

中性粒细胞中嗜酸粒细胞阳离子蛋白的表达及其对鼻部炎症客观评价的影响*

余文婷¹ 王颖¹ 周玥¹ 朱云¹ 陈删¹ 王彦君¹ 孔维佳¹ 陈建军¹

[摘要] 目的:探索中性粒细胞中嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)的表达情况及其对鼻部炎症程度客观评价的影响。方法:分别收集鼻分泌物中中性粒细胞及嗜酸粒细胞,进行ECP免疫组织化学染色,观察不同细胞中ECP的染色情况。选取40例变应性鼻炎(AR)患者为AR组,30例鼻分泌物以中性粒细胞表达为主、不伴有AR且不伴有鼻窦炎的慢性鼻窦炎(CRSsNP)患者为CRSsNP组,24例正常人为对照组。收集3组对象的鼻分泌物,检测其中ECP、髓过氧化物酶(MPO)的含量,嗜酸粒细胞和中性粒细胞的数量及百分率,并进行分析。结果:免疫组织化学染色后可见嗜酸粒细胞和中性粒细胞中均有ECP表达,嗜酸粒细胞中ECP的表达强度显著高于中性粒细胞。鼻分泌物炎症因子检测结果显示,AR组和CRSsNP组中ECP和MPO的表达水平均高于正常组(均 $P < 0.0001$),AR组ECP表达水平与CRSsNP组无差异,但MPO表达水平显著低于CRSsNP组($P < 0.0001$)。结论:中性粒细胞中有ECP表达,且可能对鼻部炎症客观评价造成影响。结合局部ECP及MPO的表达情况,可对局部炎症作出较为准确的判断。

[关键词] 鼻炎,变应性;鼻窦炎;嗜酸粒细胞阳离子蛋白;中性粒细胞

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.07.002

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Expression of eosinophilic cationic protein in neutrophils and its effect on objective evaluation of nasal inflammation

YU Wenting WANG Ying ZHOU Yue ZHU Yun CHEN Shan

WANG Yanjun KONG Weijia CHEN Jianjun

(Department of Otolaryngology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: CHEN Jianjun, E-mail: yly80331@163.com

Abstract Objective: The aim of this study is to explore the expression of ECP in the neutrophils and its impact on the evaluation of nasal inflammation. **Method:** Neutrophils and eosinophils in nasal secretions were collected and stained with ECP immunohistochemistry to observe the staining of ECP in different cells. The concentration of ECP and MPO in nasal secretion were detected of 32 patients with allergic rhinitis (AR group), 29 patients with chronic rhinosinusitis without nasal polyps and allergic rhinitis (CRSsNP group), and 21 healthy people (control group). The percentage of neutrophils and eosinophils were calculated and analyzed as well. **Result:** ECP could be found in both eosinophils and neutrophils with immunohistochemical staining. The expression of ECP is much stronger in eosinophils than that in neutrophils. The ECP and MPO concentration in the nasal secretions of AR group and CRSsNP group were significantly higher than that in control group ($P < 0.0001$), and the ECP concentration in AR group and CRSsNP group had no difference. The expression of ECP in the AR group was not different from that in CRSsNP group, but the expression of MPO was significantly lower than that in CRSsNP group ($P < 0.0001$). **Conclusion:** ECP is expressed in neutrophils, and which is likely to have influence on the objective evaluation to nasal inflammation. Combining with the expression of ECP and MPO, we can make a more accurate judgment of local inflammation.

