等至少 1 周。

AR 组:按照 AR(2015,天津)诊断标准<sup>[5]</sup>纳入,8例下鼻甲黏膜组织均来自广东省人民医院住院患者,男6例,女2例,年龄(34.63±11.61)岁。参考支气管哮喘防治指南的诊断标准<sup>[6]</sup>,所有患者均不合并哮喘。其中7例标本来自鼻中隔偏曲合并 AR 患者,1例标本来自鼻窦囊肿合并 AR 患者。除1例鼻窦囊肿患者 CT 检查见左侧上颌窦囊肿外,其余患者 CT 检查未见明显鼻窦炎症改变;3例有 AR 家族史,5例无 AR 家族史;均无食物及药物过敏史,无特异性皮炎史。所有标本收集前,患者均未用抗炎药、抗组胺及皮质类固醇激素等至少 1 周。

### 1.2 总 RNA 抽提及 cDNA 合成

取正常对照组及 AR 组鼻腔黏膜组织标本,用 TRIZOL (Invitrogen) 试剂进行总 RNA 抽提, RNeasy<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup> 纯化试剂盒 (Qiagen) 纯化

mRNA 后,采用紫外线分光光度计测定其含量及纯度,并且用琼脂糖凝胶电泳法对纯化的 mRNA 进行鉴定。取适量经纯化后且质量检测合格的 mRNA 样品进行逆转录,通过 SuperScript. III Reverse Transcriptase (Invitrogen)、RNase Inhibitor (Epicentre) 等试剂合成 cDNA。

### 1.3 芯片扫描

取适量合成的 cDNA 样品,通过 2×SuperArray PCR master mix 试剂 (Cat. No. PA-112) 和 Human Allergy & Asthma PCR Array (购于上海杏园生物科技有限公司) 进行 qPCR 法芯片扫描。该 96 孔模式的芯片中 84 个单孔同时检测 JAK-STAT、NF-κB 等通路作用高度相关的基因。此外,5 个单孔的看家基因 (ACTB、B2M、GAPDH、HPRT1、RPLP03), 用于芯片数据的标准化。1 个单孔为基因组 DNA 参照 (GDC), 检测样品中是否存在 DNA 污染。3 个重复的孔为反转录参照 (RTC), 检测 RT 反应的效率。另外 3 个重复的孔为阳性 PCR 参照 (PPC), 反映了 PCR 反应的效率。这些孔中加入了人工合成的 DNA 序列和相应的引物对进行反应。

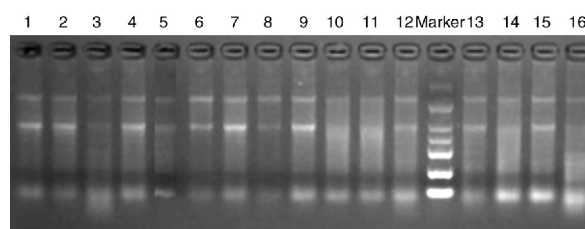
### 1.4 数据分析

参照 Hansel 等<sup>[4]</sup>方法,先对每张芯片的数据进行归一化,即通过各样本的平均 CT 值分别得到 AR 组及正常对照组的平均 CT 值,并以 5 个看家基因 (ACTB、B2M、GAPDH、HPRT1、RPLP03) 的平均 CT 值作为内参照,通过计算  $2^{-(\text{average}\Delta\Delta\text{CT})}$  的方法,运用 SPSS20.0 软件进行非配对 *t* 检验分析,得出 AR 组与正常对照组 mRNA 表达水平的比值。比值 > 2 者为高表达基因 (上调), 比值 < 0.5 者为低表达基因 (下调), 根据  $P < 0.05$  进一步筛选出具有统计学意义的差异性表达基因。

## 2 结果

### 2.1 RNA 的质控

提取总 RNA 的理想 OD 值 A260/A280 比值为 1.8~2.0; 进行 1% 琼脂糖电泳分析所提取 RNA, 可见电泳条带清晰, 其对应于 18S 和 28S 的 2 条条带亮度之比约为 2:1 (图 1)。结果显示所有样本均合格。



1~8:正常对照组;9~16:AR组。

图 1 RNA 琼脂糖电泳图

## 2.2 基因相对表达量的散点图

基因相对表达量的散点图见图 2。X 轴为对照组基因的相对表达量, Y 轴为 AR 组基因的相对表达量。中央黑色斜线表示两组间相对表达量的比率为 1, 2 条红色斜线表示 2 组间相对表达量的比率分别为 1/2 和 2, 全部或部分在两条红色斜线外的点表示 2 组间相对表达量的比率相差 2 倍以上。

