

• 论著——临床研究 •

变应性鼻炎中自噬相关基因 LC3 与 ECP
的表达及意义^{*}余杰情¹ 罗庆¹ 熊园平¹ 康雪¹ 罗丽萍¹ 张剑¹ 黄小燕¹ 叶菁¹

[摘要] 目的:探讨自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)在变应性鼻炎(AR)患者鼻黏膜中的表达及其与嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)的关系。方法:选取 20 例 AR 患者下鼻甲黏膜(AR 组)和 20 例正常鼻腔黏膜(对照组),苏木精-伊红染色观察各组鼻黏膜的中嗜酸粒细胞的分布与表达,采用免疫组织化学方法、蛋白免疫印迹法检测各组鼻黏膜中 LC3 和 ECP 的表达情况。结果:苏木精-伊红染色法显示在 AR 组患者鼻黏膜中可观察到大量嗜酸粒细胞及淋巴细胞浸润。免疫组织化学结果显示 LC3 与 ECP 主要分布于 AR 鼻黏膜上皮内,较对照组明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。蛋白免疫印迹法示 LC3 和 ECP 在 AR 组中的表达较对照组显著上升($P<0.05$),AR 组中 LC3 与 ECP 的表达呈正相关($P<0.05$)。结论:LC3 和 ECP 在 AR 患者中表达升高且具有相关性,提示自噬在 AR 的毒性作用中起了重要作用,可为 AR 的精准化治疗提供理论依据。

[关键词] 鼻炎,变应性;微管相关蛋白 1 轻链 3;嗜酸粒细胞阳离子蛋白

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.04.009

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Expression of LC3 and ECP in allergic rhinitis and their significance

YU Jieqing LUO Qing XIONG Yuanping KANG Xue LUO Liping
ZHANG Jian HUANG Xiaoyan YE Jing

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, 330006, China)

Corresponding author: YE Jing, E-mail: 1292446109@qq.com

Abstract Objective: To investigate the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3) and eosinophil cationic protein in allergic rhinitis(AR) for further understanding of the pathogenesis of AR. **Method:** Twenty cases of normal nasal mucosa and 20 cases of AR nasal mucosa were collected. Histological changes of nasal mucosa were examined by hematoxylin and eosin(HE) staining. The expression of LC3 and ECP were measured by immunohistochemistry(IHC) and Western Blot(WB). **Result:** The tissue samples demonstrated a large number of eosinophils and lymphocytes infiltration in AR. IHC revealed that LC3 and ECP expression were higher in AR than in normal nasal mucosa($P<0.05$). WB also showed that the relative expression levels of protein expression of LC3 and ECP were greater in AR than in controls. The expression level of LC3 was positively correlated with that of ECP protein in AR. **Conclusion:** LC3 and ECP were upregulated and positively correlated in AR, indicating that autophagy plays an important role in the toxicity of allergic rhinitis, which provides theoretical basis for the precise treatment of AR.

Key words rhinitis, allergic; microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; eosinophil cationic protein

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是 IgE 介导的鼻黏膜慢性非感染性炎症性疾病,主要表现为鼻痒、喷嚏、清涕、鼻塞,长期迁延可累及全身器官,严重影响患者的生活质量。嗜酸粒细胞(eosinophil, EOS)在鼻黏膜上皮和黏膜下浸润、聚集、活化,是 AR 一个重要特征^[1]。EOS 阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP)作为 EOS 活性和转归

标志,是活化的 EOS 释放的毒性蛋白。自噬是真核生物普遍存在的自稳机制,在胚胎发育、细胞自我保护和生存等过程中发挥着关键作用^[2]。微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3)作为参与自噬发生的关键基因,其表达与自噬活性关系密切,是监测自噬的特异性标志物。有研究表明自噬与支气管哮喘密切相关^[3],但是在 AR 中 LC3 的表达情况及其与 ECP 的关系笔者尚未见相关报道,本文探讨 LC3 在 AR 中的作用以及其与 ECP 的关系。

^{*}基金项目:江西省科技厅青年科学基金资助项目(No: 20171BAB215035);江西省教育厅青年项目(No: GJJ170130);江西省卫计委课题(No:20195123)

¹南昌大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(南昌,330006)
通信作者:叶菁, E-mail:1292446109@qq.com

