doi:10.11659/jjssx.06E021133

·临床研究·

分泌性中耳炎患者血清中 HMGB1、TLR2 的表达及临床意义分析

许倩云,崔昊晶 (内蒙古医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[**摘 要**] **目的** 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和 Toll 样受体 2(TLR2)在分泌性中耳炎患者血清中的表达水平及其临床意义。**方法** 将我院 140 例分泌性中耳炎患者作为分泌性中耳炎组,并根据病情严重程度将其分为急性组(63 例)和慢性组(77 例);同期将于我院体检中心进行体检的 100 名健康人员作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测所有研究对象血清 TLR2 mRNA 表达水平,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测所有研究对象血清 HMGB1、降钙素原(PCT)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)表达水平。采用 *Pearson* 法分析分泌性中耳炎患者血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平的相关性及血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与炎症因子的相关性,采用 *Logistic* 回归分析分泌性中耳炎发生的危险因素。**结果** 分泌性中耳炎组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平及炎症因子 PCT、TNF-α、IL-6 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$)。急性组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平均显著高于慢性组($P<0.05$)。*Pearson* 法分析结果显示,分泌性中耳炎患者血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平呈正相关($P<0.001$),血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与 PCT、TNF-α、IL-6 均呈正相关($P<0.05$)。*Logistic* 回归分析结果显示,血清 HMGB1、TLR2 mRNA 高表达是分泌性中耳炎发生的危险因素($P<0.05$)。**结论** HMGB1、TLR2 mRNA 在分泌性中耳炎患者血清中的表达水平明显较高,二者与分泌性中耳炎的发生发展密切相关,其可作为分泌性中耳炎病情评估的潜在生物学指标。

[**关键词**] 分泌性中耳炎;高迁移率族蛋白 B1;Toll 样受体 2;临床意义
[**中图分类号**] R764.21 [**文献标识码**] A [**收稿日期**] 2021-06-28

Expression of HMGB1 and TLR2 in serum of patients with secretory otitis media and its clinical significance

XU Qian-yun, CUI Hao-jing (Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To investigate the expression levels of high-mobility group box-1 (HMGB1) and toll-like receptor 2 (TLR2) in serum of patients with secretory otitis media and its clinical significance. **Methods** A total of 140 patients with secretory otitis media in our hospital were selected as the secretory otitis media group, and they were divided into the acute group (63 cases) and the chronic group (77 cases) according to the severity of the disease. In the same period, a total of 100 healthy people who underwent physical examination in the physical examination center of our hospital were selected as the control group. The expression levels of serum TLR2 mRNA in all subjects were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression levels of serum HMGB1, procalcitonin (PCT), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in all subjects were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The *Pearson* method was used to analyze the correlation between serum HMGB1 expression levels and TLR2 mRNA expression levels and the correlation between the expression levels of serum HMGB1, TLR2 mRNA and the inflammatory factors in patients with secretory otitis media. The *Logistic* regression analysis was used to analyze the risk factors for the occurrence of secretory otitis media. **Results** The expression levels of serum HMGB1 and TLR2 mRNA and the expression levels of inflammatory factors PCT, TNF-α and IL-6 in the secretory otitis media group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The expression levels of serum HMGB1 and TLR2 mRNA in the acute group were significantly higher than those in the chronic group ($P<0.05$). *Pearson* method analysis showed that serum HMGB1 expression levels were positively correlated with TLR2 mRNA expression levels in patients with secretory otitis media ($P<0.001$), and the expression levels of serum HMGB1 and TLR2 mRNA were positively correlated with PCT, TNF-α and IL-6 ($P<0.05$). *Logistic* regression analysis showed that the high expression of HMGB1 and TLR2 mRNA were the risk factors for the occurrence of secretory otitis media ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of HMGB1 and TLR2 mRNA in serum of patients with secretory otitis media are significantly higher, and they are closely related to the occurrence and the development of secretory otitis media, which can be used as the potential biological indicators for evaluating the condition of secretory otitis media.

