TET 基因与 5-羟甲基胞嘧啶在慢性鼻窦炎中的表达及意义*

姚冲[1]　许昱[1]

［摘要］ **目的**:探讨 TET 基因和 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)在慢性鼻窦炎(CRS)中的表达及临床意义。**方法**:获取 20 例 CRS 伴鼻息肉患者的息肉组织(CRSwNP 组),20 例 CRS 不伴鼻息肉患者的钩突组织(CRSsNP 组)和 10 例鼻中隔偏曲患者的中鼻甲组织(对照组)。通过免疫荧光技术、Western-Blot 和实时荧光定量 PCR 检测 TET 基因和 5hmC 在 CRS 中的表达。**结果**:TET1/2/3 基因和 5 hmC 在 CRSsNP 组中均有较高表达,在 CRSwNP 组和对照组中表达较低,CRSsNP 组与 CRSwNP 组和对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);CRSwNP 组中 TET1 与 TET3 的表达显著低于对照组($P<0.05$)。**结论**:DNA 去甲基化在鼻息肉的形成中有着重要作用,TET1、TET2、TET3 和 5hmC 的高表达可能降低鼻息肉形成风险;CRS 中 DNA 去甲基化增加有可能降低鼻息肉形成风险,当 CRS 中 DNA 甲基化程度较高、DNA 去甲基化程度较低时疾病可能向 CRSwNP 发展,而当 DNA 甲基化程度较低、DNA 去甲基化程度较高时则可能发展为 CRSsNP。

［关键词］ 鼻窦炎;TET 蛋白;甲基化;5-羟甲基胞嘧啶
DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2021.01.013
［中图分类号］ R765.4　［文献标志码］ A

The expression and significance of TET gene and 5hmC in chronic rhinosinusitis

YAO Chong　XU Yu
(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430061, China)
Corresponding author: XU Yu, E-mail: xy37138@163.com

Abstract **Objective**: To investigate the expression and clinical significance of TET gene and 5hmC in chronic sinusitis. **Methods**: Acquiring 20 cases of nasal polyps from chronic sinusitis with polyps(CW), 20 cases of uncinate process tissues from chronic sinusitis without polyps(CS), 10 cases of middle turbinate tissues from patients with nasal septum deviated as normal group(N). The expression of TET gene and 5hmC in chronic sinusitis was measured by immunofluorescence, Western-Blot and Quantitative real-time PCR. **Results**: Both TET1/2/3 gene and 5 hmC were highly expressed in the CS group, but were lower in the CW group and the N group. There were statistically significant differences between the CS group and the CW group($P<0.05$), and between the CS group and the N group($P<0.05$). The expressions of TET1 and TET3 in the N group were higher than those in the CW group, and the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion**: DNA demethylation plays an important role in the formation of nasal polyps. High expression of TET1, TET2, TET3 and 5hmC May reduce the risk of nasal polyps. Increased DNA demethylation in chronic sinusitis may reduce the risk of nasal polyp formation. When the degree of DNA methylation in chronic sinusitis is high and the degree of DNA demethylation is low, the disease may develop to CRSwNP, and when the degree of DNA methylation is low and the degree of DNA demethylation is high, the disease may develop to CRSsNP.

Key words sinusitis; TET protein; methylation; 5-hydroxymethylcytosine

慢性鼻窦炎(CRS)是指鼻与鼻窦黏膜的慢性炎症[1]。根据表型,CRS 可分为 CRS 伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP)和 CRS 不伴鼻息肉(chronic rhinos-inusitis without nasal polyps, CRSsNP)两类。其中 CRSwNP 还分为嗜酸性 CRSwNP 和非嗜酸性 CRSwNP 两类[2-3]。最新研究表明,表观遗传学不仅在肿瘤领域有着重要作用,在 CRS、哮喘、变应性鼻炎等呼吸道炎症疾病中也有着重要的作用[4-5]。糖皮质激素是治疗 CRS 的重要药物,而最新研究发现糖皮质激素可以影响鼻腔细胞的 DNA 甲基化,从而改善炎症反应[6]。因此研究 CRS 的表观遗传学变化对揭示 CRS 的发病机制有着重要的意义。DNA 甲基化是常见的表观遗传修饰方式,目前 CRS DNA 甲基化的研究较多,而关于去甲基化的研究较少,DNA 去甲基化是指 DNA 胞嘧啶的第 5 位碳原子上的 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mc)转化为 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC),从而使基因获得转录活性,该过程受到 TET(ten-eleven translocation)蛋白的催化,是机体对 DNA 甲基化水平的一种主动调控