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2017-04—2018-04 期间在我科行鼻内镜手术患者的鼻黏膜进行实验。参照 2015 年天津 AR 诊断和治疗指南,患者有鼻塞、鼻痒、打喷嚏、流涕症状,皮肤点刺试验阳性,诊断为 AR,反复药物治疗效果不佳,行翼管神经切断术取下鼻甲黏膜,以及术后病理报告结果选择合适病例。分别取 20 例 AR 患者的下鼻甲黏膜作为实验组,收集 20 例对照组患者鼻黏膜,如垂体瘤、上颌窦囊肿、鼻骨骨折、咽鼓管功能障碍患者的鼻黏膜。所有患者年龄 >18 岁,无全身系统疾病、恶性肿瘤病史,无支气管哮喘等呼吸道疾病,无抽烟史、鼻腔鼻窦良恶性肿瘤、真菌性鼻窦炎及手术史,术前 1 个月无全身或局部用药病史。

实验组 20 例,其中男 13 例,女 7 例;年龄 21~55 岁,平均 (35.23 ± 3.54) 岁;对照组 20 例,其中男 12 例,女 8 例;年龄 19~52 岁,平均 (41.2 ± 4.75) 岁;对照组与实验组患者的一般资料有可比性(年龄和性别比较差异无统计学意义)。本课题设计实施前已通过南昌大学第一附属医院伦理委员会的批准,并且所有入组的患者已知晓并签署项目知情同意书。

1.2 方法

术中剪取下鼻甲部分黏膜,鼻黏膜取下后,用滤纸立即迅速将表面血液吸掉,然后用组织剪将标本分成 2 份,其中一份放于装有 10%多聚甲醛的冻存管,浸泡,4℃过夜,然后倒掉甲醛放于 -80°C 冰箱永久保存,用于后期的苏木精-伊红染色以及免疫组织化学检测;另一份组织放入空的冻存管中,然后放入液氮罐,最后转移到 -80°C 冰箱长期保存,用于蛋白质免疫印迹检测。

1.2.1 苏木精-伊红染色 所有标本经 10%多聚甲醛固定,常规组织脱水,进行石蜡包埋,然后切片,最后行苏木精-伊红染色,苏木精染细胞核,伊红染细胞质,脱水封片,在光学显微镜下,观察鼻黏膜上皮及黏膜下炎症细胞的分布,图像采集分析。

1.2.2 免疫组织化学技术 室温下石蜡切片,自然风干 4 h,采取二步法,常规进行切片脱蜡,水洗,用配置的 PBS 液洗涤 3 次,然后把切片放在装满柠檬酸修复液的修复框中,再将切片转移至微波炉中,中低火 8 min,进行抗原修复,切片放在室温冷却,再将切片放置于摇床上,在装有 PBS(pH 7.4)的洗涤液中漂洗 3 次,每次 5 min;室温下切片放置于 3%的 H_2O_2 溶液中,用锡箔纸包好,遮光孵育 25 min,再次将玻片放于 pH 为 7.4 的 PBS 液中洗涤 3 次,每次 5 min。将 3%BSA 滴加在组化圈内组织上,均匀滴好,常温下封闭 30 min。滴加一抗(ECP 工作浓度为 1 : 8 000,美国 Abcam,

ab207429;LC3 工作浓度为 1 : 500,武汉三鹰,14600-1-AP),每片滴加 30 μl 抗体,并置于 4℃冰箱过夜。然后加二抗:玻片放于 PBS 液中在摇床上晃动洗涤,每次 5 min,共 3 次。将切片甩干,在组织圈内滴加二抗(HRP 标记),并将组织覆盖,室温孵育 50 min。采用 DAB 显色 2~20 min,严格控制显色时间,采用双蒸水终止反应,再用苏木精复染,并采用盐酸乙醇进行分化,切片使用梯度乙醇进行脱水,最后用中性树胶封片,采用光学显微镜下观察切片,采集并分析图像。

结果评判准则:在光学显微镜下观察 ECP 和 LC3 的分布及阳性表达(主要为棕黄色、棕褐色),邀请 2 名主治以上本院病理科医生采用双盲独立观察法进行图像分析。在 200 倍的高倍视野下,每张切片随机选取并观察 5~10 个视野,最后使用 Image Pro Plus 6.0 软件对图像进行阳性率分析,即测定阳性染色面积占整张图片面积的百分率。

