

· 基础报道 ·

Eotaxin-3 在鼻息肉中的表达及作用

顾兆伟¹, 曹志伟¹, 王韞秀²

(1. 中国医科大学附属盛京医院 耳鼻咽喉科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学附属盛京医院 血液研究室, 辽宁 沈阳 110022)

摘要: **目的** 探讨嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin-3)mRNA在鼻息肉中的表达及作用。**方法** 选取12例鼻息肉患者和8例单纯鼻中隔偏曲患者的下鼻甲黏膜作为对照,使用实时定量逆转录PCR进行检测,比较息肉和下鼻甲黏膜中的Eotaxin-3的表达情况。**结果** 在所有鼻息肉及对照组中,均检测到Eotaxin-3 mRNA的表达。鼻息肉及对照组中Eotaxin-3 mRNA的相对表达量分别为 22.91 ± 6.66 和 1.37 ± 0.48 。鼻息肉组中Eotaxin-3的表达要远远高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** Eotaxin-3可能在鼻息肉的发生发展过程中起到重要作用,Eotaxin-3的高表达可能最终导致了息肉的形成和生长。

关键词: 嗜酸性粒细胞趋化因子;鼻息肉;鼻中隔偏曲;表达

中图分类号: R765.25

文献标识码: B

文章编号: 1007-1520(2012)06-0472-03

鼻息肉是一种鼻腔鼻窦的良性炎症性病变。特异性的细胞及趋化因子在鼻息肉发生发展中看似起到重要作用^[1-2]。嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin-3)是趋化因子CC亚家族中的一员,在哮喘患者气道中起到重要作用,主要参与了嗜酸性粒细胞的募集以及活化作用^[3-4]。然而其在鼻息肉发生发展中的重要作用仍了解甚少。鼻息肉是一种呈现出嗜酸性粒细胞大量浸润为特点的慢性炎症性疾病,与哮喘的炎症特点相近^[5]。所以本实验的目的就是探讨Eotaxin-3 mRNA在鼻息肉中的表达及其作用。

1 材料及方法

1.1 材料

选取12例鼻息肉患者,其中男7例,女5例;年龄23~62岁,平均年龄41.3岁。8例单纯鼻中隔偏曲患者作为对照组,其中男5例,女3例;年龄21~51岁,平均年龄

37.6岁。息肉组织标本取自中鼻道,对照组鼻黏膜组织取自鼻中隔矫正患者的下鼻甲黏膜。患者均无鼻部过敏、哮喘或者阿司匹林过敏病史。所有患者于活检前4周内均未接受激素(包括全身或者局部)、非类固醇抗炎药物、组胺药物或者大环内酯类抗生素治疗。标本离体后直接放入液氮中保存,20 min内转入深冻冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及逆转录 息肉组织均匀捣碎后中加入1 000 μ l Trizol充分混匀提取总RNA,加入200 μ l 氯仿,离心取上清;异丙醇600 μ l沉淀RNA,75%乙醇洗涤,干燥并DEPC水溶解,紫外分光光度测定RNA浓度及鉴定纯度。逆转录反应体系10 μ l,含Total RNA 500 ng,5 $\times$ Primescript RT Buffer 2 μ l,Prime script RT Enzyme Mix 1 0.5 μ l,Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l,Random 6 mers (100 μ M) 0.5 μ l,RNase Free dH₂O,37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,所得cDNA置-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.2 实时定量PCR检测 采用实时定量PCR SYBR Green I检测方法。每份标本设3个平行对照反应孔。以GAPDH作内参照,Eotax-

基金项目:国家自然科学基金项目(30872849)。辽宁省自然科学基金项目(20082115)。

作者简介:顾兆伟,男,住院医师。

通讯作者:曹志伟,Email:gordon_2134@yahoo.com.cn.