Keywords: secretory otitis media; high-mobility group box-1; toll-like receptor 2; clinical significance

[**通信作者**] 崔昊晶,E-mail:wangqiutong365@126.com

分泌性中耳炎是耳鼻咽喉科较常见的炎性疾病,其主要由功能性通气功能障碍、机械性阻塞造成,临床表现为鼓室积液、听力下降等[1-2]。分泌性中耳炎多见于儿童,是造成儿童听力下降的最主要因素,且病情复杂,易反复发作,临床治愈困难[3]。因此,探究分泌性中耳炎的发病机制具有重要临床意义。高迁移率族蛋白 B1(high-mobility group box-1,HMGB1)是一种非组蛋白核蛋白,其可参与 DNA 重组、转录调节等,并可作为炎症因子在多种炎症性疾病中发挥重要作用[4]。Toll 样受体 2(toll-like receptor 2,TLR2)是一种天然的免疫特异性病原识别受体,在维持中耳功能等方面发挥重要作用[5]。然而,关于血清 HMGB1、TLR2 对分泌性中耳炎的影响目前尚不完全清楚。鉴于此,本研究拟通过检测分泌性中耳炎患者血清中 HMGB1、TLR2 的表达情况,探究其在分泌性中耳炎中的作用,以期为临床提供一定参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2018 年 9 月至 2020 年 7 月我院收治的分泌性中耳炎患者 140 例作为分泌性中耳炎组,其中男 81 例,女 59 例,年龄 7 ~ 15 岁,并根据病情严重程度[6]将其分为急性组(63 例)和慢性组(77 例)。选取同期在我院体检中心进行体检的 100 名健康人员作为对照组,其中男 52 例,女 48 例,年龄 6 ~ 15 岁。分泌性中耳炎组和对照组的性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

分泌性中耳炎组纳入标准:①符合分泌性中耳炎的相关诊断标准[6];②无分泌性中耳炎家族史;③临床资料完整。排除标准:①患有甲状腺、糖尿病等其他内分泌疾病;②有过敏性鼻炎等病史;③患有免疫系统疾病。本研究经本院医学伦理委员会批准通过(NO. 201805-7),且符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》,所有患者及家属自愿参加本研究,并签署知情同意书。

1.2 主要仪器和试剂

离心机(型号:RJ-TDL-60A)购自无锡市瑞江分析仪器有限公司;酶标仪(型号:Phomo)购自郑州安图生物工程股份有限公司;人 HMGB1 酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(批号:20171205)购自上海钰博生物科技有限公司;人降钙素原(procalcitonin,PCT)ELISA 试剂盒(批号:20180103)购自上海晶风生物科技有限公司;人肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)ELISA 试剂盒(批号:20171028,20180209)均购自上海心语生物科技有限公司,逆转录试剂盒(批号:20180322)购自杭州联科美讯生物医药技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒(批号:20180419)购自北京艾德莱生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)仪(型号:StepOne TM)购自美国应用生物系统公司;血清 TLR2 mRNA 及内参 GAPDH 引物由苏州鸿讯生物科技股份有限公司合成;其他化学药品均购自天津永大化学试剂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集及保存 于清晨采集所有研究对象空腹状态下静脉血 5 mL,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min,分层后收集上层血清,然后置于 -80 ℃冰箱中保存待测。

1.3.2 ELISA 法检测血清 HMGB1、PCT、TNF-α、IL-6 表达水平 将上述血清样品解冻,然后稀释标准样品,在标准孔、空白孔及待测样品的包被板中分别加样,将其完全溶解并充分混合均匀,37 ℃条件下温育 30 min;用 PBST 洗涤液洗涤后拍干,加入 50 μL 酶标试剂温育 30 min,然后加入终止液至反应停止,最后使用酶标仪进行测定。

1.3.3 qRT-PCR 法检测血清 TLR2 mRNA 表达水平

取上述保存的待测血清,使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录得到 cDNA。再以逆转录合成的 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR 检测。PCR 反应条件为:94 ℃,2 min;94 ℃,30 s;60 ℃,25 s;72 ℃,20 s,共 40 个循环。血清 TLR2 mRNA 及内参 GAPDH 的引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算血清 TLR2 mRNA相对表达量。

表 1 引物序列

指标	引物序列	
TLR2 mRNA	正向引物 5'-3'	GAAAGCTCCCAGCAGGAACATC
	反向引物 5'-3'	GAATGAAGTCCCGCTTATGAAG
GAPDH	正向引物 5'-3'	GAGAGTGCCCACTCCTGCCA
	反向引物 5'-3'	CTCAGTGAGCCTCCTCTGGT

1.4 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行 t 检验。采用 *Pearson* 法分析分泌性中耳炎患者血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平的相关性及血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与炎症因子的相关性,采用 *Logistic* 回归分析分泌性中耳炎发生的危险因素。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症因子水平比较