*基金项目:国家自然科学基金项目(No:81770986)
[1]武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科(武汉,430061)
通信作者:许昱,E-mail:xy37138@163.com

方式，也是调控基因表达的一种重要手段。本实验通过检测 CRS 中 5hmC 表达以及 TET 基因的变化情况之间的关系，以初步探讨鼻窦炎的表观遗传调控机制。

1　资料与方法

1.1　临床资料

获取 2018 年 9 月－2019 年 9 月我科 20 例 CRSwNP 患者（CRSwNP 组）鼻息肉组织，20 例 CRSsNP 患者（CRSsNP 组）钩突组织和 10 例鼻中隔偏曲患者（对照组）中鼻甲组织。手术中取出标本后分为两份，一份立即放入液氮中，然后转移到－80℃冰箱保存；一份放入甲醛中保存，用于制作石蜡切片。诊断标准参照中国 CRS 诊断和治疗指南[1]。排除标准：手术前 4 周内接受抗生素和糖皮质激素治疗，患有囊性纤维化、阿司匹林耐受不良、肿瘤、免疫缺陷或其他遗传性疾病。所有患者均在术前签署标本采集知情同意书，且本研究获武汉大学人民医院伦理委员会批准。

1.2　主要试剂

TET2、TET3 抗体（Cell Signaling Technology，美国），TET1 抗体（Sangon Biotech，中国），Takara 试剂盒（Takara，日本），5hmC 抗体（Cell Signaling Technology，美国）

1.3　免疫荧光

将切片置于 65℃烤箱中烘烤 3 h，按顺序进行二甲苯脱蜡，柠檬酸钠抗原修复，Triton 破膜处理，3%过氧化氢液去除内源性酶，5% BSA 封闭，加入 5hmC 一抗（稀释 1∶400）4℃避光孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，DAPI 染色 5 min，滴入适量抗荧光淬灭剂，封片。

1.4　免疫荧光半定量分析

5hmC 的强度通过 ImageJ 软件进行荧光半定量分析，在 Image J 软件中打开荧光图像，然后将其转换为灰度图像，并将其颜色反转。再对光密度进行校准，然后选择荧光表达的范围，测量细胞的平均光密度（IOD）和面积大小，“总 IOD/总面积”的值代表免疫荧光的强度。

1.5　总 RNA 提取

将组织标本放入研磨仪中，加入 1000 μL Trizol 试剂研磨 30 s，静止 10 min 后转入 1.5 mL 离心管，加入 200 μL 氯仿，充分震荡后静止 5 min，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，吸取上层清液置于 1.5 mL 离心管，加入等量异丙醇，混匀后静止 10 min，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，弃上清，加入 75%乙醇 DEPC 水 1 mL，吹打混匀，4℃ 10 000 r/min 离心 10 min，弃上清，吸干管内残留液体，室温干燥后，根据沉淀加入适量 DEPC 水溶解，溶液即为 RNA 提取液，以上操作皆在冰上进行。

1.6　实时荧光定量 PCR

按 Takara 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应，将提取的 RNA 进行去除基因组 DNA 反应后进行逆转录反应，反应条件：37℃下进行 15 min，然后在 85℃下 5 s。定量反应在 CFX9 Real-Time PCR 中进行，反应条件：在 95℃持续 30 s；在 95℃持续 5 s，在 55℃持续 30 s，在 72℃持续 1 min，此三步循环 39 次。表 1 为被检测基因（TET1/2/3 和 GAPDH）的引物序列。

表 1　使用荧光定量 PCR 的引物序列和退火温度

基因	序列（5'-3'）	退火温度/℃
GAPDH	F：CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	55
	R：ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
TET1	F：AAAAACGCTATGAGCTCTGTTG	55
	R：CAGGCTGCTGGAATACTAAAAC	
TET2	F：GGCTACAAAGCTCCAGAATGG	55
	R：AAGAGTGCCACTTGGTGTCTC	
TET3	F：TCCAGCAACTCCTAGAACTGAG	55
	R：AGGCCGCTTGAATACTGACTG	

