

Toll 样受体 -2 和血红素加氧酶 -1 在复发性鼻息肉中的表达及意义

张帆, 高竞逾, 阮标

(昆明医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究复发性鼻息肉组织中 TLR-2、HO-1 的表达和意义, 并探讨 2 者表达与鼻息肉复发的关系. **方法** 采用免疫蛋白印记技术, 检测复发性鼻息肉组 20 例组织、鼻息肉组 20 例组织及正常对照组 20 例钩突粘膜组织中 TLR-2、HO-1 蛋白表达情况, 并比较分析 2 者之间的关系. **结果** 复发性鼻息肉组织中 TLR-2、HO-1 的表达量与鼻息肉组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 鼻息肉组织中 TLR-2、HO-1 的表达量与正常鼻黏膜组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); TLR-2 和 HO-1 在各组的表达量存在明显的相关性 ($P < 0.05$). **结论** TLR-2、HO-1 在鼻息肉复发机制中发挥着重要作用, 2 者可能作为鼻息肉患者术后随诊和复发趋势判断的客观指标.

[关键词] Toll 样受体 -2; 血红素加氧酶 -1; 复发性鼻息肉

[中图分类号] R765.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 02 - 0044 - 04

Expression and Significance of Toll-like receptor-2 and Heme oxygenase-1 in Recurrent Nasal Polyps

ZHANG Fan, GAO Jing-yu, RUAN Biao

(Dept. of Otolaryngology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of TLR-2 and HO-1 in recurrent nasal polyps, and to discuss the relationship between the expression and the recurrence of nasal polyps. **Methods** The immune protein imprinting technology was used to detect the protein expression of TLR-2 and HO-1 in 20 cases of recurrent nasal polyps, 20 cases of nasal polyps and 20 cases of normal mucosal tissue in control group, and the relationship between the two proteins were analyzed. **Results** Expression levels of TLR-2 and HO-1 in the tissues of the recurrent nasal polyps had statistically significant difference with nasal polyps group ($P < 0.05$). Expression levels of TLR-2 and HO-1 in the tissues of the nasal polyps had statistically significant difference with normal nasal mucosa tissues ($P < 0.05$). The expression of TLR-2 and HO-1 had significant correlation in each group ($P < 0.05$). **Conclusion** TLR-2 and HO-1 plays an important role in the recurrence mechanism of nasal polyps, and both of them may be as objective indicators for postoperative follow-up of patients with recurrent nasal polyps and judging the recurrent trend.

[Key words] Toll-like receptor-2; Heme oxygenase-1; Recurrent nasal polyps

鼻息肉是一种耳鼻咽喉科常见、多发病, 被公认为是一种多致病因素导致的疾病实体, 但是对鼻息肉复发机制的相关研究国内外少见文献报道. 既往认为获得性免疫介导的免疫应答在鼻息

肉发病中起着重要的作用. 近年的研究表明先天性免疫具有重要的特异性分辨病原体自身的能力, 同样可能导致鼻息肉发病^[1]. 先天性免疫系统对病原体的识别涉及模式识别受体 (pattern recognition

[基金项目] 云南省卫生科技计划基金资助项目 (2010NS034)

[作者简介] 张帆 (1978~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉科临床工作.

[通讯作者] 阮标. E-mail: ynent@163.com

receptors, PRRs) 和病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 的相互作用. PRRs 以可溶、跨膜或细胞溶质的形式存在, 主要以调理素或信号分子的形式发挥作用, 最具有广泛特征性的跨膜 PRRs 是 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs). TLRs 是否与鼻息肉复发相关, 目前尚未见报道. 本研究利用免疫蛋白印迹检测复发性鼻息肉、鼻息肉及正常钩突粘膜中 TLR-2、HO-1 的表达情况, 探讨二者在复发性鼻息肉中的表达和意义, 为进一步研究提供基础.

