

骨膜蛋白在鼻息肉组织中的表达特征*

杨武¹ 雷静¹ 张静^{2△} 王佳³ 谭华章¹ 喻国冻³ 王洪田^{2▲}

[摘要] 目的:探讨骨膜蛋白在鼻息肉发病过程中的作用及可能机制。方法:收集 30 例 CRSwNP 患者鼻息肉组织和 18 例正常对照组的鼻黏膜,免疫组织化学和免疫印迹技术检测骨膜蛋白在各组鼻黏膜中的表达情况;荧光定量 PCR 法检测各组鼻黏膜组织中骨膜蛋白和 IL-5 mRNA 表达水平;比较嗜酸粒细胞性和非嗜酸粒细胞性鼻息肉中骨膜蛋白 mRNA 的表达差异。结果:骨膜蛋白主要表达于鼻黏膜上皮下区域,鼻息肉组织中骨膜蛋白阳性细胞数显著高于正常对照组($P < 0.01$);骨膜蛋白 mRNA 表达水平和蛋白表达水平在嗜酸粒细胞性鼻息肉组织中明显高于非嗜酸粒细胞性鼻息肉组织和正常对照组(均 $P < 0.01$);鼻息肉组织中骨膜蛋白 mRNA 和 IL-5 mRNA 表达水平呈正相关($r = 0.7315, P < 0.01$)。结论:鼻息肉组织中高表达的骨膜蛋白可能通过趋化和活化嗜酸粒细胞参与鼻息肉的形成过程。

[关键词] 骨膜蛋白;鼻息肉;鼻窦炎;嗜酸粒细胞;白细胞介素-5

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.05.009

[中图分类号] R765.25 **[文献标志码]** A

Clinical significance and expression of periostin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps

YANG Wu¹ LEI Jing¹ ZHANG Jing² WANG Jia³ TAN Huazhang¹
YU Guodong³ WANG Hongtian²

(¹Department of Otolaryngology, Xiangyang No. 1 People's Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Xiangyang, 441021, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, First Medical Center, PLA General Hospital; ³Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University)

Corresponding author: WANG Hongtian, E-mail: wht301@263.net

Abstract Objective: To investigate the clinical significance and expression of periostin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps(CRSwNP). **Method:** In this study, we collected 30 CRSwNP patients' nasal polyps(NPs) and 18 control subjects' normal nasal mucosa of uncinat process. The expressions of periostin and IL-5 were examined using immunohistochemistic staining, immunostaining and /or quantitative RT-PCR and the eosinophil infiltration were evaluated as well. **Result:** Periostin was mainly expressed in the subdermal area of nasal mucosa. The number of periostin positive cells in nasal polyps was significantly higher than that in normal control group($P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of periostin in NPs were significantly higher than that of

*基金项目:国家自然科学基金(No:81670901);贵州省科学技术厅攻关项目(No:sy2011-3064)

¹湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院耳鼻咽喉科(湖北襄阳,441021)

²中国人民解放军总医院第一医学中心耳鼻咽喉头颈外科

³贵州医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科

△现在首都医科大学附属北京安贞医院耳鼻咽喉头颈外科(北京,100029)

▲现在首都医科大学附属北京世纪坛医院变态反应科(北京,100038)

通信作者:王洪田,E-mail:wht301@263.net

- [6] Kang IG, Ju YH, Jung JH, et al. The effect of PM10 on allergy symptoms in allergic rhinitis patients during spring season[J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12(1):735-745.
- [7] Kim DH, Han K, Kim SW. Relationship Between Allergic Rhinitis and Mental Health in the General Korean Adult Population[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2016, 8(1):49-54.
- [8] Nathan RA. The burden of allergic rhinitis[J]. Allergy Asthma Proc, 2007, 28(1):3-9.
- [9] 龙冬秋,刘振,程方祝.持续性、中重度变应性鼻炎脱敏治疗前后的生活质量评估[J].中国医药指南,

2013, 11(17):659-659.

- [10] Sansone RA, Sansone LA. Allergic rhinitis: relationships with anxiety and mood syndromes[J]. Innov Clin Neurosci, 2011, 8(7):12-17.
- [11] 章娜娜,陶泽璋,邓玉琴,等.不同过敏原对变应性鼻炎患者症状及生活质量影响的比较[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2012,6(1):47-51.
- [12] 刘萍,郭杰峰,吴郁丽,等.变应性鼻炎儿童的智力结构与个性特征分析[J].四川精神卫生,2016,29(2):172-175.