in-3 作目的基因。引物设计:① GAPDH:上游:5-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3,下游:5-GAAG-ATGGTGATGGGATTTC-3;② Eotaxin-3:上游:5-GATCAGGCAGGAGGAGTTTG-3,下游:5-GAA-GCAGCAGGCTCTTGATA-3。反应体系:采用20μl 体系,含 SYBR Premix Ex Taq 10 μl,灭菌蒸馏水 6.8 μl,上下游引物(10 μM)各 0.4 μl,ROX Reference Dye(50 ×)0.4 μl,cDNA 2 μl。PCR 扩增条件:95℃ 预变性10 s,扩增循环95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。溶解程序:95℃ 10 s,60℃ 25 s,95℃ 3 s。通过溶解曲线确定 PCR 产物的特异性。

1.3 目的基因相对定量的测定

将标准品 cDNA 梯度稀释为 5 ~ 6 个浓度梯度,各取 2 μl 作为模板进行 Real-Time PCR 反应,由各扩增曲线得到的 CT 值制作标准曲线,从而得到样本的相对拷贝数。通过目的基

因和内参基因相对拷贝数的比值进行样本间相对定量的比较。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 13.0 分析软件,以目的基因的相对表达量为参考值,分析参考值是否满足正态分布,如果满足采用 *t* 检验;如果不满足,采用 Mann-Whitney 检验, *P* < 0.05 认为有统计学差异。

2 结果

Eotaxin-3 mRNA 在鼻息肉组以及对照组中均有表达,鼻息肉及对照组中其相对表达量分别为 22.91 ± 6.66 及 1.37 ± 0.48 ,使用 Mann-Whitney 检验,鼻息肉组中 Eotaxin-3 的表达要高于对照组,具有统计学意义 (*P* < 0.01),见图 1。

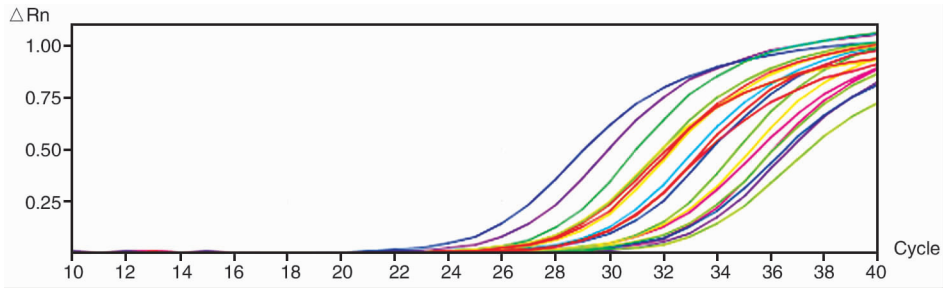


图 1 实时 PCR 中,鼻息肉和对照组中 Eotaxin-3 的扩增曲线

3 讨论

鼻息肉是伴有鼻腔鼻窦黏膜炎症的良性病变。其发病可能是细菌、病毒及真菌感染、窦口鼻道复合体阻塞、黏膜纤毛功能障碍、变态反应、全身及其他因素单独或相互影响、相互作用的结果。但其确切发病机制仍未可知。目前应用药物治疗和鼻内镜手术的方法具有一定疗效,但均有不同程度复发。

Eotaxin-3 是趋化因子 CC 亚家族中的一员,在哮喘患者气道中起到重要作用,主要参与了嗜酸性粒细胞的募集以及活化作用^[3,4]。然而其在鼻息肉发生发展中的重要作用仍了解甚少。Olze 等^[6]使用 ELISA 法检测出鼻息肉中 Eotaxin-3 蛋白显著高于对照组,并且蛋白水平