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2011 年 1 月至 2013 年 1 月收集昆明医科大学第一附属耳鼻咽喉科住院 FESS 手术行鼻息肉切除的患者以及行脑脊液鼻漏修补、鼻中隔偏曲矫正的患者. 全部患者均排除变应性鼻炎、支气管哮喘、阿司匹林三联征、免疫功能缺陷、原发性纤毛运动功能障碍和囊性化纤毛, 并且术前至少 2 周内均未用皮质类固醇、抗组胺药、抗白三烯药及抗生素; 全部患者均排外明显的解剖变异, 如中鼻甲骨质增生、泡性改变、反向中鼻甲和下鼻甲肥厚、骨质增生, 以及钩突、筛泡等形态发育异常. 复发性鼻息肉组 20 例, 男 11 例, 女 9 例, 年龄 18~54 岁, 入选标准: 有至少 1 次鼻息肉前期手术史; 全身或鼻腔局部类固醇药物治疗有效; 治疗标准周期过后, 一般 6 个月以上再发生鼻息肉. 鼻息肉组 20 例, 男 13 例, 女 7 例, 年龄 20~59 岁. 以上 2 组患者所有患者根据症状、体征及 CT 检查排除鼻腔鼻窦的其它疾病. 病情严重程度视觉模拟量表 (visual analogue scale, VAS) 评分 > 5 分, Lund-Kennedy 内镜黏膜形态评分系统病变单侧评分 3~6 分, Lund-Mackay 鼻窦 CT 扫描病变范围评分系统病变单侧评分 2~6 分; 术后病检为鼻息肉. 正常鼻黏膜组 20 例, 男 13 例, 女 7 例, 年龄 18~57 岁, 入选标准: 需要进行单纯鼻中隔偏曲矫正术或单纯脑脊液鼻漏修补术患者; 所有患者根据症、状体征及 CT 检查排除慢性鼻窦炎或鼻腔鼻窦的其它疾病, 术中取钩突粘膜或中鼻甲粘膜, 病检为正常鼻黏膜组织. 所有标本取材后用生理盐水反复清洗, 去除粘液和血液, 然后用滤纸吸干表面粘附的水分, 迅速将样本 1 半切成小块 (3~5 mm³) 置入冻存管中, 立即放入液氮罐内, 然后置 -80℃ 冰箱冷冻保存.

1.2 研究方法

免疫蛋白印迹: PVDF 膜购于 Millipore 公司; 一抗购于 EPITMICS、ProteinTech; 羊抗兔二抗 IgG-HRP 购于 Invitrogen 公司; ECL 显色试剂盒购于 Bio-rad 公司. 标本组织总蛋白提取, 取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度. 取适量上清加入 1/5 体积 5×SDS 上样缓冲液, 沸水煮 10 min, 液体呈清亮; 浓缩胶电压 80 V; 分离胶电压 140 V; 将稍大的 3 层滤纸放在最下层, 对齐后用玻棒滚去气泡, 保持湿润, 将膜放在滤纸上, 一次性将胶放在膜上, 最后放上等大小的 3 层滤纸, 再用玻璃棒滚去气泡, 20 V 电压转膜 60 min; 转膜结束后, 将 PVDF 膜在清水中浸润后, 放在 37℃ 温箱中将膜干燥, 将蛋白固定在 PVDF 膜上. 将已烘干 PVDF 膜在 100% 的甲醇中浸润, 然后在双蒸水中浸泡; 在温箱中烘干的膜在 100% 的甲醇中浸润, 然后在双蒸水中冲洗一下, 漂洗后放在含有 5% 的脱脂奶粉的封闭液中, 室温封闭过夜. 封闭结束后, 用 TBS-T, 室温漂洗 3 次, 每次 10 min; 一抗孵育: 将一抗用稀释剂 (TBS-T+1% 脱脂奶粉) 以 1:500~1:1 000 稀释, 4℃ 孵育过夜; 用 TBS-T 洗液洗膜 3 次, 每次 10 min; 二抗孵育: 将二抗用稀释剂 (TBS-T+1% 脱脂奶粉) 以 1:5 000 稀释, 室温孵育 1 h; 用 TBS-T 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL Plus 显色试剂配制: 等体积的 A 液与 B 液混匀; 于 Bio-Rad 膜成像系统下显色成像并拍照.