1.2.3 对照组与实验组鼻黏膜中 LC3、ECP 蛋白表达的检测 采用蛋白质免疫印迹法,收集对照组及实验组鼻黏膜,常规方法提取鼻黏膜组织中的总蛋白,采用 BCA 法测蛋白浓度,SDS-PAGE 试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司)制备 10%的分离胶,5%的浓缩胶,上样量后进行电泳,电压 120 V,电泳 1 h;然后切胶转膜,转移至 PVDF 膜,300 mA 恒流转膜 0.5 h;5%的脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,分别加入一抗,兔抗人 LC3(1 : 1 000,武汉三鹰,14600-1-AP)、ECP(1 : 1 000,美国 Abcam,ab207429)和 ACTIN(1 : 3 000,武汉赛维尔,GB12001),4℃条件下摇床孵育过夜,次日室温下经 TBST 洗涤 3 次后,加入相对应的二抗(1 : 3 000)室温孵育 1 h,再用 TBST 摇床洗涤 3 次。每张膜上加入 1 ml 超敏 ECL 化学发光试剂,分别用移液枪移取 BeyoECL PlusA 液 0.5 ml, BeyoECL PlusB 液 0.5 ml 放置于 5 ml 的 EP 管后混匀,进行化学发光,此过程需避光,发光液充分接触 PVDF 膜,蛋白面朝上,2 min 后去除发光残液,放入暗匣中曝光。最后采用显影试剂进行显影,定影试剂进行定影。根据不同的光强度调整曝光条件。将胶片进行扫描存档,采用 PhotoShop 软件整理去色,运用美国 Media Cybernetics Company 设计的图像分析软件 Gel Pro Analyzer 4.0 对蛋白质条带进行灰度值扫描,可以直接得到各条带的灰度值。以 ACTIN 蛋白为内参照对以上目的蛋白进行灰度值分析,目的蛋白相对表达量=目的蛋白 A 值/内参照 A 值。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组观察指标的比较采用单因素方差分析,LC3 和 ECP 的相关性

采用 Pearson 进行相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果

实验组患者的鼻腔黏膜上皮层增厚,组织中有大量的 EOS 和淋巴细胞等炎性细胞浸润。对照组鼻黏膜组织未见明显炎性细胞浸润(图 1)。

2.2 免疫组织化学检测结果

2.2.1 ECP 蛋白表达 在光学显微镜下观察,发现 ECP 在实验组的鼻黏膜上皮染色多,主要是细胞质内有大量棕黄色或者棕褐色颗粒;对照组呈淡黄色或无色。对照组、实验组 ECP 的阳性面积分别为 8.42 ± 1.58 、 28.37 ± 16.19 ,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.2.2 LC3 蛋白表达 光学显微镜下观察,LC3 在实验组的鼻黏膜上皮或腺体中染色多,主要位于细胞质内,细胞骨架中也有表达,呈棕黄色或者棕褐色颗粒;对照组为淡黄色或无色。对照组、实验组 LC3 的阳性面积分别为 6.56 ± 2.21 、 25.47 ± 4.86 ,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

