doi:10.11659/jjssx.07E022105

·基础研究·

PAD4介导的瓜氨酸化组蛋白在中耳炎发病进程中的机制研究

阿不拉江·托合提,程秀琴,古丽波斯坦·买买提艾力 (新疆维吾尔自治区人民医院耳鼻咽喉科,新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘 要] **目的** 探究精氨酸脱亚胺酶4(PAD4)介导的瓜氨酸化组蛋白3(CitH3)在中耳炎发病进程中的作用机制。**方法** 收集于我院接受手术治疗的慢性中耳炎患者和非中耳炎患者各30例。采用Western blot检测患者耳组织中PAD4、CitH3蛋白表达水平;ELISA检测患者血清中PAD4、CitH3含量;并分析PAD4与CitH3的相关性。将30只BALB/c小鼠分为对照组、模型组和给药组,每组10只。模型组和给药组中耳注射脂多糖(LPS)建模后,给药组每日中耳注射5 mg/kg cl-amidine,模型组和对照组注射等量生理盐水;实验结束后进行听性脑干反应测试;Western blot检测PAD4、CitH3、p-P65、P65蛋白表达水平;qRT-PCR检测IL-6、TNF-α表达水平;ELISA检测血清中PAD4、CitH3、IL-6、TNF-α含量。**结果** 与非中耳炎患者比较,慢性中耳炎患者耳组织中PAD4、CitH3蛋白表达水平升高($P<0.05$),血清中PAD4、CitH3含量升高($P<0.05$),且两者呈正相关($R=0.363\ 6$)。动物实验结果显示,与对照组比较,模型组听性脑干反应阈值升高($P<0.05$),PAD4蛋白、CitH3蛋白、p-P65/P65及IL-6、TNF-α mRNA表达水平升高($P<0.05$),血清中PAD4、CitH3、IL-6、TNF-α含量升高($P<0.05$);与模型组比较,给药组听性脑干反应阈值降低($P<0.05$),PAD4蛋白、CitH3蛋白、p-P65/P65及IL-6、TNF-α mRNA表达水平降低($P<0.05$),血清中PAD4、CitH3、IL-6、TNF-α降低($P<0.05$)。**结论** PAD4通过介导CitH3激活NF-κB信号通路,促进耳组织炎症反应;抑制PAD4活性可缓解中耳炎症状。

[关键词] 中耳炎;精氨酸脱亚胺酶4;瓜氨酸化组蛋白;脂多糖
[中图分类号] R764.21 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-07-27

Mechanism of PAD4-mediated citrullinated histone H3 in the pathogenesis of otitis media

Abulajiang Tuoheti, CHENG Xiu-qin, Gulibositan Maimaitiaili (Department of Otorhinolaryngology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang 830001, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of citrullinated histone H3 (CitH3) mediated by arginine deimimase 4 (PAD4) in the pathogenesis of otitis media. **Methods** Thirty patients with chronic otitis media and 30 patients with non-otitis media who received surgical treatment in our hospital were collected. The expression levels of PAD4 and CitH3 in ear tissues of patients were detected by Western blot. The contents of PAD4 and CitH3 in serum were detected by ELISA, and the correlation between PAD4 and CitH3 was analyzed. Thirty BALB/c mice were divided into the control group, model group and drug administration group, with 10 mice in each group. The model group and drug administration group were injected with lipopolysaccharide (LPS) to establish model, then the drug administration group was injected with 5 mg/kg cl-amidine, and the model group and control group were injected with the same dose of normal saline. After the experiment, auditory brainstem response test was performed. Western blot was used to detect the expression levels of PAD4, CitH3, p-P65 and P65; qRT-PCR was used to detect the expression levels of IL-6 and TNF-α. ELISA was used to detect the contents of PAD4, CitH3, IL-6 and TNF-α in serum. **Results** Compared with non-otitis media patients, the protein expression levels of PAD4 and CitH3 in tissues of patients with chronic otitis media increased ($P<0.05$), and the contents of PAD4 and CitH3 in serum increased ($P<0.05$), and they were positively correlated ($R=0.363\ 6$). Animal experiments showed that compared with the control group, the threshold of auditory

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C135);新疆维吾尔自治区人民医院内项目(20200116)
[通信作者] 古丽波斯坦·买买提艾力,E-mail:atht0823@163.com

[17] Ruan Q, Lu H, Zhu H, et al. A network-regulative pattern in the pathogenesis of kidney injury following severe acute pancreatitis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109-121. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109978.
[18] 彭婉君,赵彬彬,武 婧,等. 可溶性识别分子PTX3的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2020,30(1):115-121. doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.020.
[19] 赵清杰,朱琳楠,丁文军,等. 巨噬细胞极化与细胞代谢的相互调控[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(3):408-411. doi:10.13423/j.cnki.cjcmi.007262.
[20] Kobayashi H, Yamashita Y, Iwase A, et al. The ferroimmunomodulatory role of ectopic endometriotic stromal cells in ovarian endometriosis[J]. Fertil Steril, 2012, 98: 415-422. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.047.