(收稿日期:2019-04-28)

the control nasal mucosa(all $P < 0.01$). The expression of periostin mRNA were positively correlated with IL-5 expression in NPs($r = 0.7315$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Our findings indicate periostin may participate in the formation of nasal polyps by means of chemostaxis and activation of eosinophils.

Key words periostin; nasal polyp; sinusitis; eosinophil; IL-5

慢性鼻窦炎伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyp, CRSwNP)表现为局部 Th2 细胞因子(如 IL-5)表达增高和嗜酸粒细胞浸润的鼻腔鼻窦慢性炎症。目前,根据鼻息肉的炎症类型可以分为嗜酸粒细胞性鼻息肉(eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, ECRSwNP)和非嗜酸粒细胞性鼻息肉(non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, non-ECRSwNP)^[1-2]。尽管许多研究试图解释鼻息肉的致病机制,但不同类型鼻息肉的具体分子机制仍未得到很好的阐明^[3]。

骨膜蛋白是一种细胞外基质蛋白,在气道慢性炎症的发病过程中发挥重要作用^[4-5]。研究表明,IL-4 和 IL-13 可以诱导成纤维细胞产生骨膜蛋白,后者与细胞表面的黏附分子相互作用,促进组织的形成或重塑^[6-7]。对于支气管哮喘患者,支气管黏膜中高水平的骨膜蛋白与患者对皮质醇类药物的低反应程度有很强的相关性^[8]。此外,有研究表明,骨膜蛋白可以加速嗜酸粒细胞在炎症部位的聚集和激活,进而促进局部炎症的发生和发展^[9]。因此,本研究旨在探索骨膜蛋白在不同嗜酸细胞类型鼻息肉中的表达情况,期望进一步阐明鼻息肉的发生和发展过程。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2016-2018 年在襄阳市第一人民医院耳鼻喉科就诊的 30 例 CRSwNP 患者(鼻息肉组),男 17 例,女 13 例;年龄(36.3 ± 4.4)岁;其中 7 例合并支气管哮喘。所有患者均符合 CRSwNP 的诊断标准^[1],并接受了鼻内镜手术;手术前 4 周内均未接受抗生素、糖皮质激素或免疫抑制药物治疗。剔除有急性感染、真菌性鼻窦炎、囊性纤维化和后鼻孔息肉患者。根据单个高倍镜视野下嗜酸粒细胞的数目^[10],将鼻息肉分为 ECRSwNP 16 例和 non-ECRSwNP 14 例。收集单纯鼻中隔偏曲患者偏曲对侧的代偿性肥大钩突黏膜作为正常对照组(18 例)。本研究通过了医院伦理委员会的批准,并且每位患者均签署了知情同意书。

1.2 组织样本处理

每个样本均分为 3 份以进行后续实验。①仔细剪碎组织样本,浸没于 RNA 储存液中,4℃过夜后,-80℃保存,后续 qRT-PCR 实验;②取新鲜鼻黏膜组织浸没于 4%多聚甲醛中,4℃保存,后续免疫组织化学染色;③新鲜鼻黏膜组织置于-80℃保存,后续 Western blot 实验。

1.3 免疫组织化学染色

本次实验采用 EnVision 法染色。石蜡切片经烤片,脱蜡,水化,阻断内源性过氧化物酶,抗原修复,山羊血清封闭后加一抗,4℃湿盒过夜。PBS 洗涤后,加二抗室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次。DAB 溶液显色 5 min,水洗,苏木精复染 10 s,脱水干燥,中性树胶封片。

1.4 qRT-PCR

运用 TRIzol 法抽提总 RNA,使用 Takara 公司逆转录试剂盒,按步骤进行逆转录反应,获得 cDNA。SYBR 法进行骨膜蛋白和 IL-5 荧光定量 PCR 检测,骨膜蛋白上游引物序列:CTC ATA GTC GTA TCA GGG GTC G;下游引物序列:AGC CTC ATT ACT CGG TGC AAA。IL-5 上游引物序列:TGC TGA TAG CCA ATG AGA CTC TG;下游引物序列:TTT CCA CAG TAC CCC CTT GC。使用 Takara 荧光定量 PCR 试剂盒,根据步骤于 7500 ABI PRISM 机器上进行荧光定量 PCR 检测。反应条件为 42℃ 5 min,95℃ 10 s,循环 1 次;95℃ 5 s,60℃ 34 s,循环 40 次。以 β -actin 作为内部参考酶,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.5 免疫印迹检测