Key words rhinitis, allergic; rhinosinusitis; eosinophil cationic protein; neutrophil

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是耳鼻咽喉头颈外科最常见的疾病之一,其人群发病率为10%~25%。AR的诊断主要依靠症状及变应原

皮肤点刺试验和(或)血清特异性IgE检测。AR患者局部炎症多以嗜酸粒细胞为主要特征表现^[1],因此临床上对AR局部炎症的评价常以鼻分泌物中嗜酸粒细胞及相关炎症因子作为客观评价指标。嗜酸粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP)是一种具有较强炎性作用的碱性蛋白质,目前多数学者认为ECP是反映嗜酸粒细胞活化的特征性炎症因子和标志物,常被用于反映AR

*基金项目:国家自然科学基金项目(No:81570898);国家自然科学基金项目(No:81873693);科技部十二五科技支撑项目(No:2014BAI07B04)

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻咽喉科(武汉,430022)

通信作者:陈建军, E-mail: yly80331@163.com

患者的炎症程度和症状评价。近年来,亦有研究认为中性粒细胞中亦可有 ECP 表达,但该观点存在争议。有研究对下鼻甲标本进行免疫荧光检测,未发现中性粒细胞中有 ECP 表达^[2]。有研究发现,AR 患者的中性粒细胞可以通过 IgE 依赖机制产生 ECP,其在含有[³⁵S]蛋氨酸和[³⁵S]半胱氨酸的培养液中通过细胞培养方式,发现中性粒细胞可诱导 ECP 的从头合成^[3]。本研究首先通过免疫组织化学方法,并对细胞进行破膜处理后,观察 ECP 在中性粒细胞及嗜酸粒细胞中的表达;同时选取 AR 患者以及鼻分泌物以中性粒细胞为主不伴有过敏因素及鼻息肉的慢性鼻窦炎患者(chronic sinusitis with nasal polyps, CRSsNP),对其鼻分泌物中 ECP 及髓过氧化物酶(MPO)的含量进行检测,观察中性粒细胞中 ECP 的表达情况及其对鼻部炎症客观评价可能造成的影响。

1 资料与方法

1.1 鼻分泌物细胞学筛查

首先,对临床上拟诊断为 AR 和鼻窦炎的患者,取其鼻腔分泌物进行细胞涂片,检测其中炎症细胞的百分率。取样参照 Chen 等^[4]的方法嘱患者擤鼻涕,若患者无鼻分泌物,可将玻璃棒置于患者下鼻道前端处轻轻转动以获取鼻分泌物,尽量避免摩擦鼻黏膜表面。将患者鼻分泌物均匀轻薄地涂抹在载玻片上,覆盖面积须超过 2/3,若分泌物不足以覆盖所需区域,可以重复取样。风干后进行 Wright-Giemsa 染色,在光学显微镜下进行计数^[1]。观察 400 倍镜下的嗜酸粒细胞和中性粒细胞占总炎症细胞的百分率,最后结果取 5 个视野的平均值^[1-3]。

1.2 ECP 免疫组织化学检测

选择以上中鼻分泌物细胞学检查结果为嗜酸粒细胞 100% 和中性粒细胞 100% 的患者各 5 例,进行鼻分泌物细胞 ECP 免疫组织化学检测。

1.2.1 细胞甩片 分别收取以上患者鼻分泌物 100 μ l,加入 4 倍体积的 0.01% 二硫苏糖醇(DTT),摇晃均匀后室温孵育 0.5 h,再加入 4 倍体积的 PBS 终止反应。将混合液与防脱玻片置于甩片机内以 600 r/min 离心 6 min,玻片干燥后待查。

1.2.2 免疫组织化学染色 用免疫组织化学笔在玻片上圈出待查细胞范围,加入多聚甲醛 10 min 固定细胞;流水冲洗干净后加入 Triton X 和牛血清 10 min 破膜并封闭非特异性染色;流水冲洗后加入抗 ECP 一抗,置入湿盒内,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。

第 2 天取出玻片流水冲洗后加入二抗,室温下孵育 1 h;流水冲洗并行 DAB 显色,苏木精染核;冲洗后依次浸入 90%、100% 乙醇 5 min 梯度脱水,二甲苯溶液透明 10 min,中性树胶封片。镜下观察 ECP 在细胞中的染色情况。