(编辑:贺绍梅)

brainstem response in the model group was increased (P<0.05), the protein expression levels of PAD4 and CitH3, the level of p-P65/P65 and the mRNA expression levels of IL-6, TNF-α were increased (P<0.05), the contents of PAD4, CitH3, IL-6 and TNF-α in serum were increased (P<0.05). Compared with the model group, the threshold of auditory brainstem response in drug administration group was decreased (P<0.05), the protien expression levels of PAD4 and CitH3, the level of p-P65/P65 and the mRNA expression levels of IL-6 and TNF-α were decreased (P<0.05), the contents of PAD4, CitH3, IL-6 and TNF-α in serum were decreased (P<0.05). **Conclusion** PAD4 promotes inflammatory responses in ear tissue by mediating CitH3 and activating the NF-κB signaling pathway. Inhibition of PAD4 activity may alleviate symptoms of otitis media disease.

Keywords: otitis media; arginine deiminase 4; citrullinated histone H3; lipopolysaccharide

中耳炎在全世界范围内被认为是耳鼻咽喉科最常见的疾病之一，可分为急性中耳炎和慢性中耳炎[1]。其中慢性化脓性中耳炎（chronic suppurative otitis media，CSOM）作为慢性中耳炎的一种，其主要特征是持续性且严重的耳溢液，且病程通常在6个月以上[2]，但是关于CSOM的发病机制仍缺乏进一步的研究。

瓜氨酸化组蛋白3（citrullinated histone H3，CitH3）指肽链中的精氨酸残基转化为瓜氨酸后的组蛋白，是一种表观遗传修饰后的产物，广泛存在于免疫和炎症相关的疾病中[3]。Makrygiannakis等[4]通过免疫组织化学检查了类风湿性关节炎、肌炎、扁桃体炎和炎症性肠病的活检组织，发现炎症组织中的瓜氨酸的蛋白水平显著增加。Morita等[5]在中耳炎患者的中耳液中检测到了CitH3，并发现其与疾病的严重程度呈正相关，表明CitH3可能参与了CSOM的发生发展。肽精酰基精氨酸脱亚胺酶4（peptidyl arginine deimidase 4，PAD4）可将精氨酸转化为瓜氨酸，其主要定位于细胞核并靶向组蛋白H3、H2A和H4，对其进行瓜氨酸化[6]。在类风湿性关节炎中，PAD4通过驱动细胞因子失调，促进炎症发生，并增加瓜氨酸化自身抗原的产生，从而加快疾病的发展[7]。然而，PAD4是否可通过介导CitH3的生成来参与中耳炎的发病进程尚不清楚。

本研究通过检测中耳炎患者耳组织中的PAD4与CitH3水平，并构建CSOM小鼠模型，初步评估PAD4、CitH3与CSOM的相关性，探索PAD4是否通过介导CitH3形成而影响CSOM的发病进程，以期为CSOM的预防及治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 临床样本

选取于我院耳鼻咽喉诊疗中心接受中耳手术治疗的30例CSOM患者和30例非中耳炎患者为研究对象。非中耳炎纳入标准：耳硬化或听骨链畸形需行听骨链重建术；双侧重度感音神经性耳聋进行听觉植入手术，主要行人工耳蜗植入术；无中耳炎史，且术前超薄颞骨断层CT扫描显示中耳及乳突气房无任何可疑感染病灶；术前耳内镜检查鼓膜完整，无内陷及鼓膜感染。CSOM纳入标准：有慢性持续间断的流脓病史，伴或不伴听力下降、耳鸣、眩晕等不适，并经耳内镜检查证实，出现复发性耳流脓性分泌物超过6个月。将术中取材的中耳肉芽组织立即置于液氮冷冻，置于-80 ℃冰箱保存。本研究经我院伦理委员会批准（KY20220429117），所有患者或家属签署研究知情同意书。

1.2 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠30只（6~8周龄，20~25 g）购自新疆维吾尔自治区实验动物研究中心，动物生产许可证号：SCXK（新）2021-0001。所有小鼠于室温、自然光暗周期的环境中饲养，实验期间自由饮食、饮水。