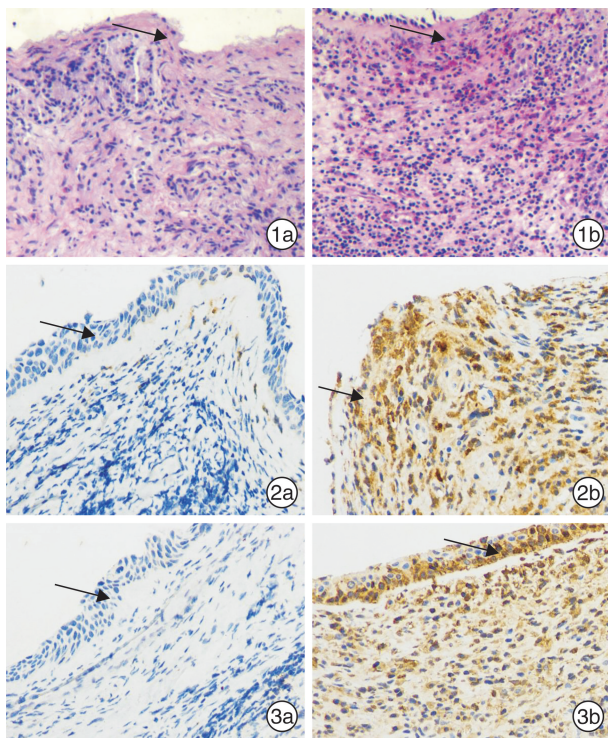


图 1 黏膜苏木精-伊红染色($\times 200$) 1a:对照组,示假复层纤毛柱状上皮;1b:实验组,黏膜增厚,大量 EOS 和淋巴细胞浸润; 图 2 黏膜 ECP 染色($\times 200$) 2a:对照组,细胞轻微着色;2b:实验组,黏膜上皮层(箭头)及黏膜下层细胞的细胞质大量着色; 图 3 黏膜 LC3 染色($\times 200$) 3a:对照组,上皮轻微着色;3b:实验组,黏膜上皮层细胞(箭头)及黏膜下细胞的胞质大量着色。

2.3 免疫印迹法结果

ECP 蛋白在实验组的表达为 1.53 ± 0.33 ,对照组为 0.06 ± 0.02 ,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。LC3 蛋白在实验组中表达为 1.22 ± 0.24 ,对照组为 0.14 ± 0.06 ,2 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

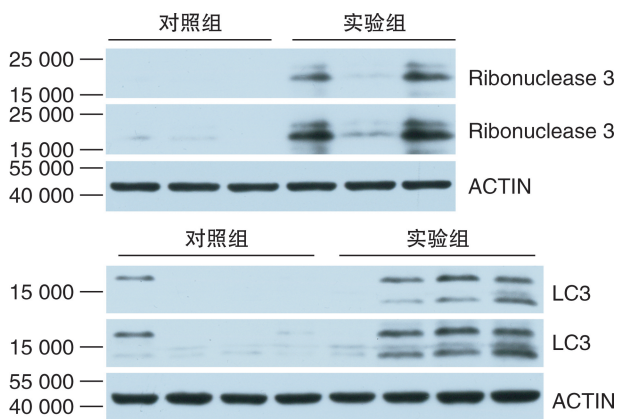


图 4 蛋白质免疫印迹法检测鼻黏膜组织中 ECP (Ribonuclease3)、LC3 及 ACTIN 的表达

2.4 实验组中 LC3 和 ECP 蛋白表达的相关性分析

实验组中 LC3 和 ECP 蛋白的表达呈正相关($r = 0.612$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过苏木精-伊红染色观察到 AR 鼻黏膜中上皮层稍增厚,大量 EOS 及淋巴细胞浸润,然而对照组鼻黏膜中无明显改变,本实验进一步验证了 EOS 在鼻黏膜上皮和黏膜下浸润、聚集、活化。越来越多的研究表明 EOS 是慢性炎症尤其是变应性炎症发生和维持的重要细胞类型^[4]。活化的 EOS 主要通过脱颗粒来发挥生物学功能,这些颗粒主要包括 ECP、Ribonuclease 3、主要碱性蛋白、EOS 过氧化酶和 EOS 神经毒素等。目前大部分研究采用血清、鼻腔分泌物或者鼻腔灌洗液来检测 ECP 的表达,本实验采用鼻黏膜组织来观察 ECP 的表达。

朱歆杰等(2018)研究发现尘螨致敏的儿童持续性 AR 鼻塞症状严重程度与患儿发病时间的长短及血清 ECP 水平呈正相关。Kampe 等^[5]研究发现,AR 及变应性哮喘患者经变应原激发后有着相似的 EOS 脱颗粒模式。由于免疫组织化学技术的局限性,本研究同时采用免疫组织化学技术和免疫印迹法检测,发现 ECP 在 AR 患者鼻黏膜组织中的表达较对照组增高,差异有统计学意义,因此在鼻黏膜组织水平中也证实了 ECP 在 AR 的发病过程中起了重要作用。

自噬是当前研究的一个热点,笔者目前未见

AR 中有与自噬相关的研究,本课题首次在 AR 中检测自噬标志物的表达。自噬是真核细胞中广泛存在的基本生命现象,是细胞保持内环境稳定的一项重要机制,它可以适应环境变化、防御病原微生物侵袭。LC3 是比较常见的一种检测自噬方法,特异性高,目前已作为检测自噬活性的重要指标之一^[6]。LC3 作为哺乳动物细胞中酵母自噬相关基因 8 的同源物,主要定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成。AR 发病机制主要是 TH1/TH2 介导的免疫失衡,原本占优势的 TH1 介导的免疫反应,转变为 TH2 细胞途径介导的免疫反应占主导地位。细胞自噬参与了 T 细胞和 B 细胞的整个发育过程,其主要作用是维持细胞存活,影响细胞增殖^[7]。

