

· 基础研究 ·

Survivin 在鼻息肉组织中的表达及与嗜酸性粒细胞浸润相关性的研究

林 海¹, 林 董², 陈贤明¹, 张 贤¹

(1. 南京军区福州总医院耳鼻咽喉头颈外科, 福建 福州 350025; 2. 福建师范大学福清分校 生物与化学工程系, 福建 福清 350300)

摘 要: 目的 研究生存素(Survivin)在鼻息肉组织中的表达及其与嗜酸性粒细胞浸润的相关性,探讨Survivin在鼻息肉发病过程中的作用。方法 收集28例鼻息肉组织(鼻息肉组)和12例正常下鼻甲组织(对照组),用HE染色法观察组织中的嗜酸性粒细胞浸润情况,免疫组化法检测组织中Survivin的表达。结果 ①HE染色显示鼻息肉组嗜酸性粒细胞浸润显著增加。②免疫组织化学染色显示Survivin免疫阳性细胞数及着色强度均明显高于对照组,图像分析显示,鼻息肉组Survivin的积分光密度(IOD, $10^3/\text{HP}$)为 50.21 ± 6.32 ,与对照组 5.67 ± 0.58 相比有统计学意义($P < 0.05$)。③Spearman等级相关分析显示,鼻息肉中Survivin表达与嗜酸性粒细胞浸润表达密切相关($r = 0.673$, $P < 0.01$)。结论 鼻息肉组织中Survivin表达、嗜酸性粒细胞浸润均上调,且二者有协同表达关系。鼻息肉可能是通过凋亡抑制基因Survivin使炎性细胞凋亡受到抑制,从而促进炎性细胞主要是嗜酸性粒细胞浸润生长,导致慢性炎症反应。

关 键 词: 鼻息肉;生存素;嗜酸性粒细胞

中图分类号: R765.25

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)02-0095-05

Survivin expression and eosinophil infiltration in nasal polyp and their correlation

LIN Hai, LIN Dong, CHEN Xian-ming, et al.

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command of the PLA, Fuzhou 350025, China)

Abstract: **Objective** To study Survivin expression and eosinophil infiltration in nasal polyp and their correlation, and to explore the role of Survivin in the pathogenesis of nasal polyp. **Methods** 28 cases of nasal polyp and 12 cases of normal inferior turbinate mucosa were enrolled in this study. Immunohistochemistry method for Survivin and HE staining for eosinophils were performed in these two groups. **Results** ① The number of eosinophil in the nasal polyp was higher than that in the control group by HE staining. ② The number and intensity of positive stained cells of Survivin in nasal polyp were higher than those in the control group. Image analysis showed that IOD of Survivin ($10^3/\text{HP}$) in the nasal polyp was 50.21 ± 6.32 while that of the control group was 5.67 ± 0.58 . The differences between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). ③ Spearman correlation test showed that there was a close correlation between Survivin expression and eosinophil infiltration in nasal polyp ($r = 0.673$, $P < 0.01$). **Conclusion** Both Survivin and eosinophil are over expressed in nasal polyp with close correlation. Survivin can inhibit apoptosis of inflammatory cells including

eosinophil to promote infiltration and growth of inflammatory cells, therefore lead to the chronic inflammatory reaction in nasal polyp.

Key words: Nasal polyp; Survivin; Eosinophile granulocyte

鼻息肉是一种常见病,其发病率及复发率均较高,是目前鼻科治疗的难点。鼻息肉是由局部微环境中各种生长因子和细胞因子调控的自身延续的炎性反应的产物,其发生发展过程涉及到复杂的慢性炎症反应,其确切病因和病理生理过程仍未明确^[1]。目前已有研究显示,鼻息肉病理学特征之一是组织中炎性细胞,主要是嗜酸性粒细胞浸润增多,嗜酸性粒细胞在局部的渗出和聚集对鼻息肉的发生和发展起了重大作用^[2]。鼻息肉中炎性细胞浸润的病理性增多及其在干预治疗作用下的减少,可能与细胞凋亡过程受到影响有关,鼻息肉可能是炎性细胞产生和死亡的自身平衡紊乱的表现^[3]。Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白,在肿瘤组织中普遍高表达,在增殖性良性病变组织中亦有不同程度表达^[4,5]。本研究以免疫组化技术检测鼻息肉组织中的Survivin表达,采用HE染色法检测鼻息肉组织中嗜酸性粒细胞的浸润情况,并进行相关性分析,试图探讨Survivin在鼻息肉炎症形成以及发生发展过程中的作用,进一步加深对鼻息肉发病机制的了解。