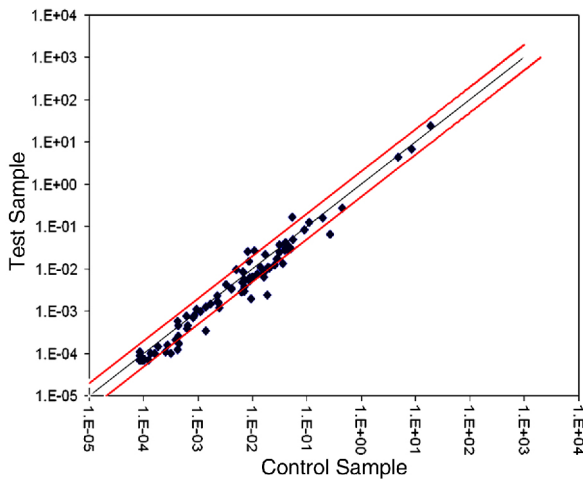


图 2 对照组与 AR 组 84 个基因相对表达量

## 2.3 差异性表达基因

通过对 84 个与过敏及哮喘发病相关基因的分析, 发现 67 个基因表达下调, 17 个基因表达上调。其中 18 个基因的相对表达量相差 2 倍以上, 具有统计学意义的差异性表达基因为 2 个(表 1): STAT6 和 BCL6(B-cell lymphoma 6)。

表 1 AR 组对比正常对照组差异性表达下调基因染色体定位及下调倍数

基因	染色体定位	P 值	下调倍数
STAT6	12q13.3	0.049034	3.98
BCL6	3q27.3	0.024519	4.77

## 3 讨论

在本文中, 我们采用功能分类基因芯片, 针对与过敏和哮喘高度相关通路的 84 个基因的表达进行了检测, 其中大部分是与 Th2 细胞、肥大细胞、嗜酸粒细胞、转录因子等作用直接相关的。以往有多篇文献报道通过全基因表达谱芯片筛选出 AR 相关的差异表达基因, 如章如新等<sup>[7]</sup>通过表达谱芯片检测了 8 例 AR 和非 AR 的鼻黏膜, 发现 734 条差异表达基因, 其中包括炎症反应、免疫应答、免疫调控、神经内分泌网络系统及信号传导等相关基因。刘冰等<sup>[8]</sup>通过 6 例 AR 和非 AR 的鼻黏膜也

筛选出 161 条差异表达基因, 为 AR 机制的研究提供了线索。回顾国外相关研究, Wagener 等<sup>[9]</sup>发现了 AR 中 40 条差异表达的基因, 虽然全基因组的表达谱芯片有利于我们更全面地认识疾病, 然而并不利于研究人员更针对性地分析结果。我们应用的功能分类基因芯片可以为 AR 的发病机制研究提供新的视角, 将相互联系紧密的基因同时进行检测, 筛选出的差异性表达基因可能是与 AR 发病相关性最显著的。根据我们芯片的结果并回顾相关文献, 分析这些基因的功能并且对相关通路进行研究, 有助于推测它们在 AR 发病过程中的作用, 提高人们对 AR 发病机制的认识。

JAK-STAT 信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程<sup>[10]</sup>。我们筛选出的 STAT6 通过 JAK-STAT 信号转导途径介导细胞因子 IL-4、IL-13 诱导的基因表达, 是参与 IL-4 和 IL-13 介导 TH2 型细胞因子反应的一种关键的转录因子, 在变应原、细胞因子的刺激下, STAT6 持续活化、过度表达, 引起 TH 前体向 TH2 分化, 导致 TH1/TH2 比例失衡, 被认为是变应性疾病中最重要的基因之一<sup>[11]</sup>。在我们的功能分类芯片结果中, STAT6 的 P 值为 0.049034, 尽管具有统计学差异然而非常接近 0.05, 可能是由于样本量不足而出现的假阳性结果, 提示我们以后需要更多样本来进一步验证芯片的可靠性。回顾相关文献, 目前已有较多的研究报道 STAT6 与 AR 密切相关。2013 年一项 Meta 分析<sup>[12]</sup>显示, 在 5 789 个存在过敏性疾病的个体和 10 056 个对照中进行了第 1 次大规模全基因组关联研究(GWAS), 发现与过敏相关最显著的单核苷酸多态性(SNPs) 包括在 TLR6, C11orf30, STAT6, SLC25A46, HLA-DQB1, IL1RL1, LPP, MYC, IL2 和 HLA-B 或其附近的位点。张慧等<sup>[13]</sup>研究 IL-4/STAT6 在 AR 豚鼠鼻黏膜的表达及鼻用糖皮质激素对其表达的影响时发现, 较正常对照组, AR 组鼻黏膜 STAT6 表达增加, 并且在鼻用糖皮质激素治疗后其表达水平下降。赵丹<sup>[10]</sup>研究发现 STAT6 G2964A 位点与山东地区的 AR 具有某些关联, 对其关联程度的进一步探索有利于从遗传学角度更加全面地了解 AR 的发病机制。