2001 年 WHO 组织世界各国耳鼻喉科专家讨论 AR 对哮喘的影响 (ARIA) 时,提出“同一气道同一疾病”的观点。鼻腔、鼻窦黏膜与呼吸道黏膜不仅相互延续,而且存在多方面的相互作用和影响。目前很多研究已经证明细胞自噬调控许多呼吸道疾病 (如支气管哮喘) 的发病过程。

夏福灿等 (2016) 采用小鼠哮喘模型发现在哮喘状态下,自噬主要调节 B 细胞的活性从而影响 T 细胞的活化以及细胞因子的分泌,也对 B 细胞抗体的分泌有影响,还通过活化 B 细胞来促进细胞内自噬特异性 ATG14-Beclin1-p150-PI3-Kinase 复合体的形成和活化,进而促进细胞自噬的起始和发展。Jiang 等^[8] 研究发现 TLR2 通过调节小鼠 PI3K/AKT 信号通路相关自噬在过敏性气道炎症中发挥关键作用。Cai 等^[3] 研究发现严重特异性哮喘患者与健康对照组对比,发生自噬的 T 淋巴细胞数量增加,并且 T 淋巴细胞中自噬体与膜蛋白 LC3-II 的高表达水平相关。Ban 等^[9] 发现哮喘患者痰液和外周血中 LC3-II 高于正常对照组,并且在 IL-5 刺激的 HL-60 细胞中加入 3-MA 后 LC3-II 和 ECP 表达下降,说明自噬参与了哮喘的发病过程。本实验同时采用免疫组织化学技术和免疫印迹法检测,发现 LC3 在实验组中较对照组增高,更好说明了在 AR 中自噬活性高于对照组。

自噬可以通过 TLR、NLR 信号通路相互作用来调节炎症反应,也能影响巨噬细胞、嗜中性粒细胞等炎症细胞的发育、平衡和存活,影响许多细胞因子的转录、处理和分泌,同时也受细胞因子的调节^[10]。本实验虽然发现 LC3 与 ECP 的表达呈正

相关,但 LC3 通过何种通路导致 AR 中 ECP 的过度分泌,还需在将来的研究中做进一步的探讨。孔维佳等^[11] 在圆桌论坛中也提到 AR 的精准防治。本研究提示可能通过增强细胞自噬来抑制 ECP 的过度表达,从而为 AR 的精准化治疗提供有利的依据。

参考文献

- [1] KRAMER M F, OSTERTAG P, PFROGNER E, et al. Nasal IL-5, IgE, ECP, and sICAM-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis[J]. *Laryngoscope*, 2000, 110: 1056-1062.
- [2] LVINE B, MIZUSHIMA N, VIRGIN H W. Autophagy in immunity and Inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469: 323-335.
- [3] CAI S M, YANG R Q, LI Y, et al. Angiotensin-(1-7) improve liver fibrosis by regulating the NLRP3 inflammasome via redox balance modulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24: 795-798.
- [4] KRAFT M. Asthma phenotypes and interleukin13-moving closer to personalized medicine[J]. *NEJM*, 2011, 365: 1141-1144.
- [5] KAMPE M, LAMPINEN M. Patients with allergic rhinitis and asthma share the pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge[J]. *Clin Mol Allergy*, 2011, 9: 3-7.
- [6] KLIONSKY D J, ABELIOVICH H, AGOSTINIS P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 151-175.
- [7] 饶立宗, 莫碧文, 牛坤汀, 等. 细胞自噬在支气管哮喘中的研究进展与展望[J]. *国际呼吸杂志*, 2016, 36 (9): 694-697.
- [8] JIANG X, FANG L, WU H, et al. TLR2 regulates allergic airway inflammation and autophagy through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40: 1382-1392.
- [9] BAN G Y, PHAM D L, TRINH T H, et al. Autophagy mechanisms in sputum and peripheral blood cells of patients with severe asthma: a new therapeutic target[J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46: 48-59.
- [10] NI CHEALLAIGH C, KEANE J, LAVELLE E C, et al. Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 164: 291-300.
- [11] 孔维佳, 陈建军, 李靖, 等. 变应性鼻炎的精准防治[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 32 (17): 1287-1293.

(收稿日期: 2019-01-28)