分泌性中耳炎组血清炎症因子 PCT、TNF-α、IL-6

表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 炎症因子表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PCT/(ng·mL^{-1})	TNF-α/(ng·mL^{-1})	IL-6/(pg·L^{-1})
分泌性中耳炎组	140	4.18±1.12	2.43±0.35	6.57±1.24
对照组	100	1.50±0.86	0.81±0.19	2.73±0.94
t		20.069	42.055	26.070
P		0.000	0.000	0.000

2.2 血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平比较

分泌性中耳炎组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。急性组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平均高于慢性组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

表3 分泌性中耳炎组和对照组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HMGB1/(μg·L^{-1})	TLR2 mRNA
分泌性中耳炎组	140	83.92±8.46	1.35±0.24
对照组	100	61.75±6.32	0.98±0.02
t		22.155	15.322
P		0.000	0.000

表4 急性组和慢性组血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HMGB11/(μg·L^{-1})	TLR2 mRNA
急性组	63	94.85±10.36	1.48±0.31
慢性组	77	75.11±8.19	1.24±0.22
t		12.592	5.346
P		0.000	0.000

2.3 血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平的相关性

Pearson 法分析结果显示,分泌性中耳炎患者血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.503$,$P<0.001$),见图1。

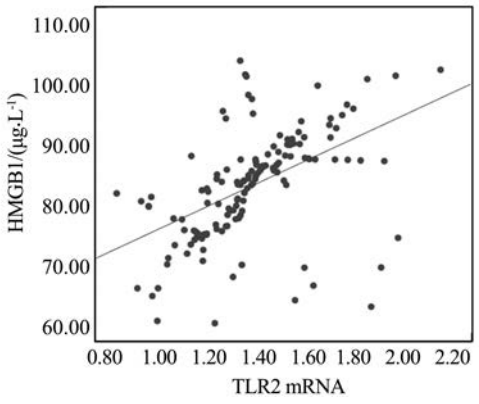


图1 血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平的相关性

2.4 血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与炎症因子的相关性

Pearson 法分析结果显示,分泌性中耳炎患者血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与炎症因子 PCT、TNF-α、IL-6 均呈正相关($P<0.05$),见表5。

表5 血清 HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平与炎症因子的相关性分析

指标	PCT		TNF-α		IL-6	
	r	P	r	P	r	P
HMGB1	0.437	0.004	0.526	0.000	0.485	0.001
TLR2 mRNA	0.395	0.007	0.496	0.000	0.447	0.003

2.5 影响分泌性中耳炎发生的危险因素分析

以是否发生分泌性中耳炎为因变量(0=否,1=是),以分泌性中耳炎组和对照组有统计学差异的指标(血清 PCT、TNF-α、IL-6、HMGB1、TLR2 mRNA 表达水平)为自变量。PCT、TNF-α、IL-6、HMGB1、TLR2 mRNA 分别以各自的平均值为界进行分组:PCT 高表达(≥4.18 ng·mL^{-1})和低表达(<4.18 ng·mL^{-1}),TNF-α 高表达(≥2.43 ng·mL^{-1})和低表达(<2.43 ng·mL^{-1}),IL-6 高表达(≥6.57 pg·L^{-1})和低表达(<6.57 pg·L^{-1}),HMGB1 高表达(≥83.92 μg·L^{-1})和低表达(<83.92 μg·L^{-1}),TLR2 mRNA 高表达(≥1.35)和低表达(<1.35),以上各指标赋值均为0=低表达,1=高表达。*Logistic* 回归分析结果显示:血清 HMGB1、TLR2 mRNA 高表达是分泌性中耳炎发生的危险因素($P<0.05$),见表6。

表6 影响分泌性中耳炎发生的危险因素

因素	β	$S.E$	$Wald\chi^2$	P	OR	95% CI
PCT 高表达	0.159	0.155	1.048	0.306	1.172	0.865~1.588
TNF-α 高表达	0.101	0.094	1.149	0.284	1.106	0.920~1.330
IL-6 高表达	0.048	0.124	0.149	0.700	1.049	0.823~1.338
HMGB1 高表达	0.703	0.247	8.091	0.004	2.019	1.244~3.276
TLR2 mRNA 高表达	0.548	0.195	7.901	0.005	1.730	1.180~2.535