1.7　TET 蛋白的 Western-Blot 检测

将组织进行液氮研磨后加入 1 mmol/L 裂解液于冰上孵育 0.5 h，裂解细胞。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳，PVDF 转膜。采用含 5%脱脂牛奶的 TBST，室温封闭 1 h。加入一抗，抗 TET1/2/3（稀释 1∶1000）在 4℃过夜。TBST 洗涤后，印迹与二抗体孵育在室温下 1 h。使用 Quantity One 软件对蛋白进行定量分析。

1.8　统计学处理

实验的所有数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析，2 组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组组织中 5hmC 的免疫荧光中表达水平

免疫荧光结果显示，5hmC 在各组组织中均有表达。3 组间表达强度有显著差异，两两比较显示，CRSsNP 组中的 5hmC 荧光表达显著高于 CRSwNP 组和对照组（$P<0.05$），说明与 CRSsNP 相比，CRSwNP 组存在较低的去甲基化水平，见图 1、2。

2.2　TET 的实时荧光定量 PCR 检测

TET 的实时荧光定量 PCR 检测结果显示，TET1、TET2、TET3 在 3 组组织中均有表达。CRSwNP 组的 TET1、TET2、TET3 的表达均显著低于 CRSsNP 组；与对照组相比，CRSsNP 组在 TET1、TET2、TET3 三个基因的表达上差异有统计学意义（$P<0.05$）。CRSwNP 组与对照组相比，

TET1、TET2、TET3 的表达差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 3。

2.3 TET 蛋白 Western-Blot 检测

TET 蛋白 Western-Blot 检测结果显示，TET1、TET2、TET3 蛋白在 3 组中均有表达。与对照组及 CRSsNP 组相比，CRSwNP 组 TET1 和 TET3 蛋白的表达较低（$P<0.05$），而 TET2 蛋白表达无显著差异。与 CRSwNP 组和对照组相比，CRSsNP 组的蛋白表达水平较高（$P<0.05$），见图 4。