鼻组织总蛋白以加入 Cocktail 蛋白酶抑制剂(美国 Sigma 公司)的 RIPA 蛋白裂解液试剂盒(中国碧云天公司)提取后,采用 BCA 法检测蛋白浓度。电泳时每孔上样量为 10 μ g,行 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转膜至 0.45 mm PVDF 膜上;以含 5%脱脂奶粉 TBST 液室温摇床封闭 1 h 后,TBST 洗膜 3 次;在浓度为 1:1000 的骨膜蛋白一抗液中 4℃孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后,以 1:1000 浓度的二抗液室温下孵育 1 h;TBST 再次洗膜 3 次,滴加 ECL 发光液(美国 Millipore 公司),在 Bio-Rad 凝胶成像仪上检测发光信号;采用 Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值。依据 GAPDH 为内部参考酶,分析不同样本之间蛋白表达差异。

1.6 统计分析

采用 SPSS 17.0,用 Kruskal-Wallis H 检验和非参数 Mann-Whitney U 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

正常对照组中骨膜蛋白主要表达于黏膜上皮下区域的细胞外基质,阳性细胞呈现典型的褐色染

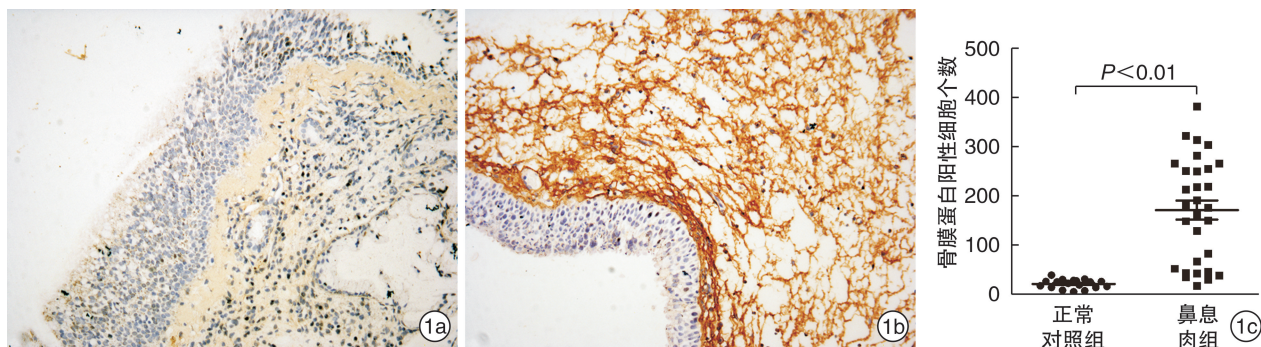
色;鼻息肉组中骨膜蛋白阳性细胞数显著增高 ($P < 0.01$),提示鼻息肉组中骨膜蛋白的表达强度显著高于正常对照组。见图 1。

2.2 mRNA 检测结果

鼻息肉组骨膜蛋白 mRNA 的表达水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),见图 2。ECRSwNP 的骨膜蛋白 mRNA 和蛋白表达水平显著高于 non-ECRSwNP ($P < 0.01$),见图 3、4。

2.3 鼻息肉组织中骨膜蛋白和 IL-5 mRNA 表达的相关性

同时检测鼻息肉组织中骨膜蛋白 mRNA 和 IL-5 mRNA 的表达水平并进行相关分析,结果发现,鼻息肉组织中骨膜蛋白 mRNA 表达水平和 IL-5 mRNA 表达水平存在显著正相关 ($r = 0.7315$, $P < 0.01$)。见图 5。