1 材料与方法

1.1 研究对象

28例鼻息肉组织(鼻息肉组)源自我科住院手术治疗的鼻息肉患者,并排除变应性鼻炎、哮喘及全身疾病史,其中男18例,女10例;年龄15~60岁,平均年龄35.8岁。按1997年海口标准^[6]分型:Ⅱ型2期9例,Ⅱ型3期11例,Ⅲ型8例。12例正常下鼻甲黏膜组织(对照组)源自同一时期手术治疗的鼻中隔偏曲患者,并排除慢性鼻炎鼻窦炎、变应性疾病及全身疾病史,其中男7例,女5例;年龄17~45岁,平均年龄32.5岁。所有研究对象术前1个月未用免疫抑制剂、激素类以及抗组胺类药物。所有标本均于手术中取材,用10%甲醛固定,按

常规制成石蜡块保存。

1.2 研究材料

兔抗人Survivin多克隆抗体购自福州迈新公司,Elivison Plus免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,一抗工作液浓度为1:100。图像分析软件(Image Pro Plus 6.0)为Media Cybernetics公司产品。

1.3 研究方法

首先取石蜡块连续切片,制成4 μm厚的石蜡切片。每份标本分别行HE染色及Elivison Plus免疫组化染色。石蜡切片脱蜡和水化后,pH7.4 PBS冲洗(3 min × 3),然后用枸橼酸盐缓冲液高温高压修复抗原,再滴加3% H₂O₂,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS冲洗(3 min × 3)。滴加50 μl一抗,室温下孵育60 min,PBS冲洗(5 min × 3)。然后滴加50 μl聚合物增强剂(试剂A),室温下孵育20 min,PBS冲洗(3 min × 3)。接着滴加50 μl酶标抗鼠/兔聚合物(试剂B),室温下孵育30 min,PBS冲洗(3 min × 3)。滴加DAB显色液显色3~10 min,镜下观察,阳性显色为棕黄色或红色。苏木精复染,0.1% HCl分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后观察。用已知阳性片(迈新公司提供)作阳性对照,用PBS取代一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

石蜡切片常规HE染色,随机观察10个高倍视野(×400),手工计数鼻息肉组织和下鼻甲黏膜组织的嗜酸性粒细胞数,其平均值为该标本嗜酸性粒细胞浸润数。Survivin以胞浆或胞核出现棕黄染色为阳性细胞。应用图像分析软件(Image Pro Plus 6.0)测定阳性表达总的积分光密度(integrated optical density, IOD)值,每个标本分别取2张切片,每张切片上随机取5个高倍视野(200倍),取其平均值。

1.5 统计处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两独立样本进行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异为有统计学意义。相关分析用 Spearman 相关检验,结果以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻息肉组织嗜酸性粒细胞浸润情况

HE 染色镜检显示鼻息肉组黏膜下可见不同程度的嗜酸性粒细胞浸润,嗜酸性粒细胞个体较大,细胞核呈分叶双核特征,典型者呈熊猫眼征,胞浆呈深橘红色,其中充满粗大的深红色颗粒,主要分布在黏膜上皮、腺体及小血管周围(图 1~3)。

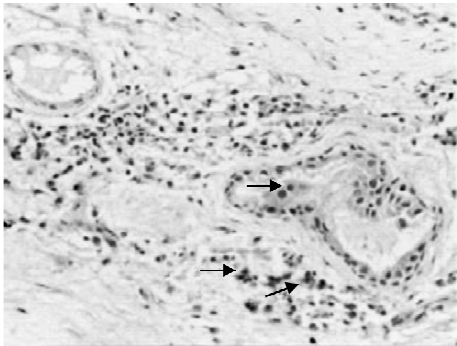


图 1 鼻息肉组织中上皮间质极度水肿,伴有少数分散的腺体,可见较多嗜酸性粒细胞浸润(HE 染色,×200)