1.3 检测 AR 患者与 CRSsNP 患者鼻分泌物中炎症因子含量和炎症细胞百分率

1.3.1 AR 患者、CRSsNP 患者和健康人纳入标准及相关情况 门诊 AR 患者 40 例,男 22 例,女 18 例;年龄 4~41 岁,平均(19.9 \pm 10.8)岁。纳入标准参照 AR 诊断和治疗指南(2015 年,天津):①症状:打喷嚏、清水样涕、鼻痒和鼻塞等症状出现 2 个或以上,每天症状持续或累计在 1 h 以上,可伴有眼痒、流泪和眼红等眼部症状;②体征:常见鼻黏膜苍白、水肿,鼻腔水样分泌物;③变应原检测:至少 1 种变应原皮肤点刺试验和(或)血清特异性 IgE 阳性。

门诊不伴 AR 且不伴鼻息肉的 CRSsNP 患者 30 例,男 17 例,女 13 例;年龄 3~28 岁,平均(9.2 \pm 7.3)岁。纳入标准参照慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2012,昆明):①症状:鼻塞、黏性或黏脓性鼻涕中必具其一,可伴有头面部胀痛、嗅觉减退或丧失;②鼻内镜检查:中鼻道、嗅裂的黏性或黏脓性分泌物,鼻黏膜充血、水肿,不伴有息肉;③部分患者行影像学检查辅助诊断:鼻窦 CT 扫描显示窦口鼻道复合体和(或)鼻窦黏膜炎性病变。为了减少过敏因素干扰,本研究选取的鼻窦炎均行变应原检查排除过敏因素。

正常对照组 24 例,男 5 例,女 19 例;年龄 32~60 岁,平均(38.3 \pm 5.6)岁。纳入标准:既往无鼻窦炎病史且近期末患有呼吸道疾病。

本研究通过华中科技大学伦理委员会批准。

1.3.2 鼻分泌物炎症因子检测 鼻分泌物收集方法参照 Lu 等^[5]的方法并略作调整:将 1.0 cm \times 1.5 cm(儿童为 0.4 cm \times 0.6 cm)无菌海绵轻放入患者鼻腔 1~5 min,待患者感觉有分泌物之后取出,将取出后的棉片放入 2 ml 注射器,挤压注射器,获取的鼻分泌物用 1.5 ml 离心管收集并放入 -20 $^{\circ}$ C 冷冻待查。

检测鼻分泌物中的 ECP 和 MPO 浓度:收集的鼻分泌物以 1:4 000 稀释,将稀释后的样品以 100 μ l/孔注入已经包被好的 ECP/MPO 试剂板,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 30 min;加入二抗,孵育 30 min;加入 HRP-SA 放大反应,孵育 30 min;加入显色液,孵育 15 min 后取出,加入 HCl 终止。读取样品 A 值,换算成浓度,结果用 μ g/ml 表示。

鼻分泌物细胞学检查:参照 1.1 中鼻分泌物细胞学检查方法,检测所有入组人员鼻分泌物中嗜酸粒细胞百分率和中性粒细胞百分率。

1.4 主要试剂和仪器

ECP ELISA kit 及免疫组织化学相关试剂(武汉中敏泰克生物科技有限公司),MPO ELISA kit (Medix biochemica),赛默飞 ECP 检测试剂(Thermo Fisher Scientific Inc),莱卡光学显微镜及成像

系统等。

1.5 统计学方法

各组炎症因子浓度、炎性细胞百分率用分位数表示。采用非配对 *t* 检验比较不同组间炎症因子浓度和炎性细胞百分率的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对于 ECP 的 ELISA 和赛默飞检测试剂结果比较采用 95% CI 的相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞和嗜酸粒细胞免疫组织化学染色结果

图 1 中可见,嗜酸粒细胞瑞氏染色呈现典型的双核及桔红色细胞质颗粒,嗜中性粒细胞瑞氏染色则可见多核及淡蓝色细胞质。嗜酸粒细胞和中性粒细胞经免疫组织化学染色后细胞质内均呈红棕色,但嗜酸粒细胞中 ECP 显色程度明显强于中性