1a:正常对照组;1b:鼻息肉组;1c:正常对照组和鼻息肉组骨膜蛋白阳性细胞计数。

图 1 正常对照组和鼻息肉组骨膜蛋白的免疫组织化学染色结果

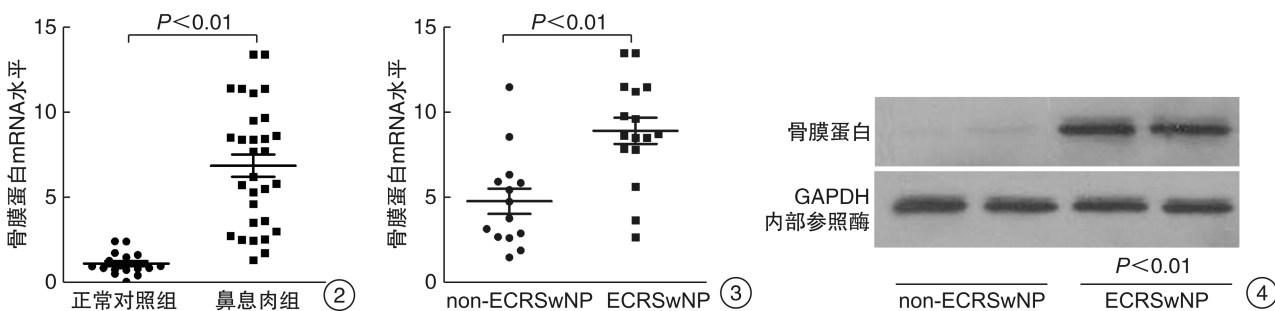


图 2 鼻息肉组和正常对照组骨膜蛋白的 mRNA 表达结果; 图 3 不同亚型鼻息肉组织中骨膜蛋白的 mRNA 表达结果; 图 4 不同亚型鼻息肉组织中骨膜蛋白的蛋白表达结果

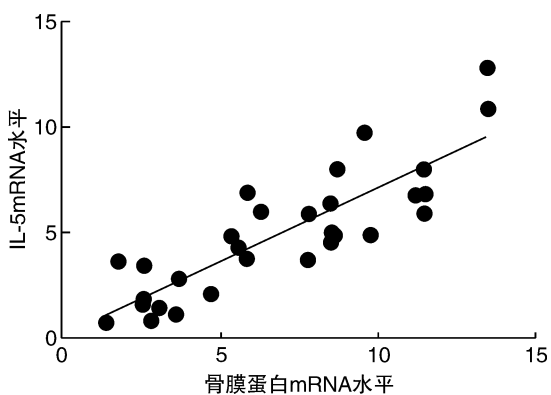


图 5 鼻息肉组织中骨膜蛋白和 IL-5 mRNA 表达的相关性

3 讨论

CRSwNP 是一种上气道慢性炎症性疾病,以 Th2 反应增强、嗜酸粒细胞浸润和组织水肿为特点^[1-2]。国际上,根据息肉组织中嗜酸粒细胞浸润程

度将鼻息肉分为 ECRSwNP 和 non-ECRSwNP^[2]。不同组织类型的鼻息肉选用的治疗策略不同。目前,糖皮质激素通常作为临床一线治疗药物,但临床实践中患者对糖皮质激素的反应程度个体差异很大,往往不能取得很好的治疗效果^[11-12]。因此,阐明鼻息肉的致病机制,选取有价值的药物治疗靶点,对建立精准治疗策略具有重要临床意义。

本研究中,我们首先检测了骨膜蛋白在鼻息肉组织的定位情况,通过免疫组织化学检测证实,骨膜蛋白主要聚集于黏膜上皮下区域,沉积于此处的骨膜蛋白与细胞外基质成分如 I 型胶原蛋白、纤维连接蛋白和细胞粘素 C 相互作用形成网状结构,可能有助于嗜酸粒细胞的迁移^[9,13]。通过蛋白和基因检测,我们发现鼻息肉组织中骨膜蛋白表达较正常对照组显著增强,mRNA 表达也显著增高,证实骨膜蛋白在鼻息肉发病中发挥了一定作用。