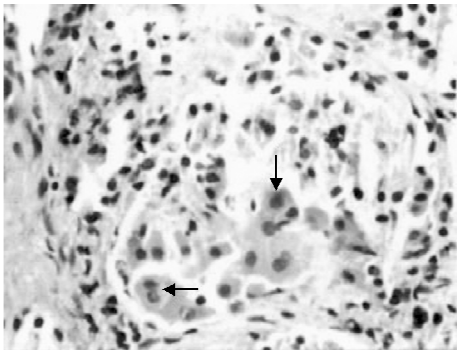


图 2 鼻息肉组织中嗜酸性粒细胞个体较大,细胞核呈分叶双核特征,典型者呈“熊猫眼”征,胞浆呈深橘红色,其中充满粗大的深红色颗粒(HE 染色,×400)

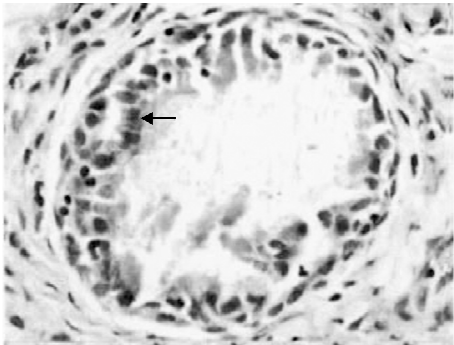


图 3 鼻息肉组织中浆液性腺体腺腔扩大,腺体内皮细胞多呈嗜酸性改变(HE 染色,×400)

2.2 Survivin 在鼻息肉中的阳性表达

免疫组化结果显示 Survivin 阳性信号主要位于胞浆,为棕黄或棕褐色颗粒,偶见于胞核,主要表达于鼻息肉组织表面黏膜上皮细胞、黏膜下腺体内皮细胞以及炎性细胞,鼻息肉组 Survivin 阳性表达细胞数明显多于对照组,且阳性表达强度高(图 4~6)。

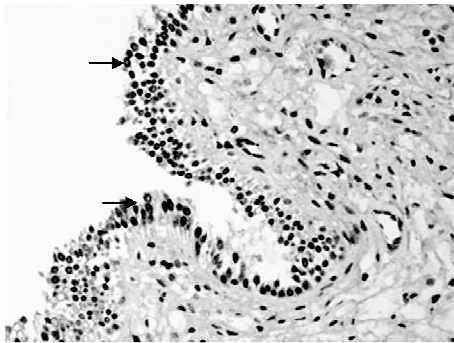


图 4 鼻息肉组织中 Survivin 阳性信号表达(免疫组化 Elivison,×200)

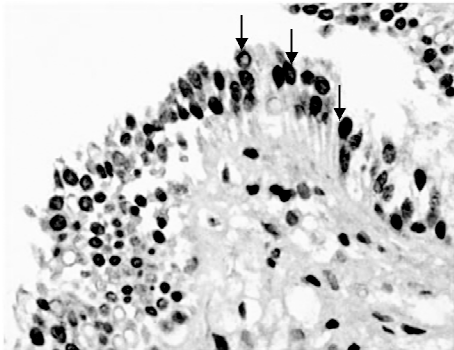


图 5 局部放大后可见鼻息肉表面黏膜上皮细胞中 Survivin 阳性信号表达主要位于胞浆(免疫组化 Elivison,×400)

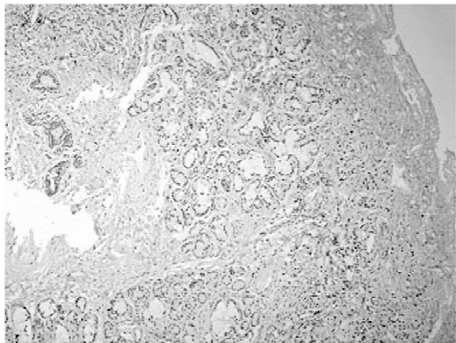


图 6 正常下鼻甲组织中 Survivin 阴性表达 (免疫组化 Elivison, ×100)