BCL6 位于 3 号染色体上, 编码系列特异性转录因子受体, 其功能包括阻止细胞分化及凋亡, 促进细胞增殖等<sup>[14]</sup>。BCL6 与 STAT6 密切相关, 不仅在淋巴瘤中有相关报道<sup>[15]</sup>, Audzevich 等<sup>[16]</sup>发现两者的相互作用与 IgE 的产生有关并受其他分子的调控。Nurieva 等<sup>[17]</sup>报道 BCL6 介导 T 滤泡辅助(TFH)细胞的发展, 而 TFH 细胞也已被报道与多种免疫性疾病及慢性鼻-鼻窦炎相关<sup>[18-19]</sup>, 而

与 AR 的相关性报道尚不多<sup>[20]</sup>, 是未来亟需探索的领域。程超群等<sup>[14]</sup>对 AR 患者鼻黏膜的 BCL6 进行免疫荧光标记检测发现其在 AR 患者组蛋白表达水平下调, 可能是由于 BCL6 过度减少, 对免疫系统的抑制作用减弱, 导致细胞免疫功能紊乱, 使得淋巴细胞的增殖分化失衡, 进而导致细胞失衡, Th2 细胞反应过度引起 AR 的发病。

本研究采用功能分类基因芯片对 AR 可能的致病基因进一步检测, 对比全基因芯片技术虽然可以大大降低海量生物学信息给研究带来的困难, 缩短发现疾病特异性标志物的时间, 但同样也可能因此遗漏了 AR 发病机制中重要的生物学信息。而利用基因芯片检测基因表达只是基于 mRNA 转录水平的研究, 要更深入地了解疾病的发生发展机制, 仍需对蛋白水平的表达差异等进一步分析。

#### 参考文献

- [1] SEIDMAN M D, GURGEL R K, LIN S Y, et al. Clinical practice guideline: Allergic rhinitis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152(1 Suppl): S1-43.
- [2] ZHANG Y, ZHANG L. Prevalence of allergic rhinitis in china[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2014, 6: 105-113.
- [3] WAGENER A H, ZWINDERMAN A H, LUITEN S, et al. The impact of allergic rhinitis and asthma on human nasal and bronchial epithelial gene expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e80257.
- [4] HANSEL N N, CHEADLE C, DIETTE G B, et al. Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms[J]. *Allergy*, 2008, 63: 366-369.
- [5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组, 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 变应性鼻炎诊断和治疗指南(2015年, 天津)[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51(1): 6-24.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2008, 2(1): 3-13.
- [7] 章如新, 余少卿, 应康, 等. 变应性鼻炎基因芯片检测及其基因表达谱的研究[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2002, 37(3): 165-168.
- [8] 刘冰, 吴建, 赵舒薇, 等. 人类变应性鼻炎基因表达谱的研究[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2008, 15(3): 149-152.
- [9] WAGENER A H, ZWINDERMAN A H, LUITEN S, et al. The impact of allergic rhinitis and asthma on human nasal and bronchial epithelial gene expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e80257.
- [10] 赵丹. STAT6 基因 2964G/A 位点多态性与山东地区变应性鼻炎的关联性研究[D]. 山东大学, 2012.
- [11] VALE K. Targeting the JAK-STAT pathway in the treatment of 'Th2-high' severe asthma[J]. *Future Med Chem*, 2016, 8: 405-419.
- [12] BONNELYKKE K, MATHESON M C, PERS T H, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization[J]. *Nat Genet*, 2013, 45: 902-906.
- [13] 张慧, 耿曼英, 闫保星, 等. IL-4/STAT6 在变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜的表达及鼻用糖皮质激素对其表达的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26(8): 364-367.
- [14] 程超群, 刘涛. 变应性鼻炎中调节性 T 细胞和 Bcl-6 的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(27): 447-448.
- [15] HABERLE M T, KELSCH E, DORSCH K, et al. Knock-down of BCL6 / STAT6 sensitizes primary B cell lymphoma cells for treatment with current therapeutic agents[J]. *Oncoscience*, 2014, 1: 283-286.
- [16] AUDZEVICH T, PEARCE G, BREUCHA M, et al. Control of the STAT6-BCL6 antagonism by SWAP-70 determines IgE production[J]. *J Immunol*, 2013, 190: 4946-4955.
- [17] NURIEVA R I, CHUNG Y, MARTINEZ G J, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells[J]. *Science*, 2009, 325: 1001-1005.
- [18] EIVAZI S, BAGHERI S, HASHEMZADEH M S, et al. Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1668-1678.
- [19] ZHANG Y N, SONG J, WANG H, et al. Nasal IL-4 (+) CXCR5 (+) CD4 (+) T follicular helper cell counts correlate with local IgE production in eosinophilic nasal polyps[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137: 462-473.
- [20] WANG X Q, KE X, SHEN Y, et al. Changes in circulating follicular helper T-cells in Chinese patients with allergic rhinitis[J]. *Acta Otolaryngol*, 2016, 136: 199-204.

(收稿日期: 2017-01-18)