骨膜蛋白作为一种细胞外基质蛋白,在过敏性炎症过程中具有重要的促炎作用。其沉积于炎症部位,通过细胞外基质激活免疫细胞甚至非免疫细胞,进一步放大炎症信号^[14]。有研究证明,炎症病灶中的 IL-4 和 IL-13 可以促进成纤维细胞产生骨膜蛋白,后者进一步激活炎症信号通路^[6]。近年国内学者报道,骨膜蛋白可以促进嗜酸粒细胞在炎症部位的聚集,产生更强的炎症反应,在过敏性炎症疾病过程中具有明显的 Th2 反应增强的特点^[9]。为了评估骨膜蛋白是否在鼻息肉嗜酸性炎症中发挥作用,我们将鼻息肉分为 ECRSwNP 和 non-ECRSwNP 进行比较,结果发现,ECRSwNP 骨膜蛋白 mRNA 水平相较于 non-ECRSwNP 和正常对照组明显升高,初步证实了以嗜酸粒细胞浸润为主要特点的 ECRSwNP 与骨膜蛋白的表达具有一定相关性。结合其他研究报道,骨膜蛋白可以促进嗜酸粒细胞在炎症部位的聚集,并作用于嗜酸粒细胞而参与鼻息肉的发病过程。

众所周知,嗜酸粒细胞可以通过合成 IL-5 进行自我活化和抗凋亡过程,IL-5 是诱导嗜酸粒细胞活化的重要细胞因子。为了验证上述假设,我们进一步检测了鼻息肉组织中 IL-5 mRNA 与骨膜蛋白 mRNA 的表达,并进行了相关分析。结果证实,鼻息肉组织中骨膜蛋白 mRNA 除了与嗜酸粒细胞浸润相关外,还与 IL-5 mRNA 表达存在正相关,进一步证实了骨膜蛋白可能与嗜酸粒细胞存在相互作用,通过趋化和活化嗜酸粒细胞合成 IL-5 等促进鼻息肉组织炎症的发展。有研究指出,哮喘患者血清中骨膜蛋白含量与机体外周血嗜酸粒细胞数量、阿司匹林不耐受程度有很强的相关性,进而推测骨膜蛋白高度参与了嗜酸粒细胞为主的炎症反应^[15-16]。结合本研究所得结果,我们认为鼻息肉中高表达的骨膜蛋白参与了息肉的形成与发展,在不同组织类型中骨膜蛋白的差异性表达预示着需要采用针对性、个性化的治疗方案^[17],从而提升鼻息肉的治疗水平,达到精准治疗的目标。

参考文献

- [1] Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists [J]. *Rhinology*, 2012, 50(1): 1-12.
- [2] Akidris CA, Bachert C, Cingi C, et al. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: A PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma Immunology [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(6): 1479-1490.
- [3] Chin D, Harvey RJ. Nasal polyposis: an inflammatory condition requiring effective anti-inflammatory treatment [J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 21(1): 23-30.
- [4] Izuhara K, Arima K, Ohta S, et al. Periostin in allergic inflammation [J]. *Allergol Int*, 2014, 63(2): 143-151.
- [5] Izuhara K, Conway SJ, Moore BB, et al. Roles of Periostin in Respiratory Disorders [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(9): 949-956.
- [6] Takayama G, Arima K, Kanaji T, et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1): 98-104.
- [7] Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, et al. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2590-2600.
- [8] Jia G, Erickson RW, Choy DF, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(3): 647-654.
- [9] Wang M, Wang X, Zhang N, et al. Association of periostin expression with eosinophilic inflammation in nasal polyps [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(6): 1700-1703.
- [10] Wen W, Liu W, Zhang L, et al. Increased neutrophilia in nasal polyps reduces the response to oral corticosteroid therapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(6): 1522-1528.
- [11] Mullol J, Obando A, Pujols L, et al. Corticosteroid treatment in chronic rhinosinusitis: the possibilities and limits [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2009, 29(4): 657-668.
- [12] Helling PW, Fokkens WJ, Akdis C, et al. Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? [J]. *Allergy*, 2013, 68(1): 1-7.
- [13] Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(19): 3201-3207.
- [14] Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, et al. Periostin in inflammation and allergy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(23): 4293-4303.
- [15] Matsusaka M, Kabata H, Fukunaga K, et al. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels [J]. *Allergol Int*, 2015, 64(2): 175-180.
- [16] Kim MA, Izuhara K, Ohta S, et al. Association of serum periostin with aspirin-exacerbated respiratory disease [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014, 113(3): 314-320.
- [17] 李华斌,冯韶燕,程岚.嗜酸粒细胞性慢性鼻窦炎的临床特点和治疗策略 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(3): 177-179.

(收稿日期:2018-12-11)