1.3 结果判断

用 Image J 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化, 记录每条条带的吸光度值, 除以相同来源的总蛋白质中的 β -actin 的条带的吸光度值, 进行半定量测定. 吸光度比值越大, 说明蛋白表达量越高.

1.4 统计学处理

实验结果为计量资料, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 采用多样本间单因素方差分析和 SNK-q 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义. 采用 Pearson 直线相关分析判断 TLR-2 和 HO-1 在各组中的表达有无相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 总蛋白浓度的测定

分别抽提各组各标本的总蛋白后, 用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定抽提蛋白的浓度, 将各标准管在波长 562 nm 吸光值对其浓度 ($\mu\text{Lg/mL}$) 做图绘

制标准曲线 $Y = 0.23 + 0.001X$, $R^2 = 0.98$. 使用标准曲线分别定量待测样品蛋白浓度.

2.2 免疫蛋白印迹

3 组实验对象的鼻黏膜中均有不同程度的 TLR-2 和 HO-1 表达, 见表 1. 各组间假设检验的两两比较结果 ($P < 0.05$), 结果显示: 复发性鼻息肉组织中 TLR-2、HO-1 的表达量与鼻息肉组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 鼻息肉组织中 TLR-2、HO-1 的表达量与正常鼻黏膜组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 电泳照片, 见图 1, 显示了同样的变化.

2.3 相关性分析结果

用 Pearson 直线相关分析发现, 在正常鼻黏膜组、单纯鼻息肉组、RNP: 复发鼻息肉组中 TLR-2 和 HO-1 表达呈正相关 ($P < 0.05$), 结果见图 2

3 讨论

Toll 样受体 -2 (Toll-like receptor-2, TLR-2) 是 TLRs 家族中表达范围最广、识别病原微生物及其产物的种类最多的 1 个亚型, 是革兰阳性菌的天然模式识别受体^[2], 可识别革兰阳性菌细胞壁成分. 活化的 TLR-2 通过, TLRs-MyD88-IRAK-

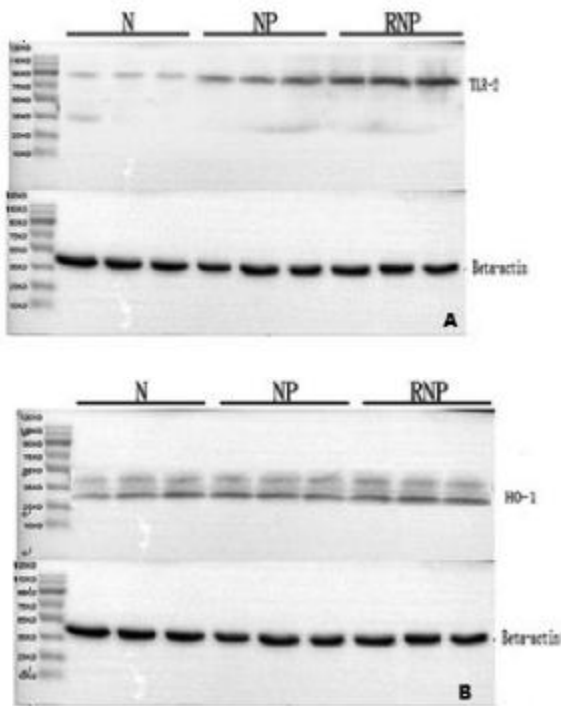


图 1 TLR-2 和 HO-1 免疫蛋白印迹电泳图

Fig. 1 TLR-2 and HO-1 western blotting electrophoretogram

A:TLR-2 蛋白的表达; B:HO-1 蛋白的表达,

N: 正常鼻黏膜组; NP:单纯鼻息肉组, RNP: 复发鼻息肉组.