粒细胞。

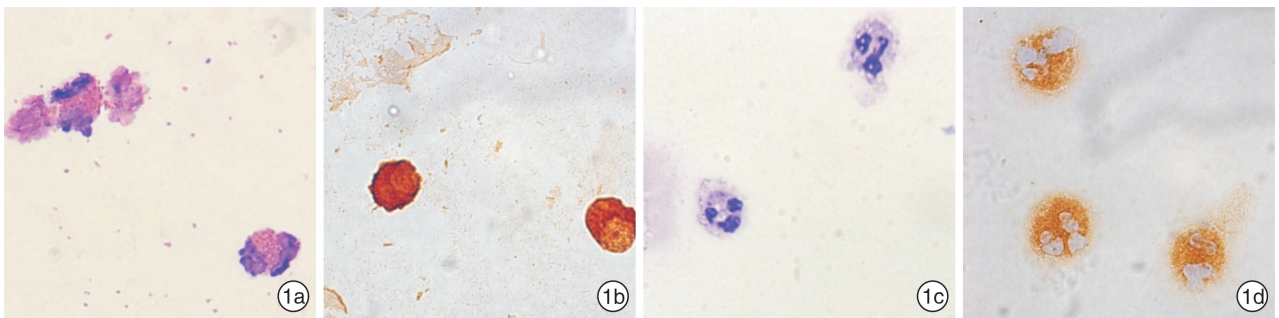
2.2 各组炎症因子浓度、炎性细胞百分率

各组炎症因子浓度、炎性细胞百分率见表 1。

2.3 各组炎症因子和炎性细胞的比较

如图 2a 所示,AR 组和 CRSsNP 组鼻分泌物中 ECP 浓度与对照组相比显著升高(均 $P < 0.000 1$),且 AR 组与 CRSsNP 组无明显差异($P > 0.05$);AR 组中 ECP 浓度中位数稍低于 CRSsNP 组,但 2 组差异无统计学意义。AR 组 MPO 表达水平显著低于 CRSsNP 组($P < 0.000 1$)。

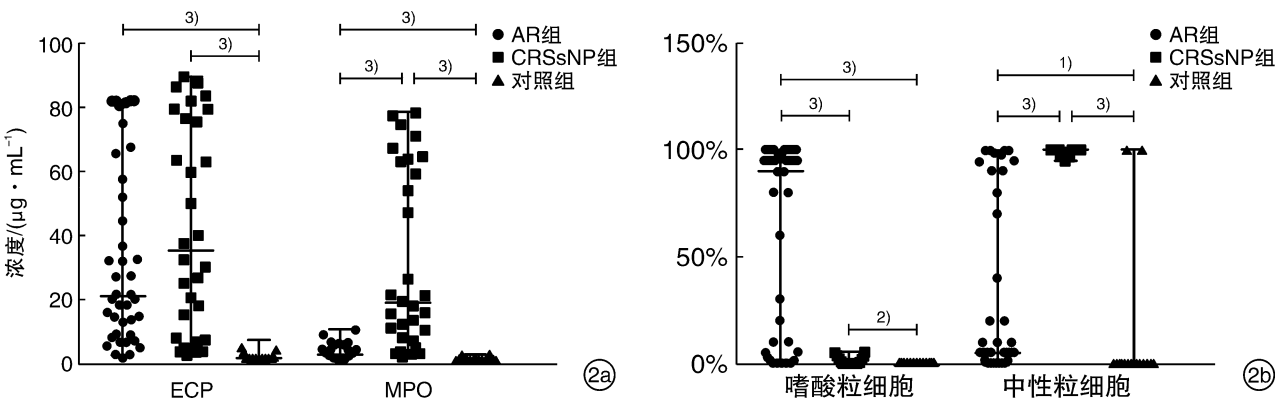
如图 2b 所示,AR 组鼻分泌物嗜酸粒细胞百分率显著高于 CRSsNP 组和对照组(均 $P < 0.000 1$),CRSsNP 组略高于对照组($P = 0.006$);CRSsNP 组鼻分泌物中性粒细胞百分率显著高于 AR 组和对照组(均 $P < 0.000 1$),AR 组稍高于对照组($P = 0.016$)。