3 讨论

分泌性中耳炎在中耳炎中较为常见,主要分为急性分泌性中耳炎和慢性分泌性中耳炎,其发病与感染、免疫反应、咽鼓管功能异常、炎症反应等密切相关[7-9]。流行病学研究显示,约25%的学龄儿童患有分泌性中耳炎,且经治疗后易复发,严重影响患儿的身心健康[10]。因此,对分泌性中耳炎的发病机制进行研究,寻找与该病相关的标志物具有一定临床意义。

HMGB1 是高迁移率族蛋白家族的成员之一,广泛分布在细胞质及细胞核中,可与 DNA 结合,在 DNA 重组、转录等过程中发挥重要作用,也可与细胞膜表面受体结合,激活 NF-κB 通路,促进免疫应答的发生[11-12]。王丹等[13]研究发现,HMGB1 在支原体感染盆腔炎患者的血清中呈高表达,其表达水平可为支原体感染盆腔炎患者的病情评估及诊断提供参考依据。分泌性中耳炎是一种炎症性疾病,其病情严重程度与炎症因子水平变化有关。更藏达杰等[14]研究发现,分泌性中耳炎患者血清中炎症因子 PCT、TNF-α 表达水平升高,表

明二者异常升高与该病的发展有关。本研究结果显示,分泌性中耳炎组患者血清 HMGB1 表达水平显著高于对照组,急性组患者血清 HMGB1 表达水平显著高于慢性组,且其表达水平与炎症因子 PCT、TNF-α、IL-6 均呈正相关,提示血清 HMGB1 可能参与分泌性中耳炎的发生发展。

TLR2 是 Toll 样受体家族的重要成员,也是机体内的一种天然免疫类蛋白分子,其可识别机体内多种微生物的相关分子结构,并在机体免疫应答、炎症反应等方面发挥重要作用[15-16]。戚明等[17]研究发现,TLR2 在结核性胸膜炎患者胸腔积液中呈高表达,其诊断结核性胸膜炎的 *AUC* 为 0.774,且与肿瘤坏死因子、TLR4 呈正相关,推测其可作为诊断结核性胸膜炎的潜在生物学指标。Huang 等[18]研究发现,TLR2 信号传导能够清除细菌,及时减轻肺炎链球菌诱发的中耳炎炎症反应。本研究结果显示,分泌性中耳炎组血清 TLR2 mRNA 表达水平显著高于对照组,急性组血清 TLR2 mRNA 表达水平显著高于慢性组,且其表达水平与炎症因子 PCT、TNF-α、IL-6 均呈正相关,提示血清 TLR2 mRNA 可能参与分泌性中耳炎的发生发展。

潘红梅等[19]的研究显示,HMGB1 在狼疮肾炎中呈高表达,且可能通过靶向激活 TLR/NF-κB 通路发挥作用。本研究结果显示,分泌性中耳炎患者血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 表达水平呈正相关,进一步提示血清 HMGB1 与 TLR2 mRNA 可能共同在分泌性中耳炎发病过程中发挥作用,但其具体机制仍有待进一步证实。此外,本研究 *Logistic* 回归分析结果显示,血清 HMGB1、TLR2 mRNA 高表达是分泌性中耳炎发生的危险因素,提示监测二者表达水平,对评估分泌性中耳炎的发生有一定的临床意义。

综上所述,HMGB1、TLR2 mRNA 在分泌性中耳炎患者血清中的表达水平明显较高,提示二者与分泌性中耳炎的发生发展密切相关,可作为分泌性中耳炎病情评估的潜在生物学指标。但分泌性中耳炎的发生受多种因素影响,因此仍需寻找更多影响分泌性中耳炎发生的相关因素,为其临床预防及治疗提供一定的参考。

[参考文献]

[1] 陈沛维,赵春丽,王丹妮,等. Th17/Treg 细胞介导的分泌性中耳炎发病机制研究[J]. 中华耳科学杂志,2020,18(3):431 - 437. doi:10.3969/j.issn.1672 - 2922.2020.03.002.

[2] Cole LK,Rajala-Schultz PJ,Lorch G,et al. Bacteriology and cytology of otic exudates in 41 cavalier King Charles spaniels with primary secretory otitis media[J]. Vet Dermatol,2019,30(2):151 - 156. doi:10.1111/vde.12724.

[3] 谢晓兴,熊高云,戈言平,等. 分泌性中耳炎患者的血清及中耳积液内炎性因子和转化生长因子水平检测及其临床价值分析[J]. 中华全科医学,2018,16(9):1449 - 1451. doi:10.16766/j.cnki.issn.1674 - 4152.000396.