2.3 鼻息肉组及对照组中嗜酸性粒细胞和 Survivin 积分光密度比较 (表 1)

HE 染色显示:鼻息肉组平均嗜酸性粒细胞浸润数 (1/HP) 为 25.10 ± 5.67 , 与对照组 2.35 ± 0.56 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。图像分析显示:鼻息肉组 Survivin 的积分光密度为 50.21 ± 6.32 , 与对照组 5.67 ± 0.58 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Spearman 等级相关分析显示,鼻息肉中 Survivin 表达与嗜酸性粒细胞浸润密切相关 ($r = 0.673, P < 0.01$)。可见鼻息肉组织中 Survivin 表达增高、嗜酸性粒细胞浸润增加,且二者有协同表达关系。

表 1 两组中嗜酸性粒细胞浸润和 Survivin 阳性表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	嗜酸性粒细胞数 (1/HP)	Survivin IOD 值 (10^3 /HP)
鼻息肉组	28	$25.10 \pm 5.67^*$	$50.21 \pm 6.32^{**}$
对照组	12	2.35 ± 0.56	5.67 ± 0.58

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$; ** 与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

鼻息肉发病机制目前尚未完全明确。Bernstein 等^[7]近年来经过研究提出多种因素发病学说:鼻腔外侧壁的空气动力学变化、细菌、病毒以及变应性疾病等多种因素作用于鼻腔外侧壁黏膜,引起黏膜炎症反应,开始上皮破裂、黏膜疝出、再上皮化、新腺体形成、鼻息肉形成。此时,鼻息肉组织中的

上皮细胞、成纤维细胞等开始合成分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF),继而促进组织内炎性细胞,主要是嗜酸性粒细胞集聚及分泌多种炎性介质,这些介质在鼻息肉的形成过程中协调统一的发挥着作用,最终导致进入细胞及间质的水分增多,细胞及间质水肿,使鼻息肉组织得以维持并增长。

凋亡蛋白抑制因子 Survivin 是 1997 年由耶鲁大学 Ambrosini 等^[8]用效应细胞蛋白酶受体-1 (effector cell protease receptor-1) 的 cDNA 在人类基因组文库中筛选克隆出的,因其可以延长细胞的生存,故又名生存素。Survivin 是凋亡抑制基因 (IAPs) 家族新成员,是 IAP 家族中最小的成员。位于染色体 17q25 区带上,编码含 142 个氨基酸组成的分子量约 16.5 kD 的蛋白质。生存素分子有 3 个独立且化学性质不同的表面,分别为 BIR 结构中的酸性区域、基础区域及 α 螺旋结构,仅含有杆状病毒 IAP 重复序列功能区,无环指结构,较为独特。这样的结构有助于与其他蛋白质的相互作用^[9-10]。Survivin 能抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,是迄今发现的最强凋亡抑制基因,主要以细胞周期依赖的方式在细胞增殖周期 G_2/M (有丝分裂期) 发挥作用,细胞的过度表达可克服凋亡的检查点而获得增殖潜能。此外,还可通过抑制细胞色素 C 自线粒体释放参与抗凋亡,因而其具有较强的抗凋亡作用。多项研究表明,生存素能抑制各种凋亡诱导因子所诱导的细胞凋亡^[11-12]。

我们的实验结果分析发现:与对照组比较,鼻息肉组织中 Survivin 呈高表达状态,而且主要表达于鼻息肉组织表面黏膜上皮以及炎性细胞的胞浆或胞核,嗜酸性粒细胞浸润数量也明显增多,且二者有协同表达关系,说明此时鼻息肉中的黏膜上皮细胞、黏膜下腺体内皮细胞以及炎性细胞主要是嗜酸性粒细胞凋亡可能受到抑制,再在各种细胞因子与炎症介质的协同作用下,促进黏膜上皮细胞增生、腺体扩大及炎性细胞浸润生长,从而趋化嗜酸性粒细胞,导致嗜酸性粒细胞浸润数量上调,从而减缓炎症消退,导致一种慢性炎症反应,并且进入组织细胞及