表 1 3 组中 TLR2 和 HO-1 蛋白质免疫印迹灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Three groups of TLR2 and HO - 1 protein immunoblot grey value ($\bar{x} \pm s$)

组 别	TLR-2	HO-1
N 组	0.39 ± 0.07	0.48 ± 0.14
NP 组	0.61 ± 0.16	0.64 ± 0.12
RNP 组	1.51 ± 0.27	1.58 ± 0.31

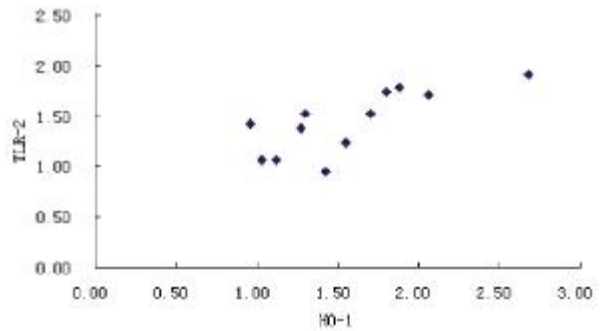


图 2 TLR-2 和 HO-1 在复发性鼻息肉组织中表达相关性散点图

Fig. 2 Scatter plot of TLR-2 and HO-1 expression correlation in the recurrent nasal polyps

NF- κ B 信号转导通路介导黏膜的先天性免疫反应, 该通路最终激活 NF- κ B. NF- κ B 是参与许多与炎症反应有关的基因的表达调控, 是炎症反应的核心调节因子^[3], 并且在机体的免疫应答、细胞生长等方面发挥重要作用. 研究表明 NF- κ B 在鼻息肉发病过程中起关键作用^[4], NF- κ B 表达增强几乎可以作为判断鼻息肉发病的标志^[5].

本研究中, 息肉组织中 TLR-2 的表达量与正常鼻黏膜组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与之前相关研究结果相符. 复发性鼻息肉组织中 TLR-2 的表达量与鼻息肉组织相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 TLR-2 与鼻息肉复发可能有密切关系, 并与其严重程度有关^[6]. 研究发现 TLRs 在上呼吸道粘膜高表达可能是重要的免疫前哨反应. TLRs 及其传导通路在慢性鼻窦炎鼻息肉组织与正常鼻黏膜中的表达存在差异^[1]. 鼻息肉复发可能的机制是鼻黏膜受病原体侵袭或黏膜纤毛的损伤、细菌感染、病毒感染、过敏反应等理化因素刺激引起炎症后, 黏膜上皮和腺上皮的 TLR-2 识别革兰阳性菌, 启动了先天性免疫防御反应 TLRs-MyD88-IRAK-NF- κ B 信号转导通路, 激活鼻黏膜上皮中的 NF- κ B 导致嗜酸性粒细胞的聚集, 引起鼻息肉复发. 先天性免疫的激活对于抗体特异性获得性免疫是至关重要的一个步骤, 在鼻息肉复

发过程中获得性免疫较可能同样扮演更重要的作用,具体机制有待证实。

另外,近年来提出的细菌超抗原假说表明金葡菌肠毒素可能发挥着超抗原作用,在鼻腔局部与T淋巴细胞结合,大量活化T淋巴细胞,使嗜酸粒细胞大量聚集、黏膜浸润,可能是鼻息肉复发的因素之一。有研究发现^[7],金黄色葡萄球菌超抗原在慢性鼻窦炎的息肉组织中有较高的检出率达54.76%。以上研究都支持金葡菌肠毒素的超抗原作用,可能是导致鼻息肉发生的原因。大量研究结果^[8]显示与抗感染免疫相关的TLR-2在鼻息肉组织中广泛表达,以及本研究结果从全新的角度证明了感染相关因素在鼻息肉复发中可能起重要作用。体外研究显示^[9],重组金黄色葡萄球菌杀白细胞毒素(外毒素)长时间作用后均可致肺泡巨噬细胞TLR-2表达上调,可能是金黄色葡萄球菌感染引起重症坏死性肺炎或者慢性迁延感染的原因。鼻息肉的复发是否也是由于细菌超抗原激活TLR-2后,而引起其信号转导通路传导,最终激活NF- κ B使EOS聚集,从而导致鼻息肉复发,具体机制有待做进一步研究。