1a:嗜酸粒细胞瑞氏染色;1b:嗜酸粒细胞 ECP 免疫组织化学染色;1c:中性粒细胞瑞氏染色;1d:中性粒细胞 ECP 免疫组织化学染色。

图 1 中性粒细胞和嗜酸粒细胞免疫组织化学染色 (×400)

炎症因子和炎性细胞	AR 组	CRSsNP 组	对照组
ECP/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	20.87(9.06~53.59)	35.13(9.87~76.39)	1.68(1.49~2.15)
MPO/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.78(2.27~4.14)	18.85(8.66~62.24)	1.28(1.15~1.48)
嗜酸粒细胞/%	90(5~95)	0(0~2)	0(0~0)
中性粒细胞/%	5(0~80)	100(98~100)	0(0~0)



2a:各组细胞因子浓度之间的比较;2b:各组炎性细胞占比情况的比较(¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$, ³ $P < 0.000 1$)。

图 2 各组炎症因子和炎性细胞的比较

2.4 2 种检测试剂检测 ECP 浓度的相关性分析

为了确保检测试剂的准确性,我们从 3 组中各选取 10 份鼻分泌物样本,分别用 ELISA 方法和赛默飞免疫荧光检测方法测量其中 ECP 含量,并将 2 种检测方法的结果进行相关性分析。如图 3 所示,2 种方法检测 30 例样本中 ECP 的含量,相关性达到 0.975 7($P < 0.000 1$)。

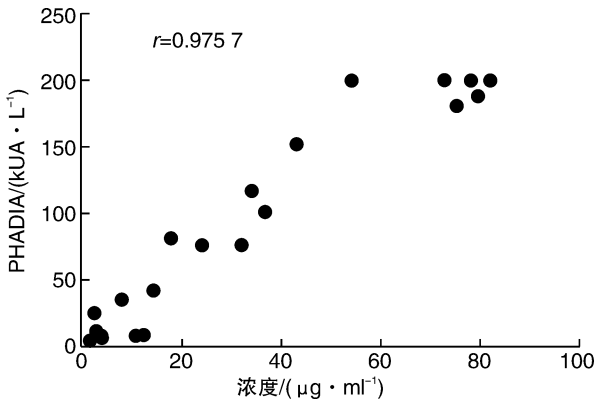


图 3 ECP 的 ELISA 检测结果与赛默飞免疫荧光检测结果的相关性

3 讨论

AR 是一种以 II 型变态反应为主的炎症疾病,嗜酸粒细胞是其中重要的炎症细胞,ECP 通常被认为主要由嗜酸粒细胞分泌,并在 AR 的局部炎症反应中发挥重要作用。许多研究都对 ECP 在 AR 中的作用进行了观察,Di Lorenzo 等^[6]的研究显示,在花粉季节 AR 患者鼻腔灌洗液中 ECP 增加,且与症状评分相关。朱歆洁等研究认为 AR 患儿的鼻塞症状严重程度和发病时间的长短与血清 ECP 水平呈正相关,提示疾病严重度与慢性炎症状态有关。程可佳等^[7]的研究也显示,AR 患者症状发作期血清 ECP 明显升高,且和疾病严重程度有一定相关性。

关于中性粒细胞中 ECP 的表达情况,目前研究存在一定争议。在前言中我们亦提到了相关的研究情况^[2-3]。本实验收集了中性粒细胞百分率为 100% 的鼻分泌物进行 ECP 免疫组织化学染色。染色前我们进行了细胞破膜处理,以便于 ECP 抗体更易于透过细胞膜进入细胞内。结果发现,在中性粒细胞内确实有 ECP 的表达。用同样的方法处理嗜酸粒细胞百分率为 100% 的鼻分泌物,观察 ECP 在嗜酸粒细胞内的表达,发现其表达强度显著高于中性粒细胞。前述 Groger 等^[2]未能测得 ECP 在中性粒细胞中的表达,可能与其细胞处理方式有一定关系。