间质的水分增多,导致细胞及间质水肿,所以我们认为 Survivin 介导的凋亡抑制现象可能在鼻息肉形成过程中具有一定的作用。

参考文献:

- [1] Newton JR, Ah-See KW. A review of nasal polyposis [J]. Ther Clin Risk Manag, 2008, 4(2): 507-512.
- [2] 王天生,孙虹,陈江波,等.鼻息肉中 MMP-9 和 NF- κ B 的表达研究[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2004, 10(2): 80-82.
- [3] Saunders MW, Wheatley AH, George SJ, et al. Do Corticosteroids Induce Apoptosis in Nasal Polyp Inflammatory Cells? In Vivo and Vitro Studies [J]. Laryngoscope, 1999, 109(5): 785-790.
- [4] Andersen MH, Svane IM, Becker JC, et al. The universal character of the tumor-associated antigen survivin [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(20): 5991-5994.
- [5] Joseph B, Letizia S, Grisaru D, et al. Survivin expression in the ureteral wall of high degree vesicoureteral reflux in children [J]. Int Urol Nephrol, 2007, 39(1): 79-83.
- [6] 中华医学会耳鼻咽喉分会.慢性鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及内窥镜鼻窦手术疗效评定标准(1997年,海口)[J].中华耳鼻咽喉杂志,1998,33(3): 134-135.
- [7] Bernstein JM, Gorfien L, Noble B. Role of allergy in nasal polyposis: a review [J]. Otolarygol Head Neck Surg, 1995, 113(7): 24-32.
- [8] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene survivin expressed in cancer and lymphoma [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [9] Liang X, Da M, Zhuang Z, et al. Effects of Survivin on cell proliferation and apoptosis in MG-63 cells in vitro [J]. Cell Biol Int, 2009, 33(1): 119-124.
- [10] Zhang YC, Gao J, Xin T, et al. Expression of survivin in invasive pituitary adenoma [J]. Saudi Med J, 2008, 29(11): 1589-1592.
- [11] Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, et al. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(79): 2040-2044.
- [12] Liu J, Enomoto S, Lancto CA, et al. Inhibition of apoptosis in Cryptosporidium parvum-infected intestinal epithelial cells is dependent on survivin [J]. Infect Immun, 2008, 76(8): 3784-3792.

(修回日期:2010-01-25)

· 消息 ·

关于召开 2010 年第五届全国鼻窦及 颅底内镜微创外科新技术学习班通知

为进一步提高我国鼻相关颅底疾病及侧颅底疾病的治疗水平,规范和探索鼻-颅底外科疾病的内镜手术指征和相关手术入路,树立正确的微创理念,推动鼻颅底外科学的发展,中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科、中国耳鼻咽喉颅底外科杂志社、新疆维吾尔自治区人民医院耳鼻咽喉头颈外科及新疆维吾尔自治区人民医院神经外科将联合拟定于2010年9月8~15日在新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市举办第五届全国鼻窦及颅底内镜微创外科新技术学习班(全国I级继续医学教育项目 学分10分)。届时将邀请国内颅底外科领域的知名专家授课,内容涵盖了鼻窦及颅底相关疾病诊治最新进展,相关内镜颅底解剖学和鼻颅底影像学、手术入路设计及手术技巧、并发症的预防及处理对策等。整个课程的设置突出临床实用性,希望能通过系统的学习,经验交流,使大家可以提高手术技术、拓展对相关疾病的认识。

学习班注册费:1000元/人,安排食宿,费用自理。

报到时间:2010年9月8日

学习地点:新疆乌鲁木齐市君邦天山大酒店(乌鲁木齐市天山区龙泉街68号)。

联系方式:①湖南省长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科、中国耳鼻咽喉颅底外科杂志社,邮政编码:410008。联系人:章华(15874182329);李惠清(13786192269)。电话(传真):0731-84327469;邮箱:entxy@126.com;网址:http://www.xiangya.com.cn。②新疆乌鲁木齐市天山区天池路91号新疆维吾尔自治区人民医院耳鼻咽喉头颈外科,邮政编码:830001;联系人:顾兴智、艾力根。电话:0991-8565524;13999811815(艾力根)。