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是一种血红素代谢的限速酶,血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)为诱导型,即热休克蛋白32(HSP32),是人体一种最易被诱导的抗氧化的内源性保护蛋白质,其主要生物学功能包括抗氧化、抗炎症、抗细胞增殖、抗细胞凋亡、调节免疫及维持微循环等。HO-1生理状态下在网状内皮细胞系统和骨髓表达,肝、脾、心血管中高表达,在其余系统呈低水平表达,可被多种物质或刺激因素诱导表达,使细胞内HO-1激活导致表达上调可增加约100倍^[10],可能是细胞对抗应激反应的重要组成部分。

本研究中,息肉组织中HO-1的表达量与正常鼻黏膜组织相比差异有统计学意义($P < 0.05$),与之前相关研究结果相符。复发性鼻息肉组织中TLR-2的表达量与鼻息肉组织相比差异有统计学意义($P < 0.05$),表明TLR-2与鼻息肉复发可能有密切关系,并与其严重程度有关。HO-1适量表达可以减轻细胞损伤,具有保护作用,HO-1过度表达时时,会促进乳酸脱氢酶的释放和降低谷胱苷肽转移酶含量,破坏细胞膜完整性。HO-1的表达增强还同时被发现多种肿瘤细胞中^[11-13]。Halina Was等^[14]发现HO-1在肿瘤细胞中的表达上调,通过增加肿瘤细胞的增殖、抗氧化应激能力,促进新生血管形成和迁移能力,提示HO-1表达

上调可能与肿瘤复发有关。Bussolati等^[15]研究发现慢性炎症时,HO-1发挥着双重作用,其一是抑制白细胞浸润从而发挥抗炎作用,其二是促进内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)源性的非炎性血管生成,使组织更易受到损伤。临床研究发现^[16],HO-1和VEGF的高表达可能与心脏性猝死有一定关系。HO-1通过促进VEGF表达促进血管生成,从而影响肺癌生长及转移^[17]。动物实验研究发现^[18],HO-1促进大鼠70%肝脏切除后再生的机制可能与VEGF表达升高有关。VEGF通过在鼻息肉组织中过度表达促进息肉组织内的血管增殖和炎性细胞聚积,促进鼻息肉的发生发展^[19]。结合本研究结果,过表达的HO-1在鼻息肉复发中可能不仅仅限于保护作用,还可以通过与VEGF作用促进非炎性血管生成,使组织更易受到损伤,从而导致鼻息肉的复发。

HO-1和TLR-2/4在直肠癌组织中高表达且呈正相关,提示参与直肠癌的发生、发展^[20]。而本研究中复发性鼻息肉组织中TLR-2、HO-1的表达量与鼻息肉组织相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且成正相关,存在两者协同作用还是其他作用,有待进一步研究证实。结合本实验结果,TLR-2、HO-1可能作为鼻息肉患者术后随诊和判断复发的客观指标。

[参考文献]

- [1] 王鑫,赵春源. Toll样受体及其传导通路在慢性鼻窦炎鼻息肉中的表达[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009,12(3):1 059-1 062.
- [2] TAKEDA K,KAISHO T,HKIRA S.Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol,2003,21(2):335-376.
- [3] MONACO C,PALEOLOG E. Nuclear factor kappaB:a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis[J]. Cardiovasc Res,2004,61(4):671-682.
- [4] SHIN S H,YE M K,KIM J K,et al.Bee venom at different concentrations modulates the aeroallergen-induced activation of nasal polyp epithelial cells[J]. Pharmacology, 2013,32(1-2):39-47.
- [5] VALERA F C,UMEZAWA K,BRASSESCO M S,et al. Suppression of inflammatory cytokine secretion by an NF- κ B inhibitor DHMEQ in nasal polyps fibroblasts[J]. Cell Physiol Biochem,2012,30(1):13-22.
- [6] 刘火旺,孙虹. 复发性鼻息肉分子标志物筛选及其意义[D]. 长沙:中南大学博士学位论文,2009.
- [7] 王明明,张大良. 金葡菌超抗原与慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉发生、发展及复发的相关性研究[D]. 济南:山东大