因为中性粒细胞内 ECP 的表达较弱,所以其是否有可能对鼻炎患者鼻分泌物中 ECP 浓度造成

影响尚不能确定。为此我们选择了不伴过敏因素且不伴鼻息肉的 30 例单纯鼻窦炎患者(鼻分泌物细胞学涂片结果平均值为 97.90% 中性粒细胞)、40 例 AR 患者(鼻分泌物细胞学涂片结果平均值为 52.25% 嗜酸粒细胞)和 24 例健康对照者,检测其鼻分泌物中 ECP 浓度。通过对比观察发现,不伴有 AR 的 CRSsNP 组鼻分泌物中 ECP 浓度与 AR 组无显著差异,CRSsNP 组 ECP 浓度中位数甚至稍高于 AR 组。为了验证结果的准确性,我们采用了 2 种方法(ELISA 方法和赛默飞免疫荧光方法)进行检测,结果发现检测结果一致性极高,相关系数为 0.975 7。经反复验证,我们认为中性粒细胞中 ECP 的表达确实可以影响鼻炎患者鼻分泌物中 ECP 的浓度。对于不伴有 AR 的 CRSsNP 患者鼻分泌物中 ECP 浓度高于 AR 患者的情况,可能原因是,虽然 ECP 在单个嗜酸粒细胞中的表达高于中性粒细胞,但由于 CRSsNP 组中性粒细胞的数量远远多于 AR 组中嗜酸粒细胞的数量,因此 CRSsNP 组鼻分泌物中 ECP 最终浓度可与 AR 组相当甚至更高。

临床上当 AR 患者伴有细菌或病毒感染时,其局部可能以中性粒细胞性炎症为主,而以嗜酸粒细胞为主的过敏性炎症并不明显。但因为感染性炎症导致大量中性粒细胞积聚,可能使 ECP 表达显著升高,此时若以 ECP 作为过敏性炎症严重程度的评价指标,则可能造成误判,并影响治疗方案的选择。

在本研究中,我们同时对 3 组研究对象鼻分泌物中 MPO 浓度进行了检测,MPO 是含血红素辅基的血红素蛋白酶,也是中性粒细胞中储存最丰富的促炎酶,能反映中性粒细胞的活化情况^[8]。结果发现 AR 患者和对照组鼻分泌物中 MPO 含量极低且无明显差异,而不伴有 AR 的 CRSsNP 患者鼻分泌物中 MPO 含量极高。因此我们认为结合鼻分泌物中 ECP 和 MPO,可对鼻炎患者鼻内炎症进行准确判断,若 ECP 和 MPO 同时升高,则鼻部炎症以中性粒细胞炎症为主;若 ECP 升高而 MPO 不高,则局部以嗜酸粒细胞炎症为主;若 ECP 和 MPO 均不高,则鼻部炎症不重。

综上所述,本研究认为 ECP 在中性粒细胞内可有表达,并可影响鼻炎患者鼻分泌物中 ECP 的浓度。结合鼻分泌物中 ECP 和 MPO 这 2 个指标,可对鼻部炎症性质作出较为准确的客观判断。

参考文献

[1] PERIC A, MIRKOVIC C S, DURDEVIC B V, et al. Eosinophil chemokines and clara cell protein 16 production in nasal mucosa of patients with persistent allergic rhinitis [J]. Eurasian J Med, 2017, 49: 178-182.