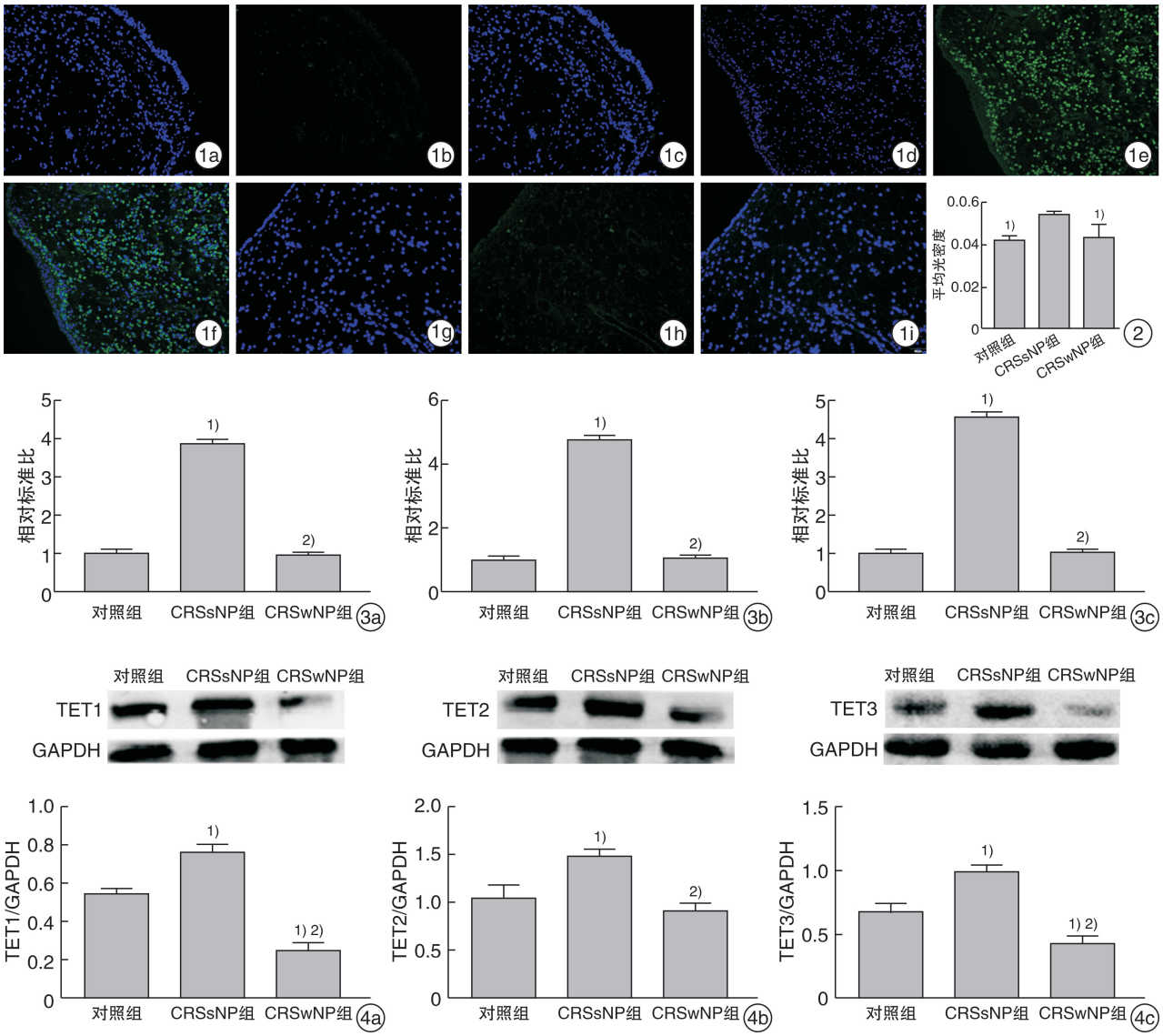

图 1 各组 5hmC 的免疫荧光表达水平 1a：对照组 DAPI 表达；1b：对照组 5hmC 表达；1c：对照组 Merge 表达；1d：CRSsNP 组 DAPI 表达；1e：CRSsNP 组 5hmC 表达；1f：CRSsNP 组 Merge 表达；1g：CRSwNP 组 DAPI 表达；1h：CRSwNP 组 5hmC 表达；1i：CRSwNP 组 Merge 表达； **图 2 3 组定量 5hmC 荧光信号强度比较** 与 CRSsNP 组比较，1) $P<0.05$； **图 3 各组中 TET 基因的相对表达水平** 3a：CRSwNP 组 TET1 的表达；3b：CRSsNP 组 TET2 的表达；3c：对照组 TET3 的表达；与对照组比较，1) $P<0.05$；与 CRSsNP 组比较，2) $P<0.05$； **图 4 3 组中 TET 蛋白的相对表达水平及蛋白定量分析** 4a：CRSwNP 组；4b：CRSsNP 组；4c：对照组；与对照组比较，1) $P<0.05$；与 CRSsNP 组比较，2) $P<0.05$。

3 讨论

CRS 是常见的慢性疾病之一，影响全球 4%～10%人群的健康[7]。研究发现 DNA 甲基化的改变可能与 CRS 病理生理的相关变化有着紧密的联系[8]。5hmC 常常分布在哺乳动物常染色体区域，特别是在启动子、外显子区域、远端顺式作用元件，这些区域与基因转录活性有重要联系，因而 5hmC 被认为是一个稳定的去甲基化标志。因此通过检测 CRS 组织中的 5hmC 表达水平，可以检测 CRS 的去甲基化水平。TET 蛋白是 Fe(Ⅱ)和 α-酮戊二酸依赖性双加氧酶，可以催化 5mC 逐步氧化为 5hmC、5-甲酰胞嘧啶（5fC）和 5-羧基胞嘧啶

(5caC)[9]，促进主动去甲基化。越来越多的证据表明，TET 酶在调节基因表达，促进细胞分化和抑制肿瘤形成中起着至关重要的作用。

基因去甲基化在表观遗传调控中的作用近年来颇受重视。哮喘和变应性鼻炎均为呼吸道疾病，其发病机制都已被发现与去甲基化有关。Li 等[10]研究显示在变应性鼻炎患者的外周血单核细胞中 TET1、TET3 和 5hmC 表达增高。在哮喘患者的鼻气道上皮细胞中 TET1 表达和总体 5hmC 水平较高[11]。在尘螨诱导的气道高反应性小鼠模型中，小鼠肺部组织的去甲基化水平也增加[12]。CRS 与哮喘和变应性鼻炎均为呼吸道疾病，尚未有文献报道基因去甲基化在 CRS 中的作用。本研究中，我们发现在 CRSsNP 组中 TET1、TET2、TET3 和 5hmC 中表达一致，都有较高的表达水平，这表明 TET 和 DNA 去甲基化在 CRSsNP 的病理过程中起重要作用。CRSwNP 和对照组中 TET1、TET2、TET3 和 5hmC 的表达一致，都表现出较低水平的表达。但我们在实验中发现 CRSwNP 和对照组中 TET1 和 TET3 的蛋白表达存在显著差异，而其 TET1 和 TET3 的基因表达和 5hmC 的表达却一致。导致这种差异的具体原因并不清楚，不过有研究发现鼻息肉形成中涉及的关键基因受到环境因素的影响[7]。在本实验中我们还发现在 CRSwNP 组中部分病例的 5hmC 荧光表达强度较高。根据苏木精-伊红染色分析，这一部分病例为嗜酸性 CRSwNP，但由于例数较少，我们没有对嗜酸性 CRSwNP 和非嗜酸性 CRSwNP 的 5hmC 和 TETs 表达进行分组统计学分析。