[4] 张君雪,李树民,马雪梅,等. HMGB1、FeNO 在支气管哮喘中表达意义的研究[J]. 临床肺科杂志,2019,24(4):708 - 710. doi:10.3969/j.issn.1009 - 6663.2019.04.031.

[5] 司 瑜,张志钢,黄春宇,等. Toll 样受体在慢性化脓性中耳炎和中耳胆脂瘤中的差异表达及其意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2012,47(5):388 - 393. doi:10.3760/cma.j.issn.1673 - 0860.2012.05.009.

[6] 孔维佳. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:406 - 409.

[7] Feng C,Zhang Q,Zhou G,et al. Roles of T follicular helper cells in the pathogenesis of adenoidal hypertrophy combined with secretory otitis media[J]. Medicine,2018,97(13):e0211. doi:10.1097/MD.0000000000010211.

[8] 朱艳双,欧阳治国. 65 例分泌性中耳炎合并腺样体肥大患儿外周血 T 淋巴细胞亚群检测及其临床意义[J]. 中国妇幼保健,2020,35(18):3409 - 3412. doi:10.19829/j.zgfybj.issn.1001 - 4411.2020.18.027.

[9] Krueger A,Stéphanie V,Pérez-Losada M,et al. Relationship of the middle ear effusion microbiome to secretory mucin production in pediatric patients with chronic otitis media[J]. Pediatr Infect Dis J,2017,36(7):635 - 640. doi:10.1097/INF.0000000000001493.

[10] 胡兴家,余 涛,周顺华. 维生素 D 与儿童分泌性中耳炎相关性的研究进展[J]. 中华耳科学杂志,2019,17(1):112 - 116. doi:10.3969/j.issn.1672 - 2922.2019.01.019.

[11] Nguyen AH,Detty SQ,Agrawal DK. Clinical implications of high-mobility group box-1 (HMGB1) and the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in cutaneous malignancy:a systematic review[J]. Anticancer Res,2017,37(1):1 - 7. doi:10.21873/anticanres.11282.

[12] 陈 影,孙 航,娄世锋,等. 噬血细胞性淋巴组织细胞增多症患者外周血中高迁移率族蛋白 B1 的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报,2019,41(23):2307 - 2312. doi:10.16016/j.1000 - 5404.201906057.

[13] 王 丹,涂飞霞,王友诊,等. 支原体感染盆腔炎患者血清高迁移率族蛋白 B1 的临床价值[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(3):419 - 423. doi:10.11816/cn.ni.2020 - 190943.

[14] 更藏达杰,毛海明. 分泌性中耳炎患者炎性因子、细胞免疫及体液免疫功能分析[J]. 海南医学院学报,2018,24(16):1529 - 1531. doi:10.13210/j.cnki.jhmu.20180703.003.

[15] 付 建. Toll 样受体 2 和半乳糖凝集素-1 在早发型重度子痫前期孕妇外周血中的表达水平及其意义[J]. 医学临床研究,2018,35(11):2178 - 2179. doi:10.3969/j.issn.1671 - 7171.2018.11.036.

[16] Su H,Zhang Z,Liu Z,et al. Mycobacterium tuberculosis PPE60 antigen drives Th1/Th17 responses via Toll-like receptor 2:dependent maturation ofdendritic cells[J]. J Biol Chem,2018,293(26):10287 - 10302. doi:10.1074/jbc.RA118.001696

[17] 戚 明,门 浩,李成伟,等. TLR2 和 TLR4 在结核性胸膜炎患者胸腔积液中的检测[J]. 中国临床研究,2018,31(11):1508 - 1511. doi:10.13429/j.cnki.cjcr.2018.11.017.

[18] Huang Y,Wang Z,Jin C,et al. TLR2 promotes macrophage recruitment and streptococcus pneumoniae clearance during mouse otitis media[J]. Pediatr Res,2016,80(6):886 - 893. doi:10.1038/pr.2016.154.

[19] 潘红梅,周广军,马金荣,等. 狼疮肾炎患者 HMGB1 变化的临床意义及其靶向激活 TLR/NF-κB 通路的作用研究[J]. 临床肾脏病杂志,2020,20(4):277 - 281. doi:10.3969/j.issn.1671 - 2390.2020.04.003.

(编辑:贺绍梅)