(下转第66页)

使用短效 GnRH-a 时, 当达到垂体降调标准后, 将达菲林减为半量有利于改善 IVF 的助孕结局。

综上所述, 短效达菲林能够达到和长效制剂相似的垂体降调节效果, 而促性腺激素用量更少, 使用更灵活, 值得在临床上推荐使用。

[参考文献]

- [1] DAL PRATO L, BORINI A, TREVISI M R, et al. Effect of reduced dose of triptorelin at the start of ovarian stimulation on the outcome of IVF: a randomized study [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(7): 1 409 - 1 414.
- [2] 栗好, 黄筱金. 长效和短效达菲林对垂体降调节的作用及对体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. *实用临床医学*, 2010, 11(6): 5 - 8.
- [3] 张春晖, 马从顺, 张澍琛, 等. 低剂量长、短效达菲林在控制性超促排卵中的疗效比较 [J]. *生殖与避孕*, 2010, 30(2): 105 - 108.
- [4] FABREGUES F, PENARRUBIA J, CREUS M, et al. Effect of halving the daily dose of triptorelin at the start of ovarian stimulation on hormone serum levels and the outcome of in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(3): 785 - 788.
(2013 - 12 - 19 收稿)
- (上接第 47 页)
- 学 博士学位论文, 2007.
- [8] 游学俊, 陆翔. Toll 样受体在慢性鼻窦炎及鼻息肉中表达的差异 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科*, 2007, 5(5): 345 - 349.
- [9] 吴本权, 石云, 锋黄静. 重组金黄葡萄球菌杀白细胞毒素体外对人肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 2 表达的影响 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2009, 29(11): 1 008.
- [10] WONG R J, VREMAN H J, SCHULZ S, et al. In vitro inhibition of heme oxygenase isoenzymes by metalloporphyrins [J]. *J Perinatol*, 2011, 31(1): 35 - 41.
- [11] CHOW J M, HUANG G C, LIN H Y, et al. Cytotoxic effects of metal protoporphyrins in glioblastoma cells: roles of albumin, reactive oxygen species, and heme oxygenase-1 [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 177(2): 97 - 107.
- [12] ZOU C, ZHANG H, LI Q, et al. Heme oxygenase-1: a molecular brake on hepatocellular carcinoma cell migration [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(12): 1 840 - 1 848.
- [13] YERLIKAYA A. Expression of heme oxygenase-1 in response to proteasomal inhibition [J]. *Protein Pept Lett*, 2012, 19(12): 1 330 - 1 333.
- [14] WAS H, CICHON T, SMOLARCZYK R, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma [J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169(6): 12 181 - 12 198.
- [15] BUSSOLATI B, MASON J C. Dual role of VEGF-induced hemeoxygenase-1 in angiogenesis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(7-8): 1 153 - 1 163.
- [16] XU WEIWEI, YANG YUN H U. Expressions of HO-1 and VEGF in patients of sudden cardiac death and their significances [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 6(11): 1 114 - 1 117.
- [17] 薛涛, 张启瑜. 血红素加氧酶-1 (HO-1) 对大鼠肝大部切除后再生的实验观察 [D]. 温州: 温州医学院硕士学位论文, 2011.
- [18] 王淑云, 王玲. 血红素加氧酶-1 在人肺癌细胞中的表达及其对血管生成因子的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49(12): 21 - 25.
- [19] 高英, 潘新良. 血管内皮生长因子在鼻息肉组织中的表达和意义 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 22(2): 150 - 152.
- [20] 田飞, 张黎, 郭琼行, 等. 血红素加氧酶-1 及 Toll 样受体 2/4 在直肠癌组织中的表达及意义 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2008, 11(3): 248 - 250, 254.
(2014 - 01 - 05 收稿)