已有研究表明 DNA 甲基化在 CRS 的息肉形成中有着重要的作用。Kidoguchi 等[13]发现，在 CRS 中 PLAT 基因近端启动子的 DNA 甲基化有助于息肉的形成。Li 等[14]研究发现，与 CRSsNP 相比，CRSwNP 中胸腺基质淋巴细胞生成素基因座的 DNA 甲基化水平显著增高。Zheng 等[15]通过 DNA 甲基化芯片鉴定了鼻息肉样品中表达显著改变的 4 个基因(COL18A1，EP300，GNAS 和 SMURF1)，发现上述基因的启动子都发生了甲基化。本研究发现，与 CRSsNP 组相比，CRSwNP 组的 TET1、TET2、TET3 和 5hmC 的表达均较低，因此 CRSwNP 中息肉的形成可能与 DNA 甲基化增加和去甲基化降低有关。结合文献及本研究结果提示，当 CRS 中 DNA 甲基化程度较高、DNA 去甲基化程度较低时疾病可能向 CRSwNP 发展，而当 DNA 甲基化程度较低、DNA 去甲基化程度较高时则可能发展为 CRSsNP。

目前的研究已经表明表观遗传学在 CRS 的发病机制中有着重要的作用，鼻息肉的形成与 DNA 甲基化有着紧密的联系。本研究也有着一定的局限性，实验中未对 CRSwNP 组、CRSsNP 组和对照组中 DNA 甲基化程度进行检测，未将 CRSwNP 组中的 2 种重要亚型嗜酸性 CRSwNP 和非嗜酸性 CRSwNP 进行对比研究。总之，本实验表明了 DNA 去甲基化可能与 CRS 的发病机制和鼻息肉的形成有关。但是关于 DNA 去甲基化相关的基因位点以及 DNA 去甲基化如何具体影响 CRS 发病的机制仍不清楚，亟待深入研究。

参考文献

[1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编委会，中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南[J]. 中华医学信息导报，2009，24(8)：21-22.

[2] Grgić MV，Ćupić H，Kalogjera L，et al. Surgical treatment for nasal polyposis：predictors of outcome[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol，2015，272(12)：3735-3743.

[3] Sreeparvathi A，Kalyanikuttyamma LK，Kumar M，et al. Significance of Blood Eosinophil Count in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis[J]. J Clin Diagn Res，2017，11(2)：MC08-MC11.

[4] Zahiruddin AS，Grant JA，Sur S. Role of epigenetics and DNA-damage in asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol，2018，18(1)：32-37.

[5] Kim JY，Kim DK，Yu MS，et al. Role of epigenetics in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Mol Med Rep，2018，17(1)：1219-1227.

[6] Zhang X，Biagini Myers JM，Yadagiri VK，et al. Nasal DNA methylation differentiates corticosteroid treatment response in pediatric asthma：A pilot study[J]. PLoS One，2017，12(10)：e0186150.

[7] 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.

[8] Martino D，Kesper DA，Amarasekera M，et al. Epigenetics in immune development and in allergic and autoimmune diseases[J]. J Reprod Immunol，2014，104-105：43-48.

[9] Wu X，Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation：mechanism，function and beyond[J]. Nat Rev Genet，2017，18(9)：517-534.

[10] Li H，Lu T，Sun W，et al. Ten-Eleven Translocation (TET) Enzymes Modulate the Activation of Dendritic Cells in Allergic Rhinitis[J]. Front Immunol，2019，10：2271-2271.

[11] Somineni HK，Zhang X，Biagini Myers JM，et al. Ten-eleven translocation 1(TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution[J]. J Allergy Clin Immunol，2016，137(3)：797-805. e5.