与嗜酸性粒细胞数量呈显著相关性。相似地,Yao 等^[7]发现在嗜酸性鼻息肉中 Eotaxin-3 的蛋白表达要高于非嗜酸性鼻息肉患者的表达。

本实验从 mRNA 水平上检测 Eotaxin-3 的表达,发现息肉的表达量要显著高于对照组,笔者推测可能由于 Eotaxin-3 的产生为 Th2 炎症过程中嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞的聚集以及活化起到了信号传出作用。炎症的级联反应可能造成纤毛的损伤,导致上皮破裂以及鼻息肉的形成和发展。但确切的机制有待进一步研究。另外 Eotaxin-3 是 CC 趋化因子受体-3 (CCR3) 的一种高特异性配体,而 CCR3 选择性的表达于嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和 Th2 细胞上。通过与 Eotaxin 的相互作用,CCR3 在嗜酸性粒细胞从骨髓释放并且转移至过敏性炎症部位过程中起到了重要的效应分子作

用^[8-9]。由此可见 CCR3 可能在鼻息肉中也起到重要作用。可是 CCR3 在鼻息肉中的表达情况以及作用需进一步研究证实。

本研究应用实时 PCR 检测出鼻息肉中存在 Eotaxin-3 mRNA 的过表达,由此可以推测 Eotaxin-3 可能作为鼻息肉发生发展中的重要因子。高表达的 Eotaxin-3 可能导致了 Th2 炎症的级联反应,最终导致了息肉的形成和生长,但确切的机制有待于进一步研究。Eotaxin-3 在鼻息肉潜在靶向治疗中的作用尚需深入研究进一步证实。

参考文献:

[1] Caversaccio M, Uguccioni M, Hartnell A, et al. Chronic immunological rhinosinusitis: general aspects, cytokines, chemokines and possible therapeutic consequences [J]. Otorhinolaryngol Nova, 2003, 12 (2) : 52 - 62.

[2] Maune S, Meyer JE. The role of CC chemokines in chronic sinusitis [J]. Otorhinolaryngol Nova, 2003, 12 (2) : 63 - 70.

[3] Berkman N, Ohnona S, Chung FK, et al. Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours af-

ter allergen challenge [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24 (6) : 682 - 687.

[4] Kitaura M, Suzuki N, Imai T, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3 [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (39) : 27975 - 27980.

[5] Otto BA, Wenzel SE. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 16 (3) : 270 - 274.

[6] Olze H, Förster U, Zuberbier T, et al. Eosinophilic nasal polyps are a rich source of eotaxin, eotaxin-2 and Eotaxin-3. Rhinology. 2006, 44 (2) : 145 - 150.

[7] Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, et al. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients [J]. Laryngoscope, 2009, 119 (6) : 1053 - 1059.

[8] Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, et al. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia [J]. J Immunol, 2005, 175 (8) : 5341 - 5350.

[9] Bullock JZ, Villanueva JM, Blanchard C, et al. Interplay of adaptive th2 immunity with Eotaxin-3/c-C chemokine receptor 3 in eosinophilic esophagitis [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007, 45 (1) : 22 - 31.

(修回日期:2012 - 06 - 19)

· 消息 ·

林筱周奖学基金成立及首届颁奖大会召开

为了鼓励耳鼻咽喉头颈外科学子积极向上,继承林筱周教授严谨治学、严于律己、精益求精的精神,经中南大学湘雅医学院批准决定在中南大学湘雅医学院附属湘雅医院、湘雅二医院、湘雅三医院设立中南大学湘雅医学院耳鼻咽喉头颈外科林筱周教授优秀博士生奖学基金,每年奖励 3 名应届优秀博士生(含在职和委培),并颁发奖状奖牌及奖金。首届颁奖大会于 2012 年 12 月 22 日在湘雅医院隆重举行,本次会议选举产生了李仕晟(导师杨新明)、吴学文(导师孙虹)、蔡耿明(导师张欣)3 位获奖者。

附:林筱周奖学基金组委会成员名单

- 顾 问:易自翔 张海清 卢永德 肖健云 徐绍勤
- 主 任 委 员:田勇泉 孙 虹
- 副主任委员:赵素萍 张 欣 李远斌 冯 永 谢鼎华 任基浩 谭国林 邱元正
- 秘 书:张 欣(兼)