- [2] GROGER M, BERNT A, WOLF M, et al. Eosinophils and mast cells: a comparison of nasal mucosa histology and cytology to markers in nasal discharge in patients with chronic sino-nasal diseases[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270: 2667-2676.
- [3] MONTESEIRIN J, VEGA A, CHACON P, et al. Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes[J]. *J Immunol*, 2007, 179: 2634-2641.
- [4] CHEN J, ZHOU Y, ZHANG L, et al. Individualized treatment of allergic rhinitis according to nasal cytology[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2017, 9: 403-409.
- [5] LU F X, ESCH R E. Novel nasal secretion collection method for the analysis of allergen specific antibodies and inflammatory biomarkers[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 356: 6-17.
- [6] DI LORENZO G, MANSUETO P, MELLUSO M, et al. Allergic rhinitis to grass pollen: measurement of inflammatory mediators of mast cell and eosinophils in native nasal fluid lavage and in serum out of and during pollen season[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 100: 832-837.
- [7] 程可佳, 汪审清, 徐盈盈, 等. 血清嗜酸粒细胞阳离子蛋白水平与变应性鼻炎及慢性鼻-鼻窦炎关系的探讨[J]. *中华耳鼻喉头颈外科杂志*, 2009, 44(12): 1001-1005.
- [8] AROCA R, CHAMORRO C, VEGA A, et al. Immunotherapy reduces allergen-mediated CD66b expression and myeloperoxidase levels on human neutrophils from allergic patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e94558.
(收稿日期: 2019-02-19)

(上接第 580 页)

- [6] LUIS L, LEHNEN N, MUNOZ E, et al. Anticompen-satory quick eye movements after head impulses: a peripheral vestibular sign in spontaneous nystagmus[J]. *Vestibular Res*, 2016, 25: 267-271.
- [7] BISDOR A R. Management of vestibular migraine[J]. *Therapeutic Adv Neurol Dis*, 2011, 4: 183-191.
- [8] DIETERICH M, OBERMANN M, CELEBISOY N. Vestibular migraine: the most frequent entity of episodic vertigo[J]. *Neurology*, 2016, 263: 82-89.
- [9] 陈瑛, 庄建华, 赵忠新, 等. 氟桂利嗪在偏头痛性眩晕预防治疗中的疗效观察[J]. *临床军医杂志*, 2012, 40(4): 810-812.
- [10] HONAKER J A, GILBERT J M. Adverse effects of health anxiety on management of a patient with benign paroxysmal positional vertigo, vestibular migraine and chronic subjective dizziness[J]. *Otolaryngol*, 2013, 9: 592-595.
- [11] LEMPERT T, OLESEN J, FURMAN J, et al. Vestibular migraine: diagnostic criteria[J]. *J Vestibular Res*, 2012, 22: 167-172.
- [12] LEWIS R F, PRIESOL A J, NICOUCAR K, et al. Dynamic tilt thresholds are reduced in vestibular migraine[J]. *Vestibular Res*, 2011, 21: 323-330.
- [13] MARANO E, MARCELLI E, STASIO E, et al. Trigeminal stimulation elicits a peripheral vestibular imbalance in migraine patients[J]. *Headache*, 2005, 45: 325-331.
- [14] FURMAN J M, MARCUS D A, BALABAN C D. Vestibular migraine: clinical aspects and pathophysiology[J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12: 706-715.
- [15] KOO J W, BALABAN C D. Serotonin-induced plasma extravasation in the murine inner ear: possible mechanism of migraine-associated inner ear dysfunction[J]. *Cephalalgia*, 2006, 26: 1310-1319.
- [16] BREVERN M V, TA N, SHANKAR A, et al. Migrainous vertigo: mutation analysis of the candidate genes CACNA1A, ATP1A2, SCN1A, and CACNB4[J]. *Headache*, 2006, 46: 1136-1141.
- [17] SOHN J H. Recent advances in the understanding of vestibular migraine[J]. *Behav Neurol*, 2016, 2016: 1801845.
- [18] LAURITSEN C G, MARMURA M J. Current treatment options: vestibular migraine[J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2017, 19: 38.
- [19] LIU F, MA T, CHE X, et al. The efficacy of venlafaxine, flunarizine, and valproic acid in the prophylaxis of vestibular migraine[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 524.
- [20] BARBOSA F, VILLAT R. Vestibular migraine: diagnosis challenges and need for targeted treatment[J]. *Neuro Psiquiatria*, 2016, 74: 416-422.
- [21] STOLTE B, HOLLE D, NAEGEL S, et al. Vestibular migraine[J]. *Cephalalgia*, 2015, 35: 262-270.
(收稿日期: 2018-10-05)