鼻中隔偏曲软骨塑形在同期歪鼻整形术中的应用

于湛[1]　孙海丽[1]　魏永祥[1]

［摘要］ **目的**:探讨利用自体鼻中隔偏曲软骨塑形后同期进行外伤性歪鼻矫形手术的临床应用价值。**方法**:选取 12 例临床确诊住院手术的陈旧外伤性歪鼻伴鼻中隔偏曲患者为研究对象,在内镜辅助下做鼻中隔鼻阈倒 L 切口,沿切口向上潜行分离建立鼻背畸形移植填充区;之后利用切取的鼻中隔软骨塑形后植入到偏曲凹陷的鼻背区加以歪鼻矫形,满意后行鼻外固定。**结果**:术后患者对手术效果满意。随访 1 年以上,未再次发生鼻塞、鼻中隔穿孔及鞍鼻畸形等并发症。**结论**:自体鼻中隔偏曲软骨塑形后同期进行外伤性歪鼻矫形手术方法简单,易操作,取材方便;既解决了鼻中隔偏曲影响鼻通气问题,同时也使歪鼻得以矫形。此方法适合广大基层医院推广应用。

［关键词］ 鼻中隔软骨;歪鼻;鼻整形
DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2021.01.014
［中图分类号］ R765.3　　［文献标志码］ A

Endoscopic assisted nasal septal deflection cartilage shaping for simultaneous rhinoplasty

YU Zhan　SUN Haili　WEI Yongxiang
(Capital Medical University Affiliated Beijing Anzhen Hospital Otorhinnolarygology Head and Neck Surgery,Beijing,100029, China)
Corresponding author: WEI Yongxiang, E-mail:weiyongxiang@vip.sina.com

Abstract　Objective: To investigate the clinical application value of orthopedic surgery for traumatic crooked nose after autologous nasal septum deflected cartilage shaping. **Methods**: Twelve patients with obsolete traumatic nasal septum deviation and nasal septum deviation were selected. The nasal septal nasal threshold inverted L incision was assisted by endoscopy, and the nasal dorsal deformity filling area was established along the incision. The excised nasal septal cartilage was shaped and implanted in the dorsal nasal area of the deviated depression to correct the nasal distortion, and the external nasal fixation was performed after satisfaction. **Results**: The patients were satisfied with the operation results. After a follow-up of more than 1 year, no complications occurred. **Conclusion**: This method is simple, easy to operate; solves the problem of nasal septum deviation affecting nasal ventilation, allows the deformed nose to be corrected. This method is suitable for popularization and application in the majority of grassroots hospitals.

Key words　septal cartilage; crooked nose; rhinoplasty

随着社会进步交通肇事风险增加,鼻外伤的发生率大大增加。鼻外伤后若不能及时处理易遗留歪鼻畸形[1-3],这不仅影响鼻面部美观,而且影响鼻腔通气引流功能。我科对 12 例外伤性歪鼻患者在内镜下同期行鼻中隔偏曲矫正术和歪鼻矫正术,均取得满意效果,现报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

收集我院耳鼻咽喉头颈外科中心 2016 年 1 月—2018 年 12 月期间收治住院手术的陈旧外伤性歪鼻并鼻中隔偏曲患者 12 例,所有患者均有不同程度的鼻腔通气功能障碍。其中男 11 例,女 1 例,年龄 20～35 岁,平均 25.8 岁。鼻外伤致歪鼻

[1]首都医科大学附属北京安贞医院耳鼻咽喉头颈外科中心(北京,100029)
通信作者:魏永祥,E-mail:weiyongxiang@vip.sina.com

[12] Shang Y,Das S,Rabold R,et al. Epigenetic alterations by DNA methylation in house dust mite-induced airway hyperresponsiveness[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2013,49(2):279-287.
[13] Kidoguchi M,Noguchi E,Nakamura T,et al. DNA Methylation of Proximal PLAT Promoter in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps[J]. Am J Rhinol Allergy,2018,32(5):374-379.
[14] Li J,Jiao J,Gao Y,et al. Association between methylation in nasal epithelial TSLP gene and chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Allergy Asthma Clin Immunol,2019,15:71-71.
[15] Zheng YB,Zhao Y,Yue LY,et al. Pilot study of DNA methylation in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Rhinology,2015,53(4):345-352.

(收稿日期:2020-01-07)