1.3 主要试剂

脂多糖（lipopolysaccharides，LPS）购自上海生物制剂公司，乌拉坦购自上海易恩化学技术有限公司，PAD4抑制剂cl-amidine购自美国MedChemExpress公司，ELISA检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司，BCA检测试剂盒、TRIzol、逆转录试剂盒和SYBR Green试剂购自上海翌圣公司，qRT-PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成，PAD4抗体、CitH3抗体、p-P65、P65、GAPDH抗体购自英国Abcam公司，HRP标记的山羊抗兔IgG抗体购自上海白鲨生物科技有限公司，RIPA组织细胞快速裂解液购自北京索莱宝科技有限公司，ECL试剂盒购自美国Millipore公司。

1.4 方法

1.4.1 CSOM小鼠模型的构建与治疗 随机将30只小鼠分为对照组、模型组和给药组，每组10只。对照组不造模，模型组和给药组采用鼓室内少量多次注射LPS制备CSOM小鼠模型：采用20%乌拉坦5 mL/kg进行腹腔内注射麻醉后，将15 μL的0.1 mg/mL LPS经小鼠右中耳鼓膜前下方注入鼓室；24 h后再次进行麻醉，注入15 μL的0.3 mg/mL LPS；24 h后注射15 μL的0.5 mg/mL LPS。小鼠正常喂养3 d后，以耳内镜观察

鼓膜情况,鼓膜破裂并见积液征则表示造模成功。建模成功后,给药组每日中耳注射5 mg/kg cl-amidine,模型组和对照组注射等量生理盐水。

1.4.2 听性脑干反应测试 小鼠完全麻醉后,将电极置于两耳间连线中点,参考电极插于给声耳垂下,地线插于对侧耳垂下,电极之间阻抗小于3 kΩ。采用美国TDT公司TDTⅢ设备给声并采集信号。刺激声为click声,强度10~90 dBHL,衰减间隔10 dB,在接近阈值时,衰减间隔5 dBHL。以出现较为明确的Ⅲ波作为反应测试的阈值。

1.4.3 Western blot检测PAD4、CitH3、p-P65和P65蛋白表达 提取患者和小鼠中耳组织中的总蛋白,利用BCA试剂盒检测总蛋白浓度。SDS-PAGE分离蛋白,之后转移至PVDF膜上,脱脂牛奶封闭1 h,分别加入兔抗鼠PAD4(1∶800)、p-P65(1∶1 000)、P65(1∶1 000)、CitH3(1∶200)和GAPDH (1∶5 000),4 ℃孵育过夜,加入山羊抗兔二抗于37 ℃孵育1 h后曝光显影,并使用Image J软件进行定量分析。

1.4.4 ELISA检测血清中PAD4、CitH3、IL-6和TNF-α含量 血浆样本制备:分别采集患者与小鼠的全血样本,置于抗凝管中,随后于4 ℃以3 000 r/min离心10 min,取离心后的上清即为血浆样品。根据试剂盒说明书,检测患者与小鼠血清PAD4、CitH3、IL-6和TNF-α含量。将标准品工作液和待测样品加入样品孔中,将覆膜覆在酶标板上,轻轻晃动混匀,37 ℃孵育20 min;弃去酶标板中液体,洗涤液洗涤5次,每次30 s,拍干,除空白孔,每孔加入酶标抗体,盖上覆膜,37 ℃孵育30 min,弃去液体,洗涤液洗涤5次,每次30 s,拍干;在样品孔中加入显色剂A、B,盖上覆膜,轻轻振荡混匀,37 ℃避光孵育10 min;加入终止液终止反应,立即用酶标仪测定450 nm波长处吸光度。根据标准品浓度对应吸光度制作标准曲线,并根据样品吸光度计算样品相应浓度。

1.4.5 qRT-PCR检测耳组织中IL-6、TNF-α mRNA表达

采用TRIzol提取各组细胞总RNA。使用酶标仪检测总RNA的纯度和含量。按照qRT-PCR试剂盒说明书依次进行逆转录和qRT-PCR实验。qRT-PCR反应条件:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性7 s,55 ℃退火30 s,72 ℃ 15 s,循环40个周期。IL-6引物序列:正向5′-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3′,反向5′-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3′;TNF-α引物序列:正向5′-CTGAACTTCGGGGTGATCGG-3′,反向5′-GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3′;GAPDH的引物序列:正向5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′,反向5′-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3′。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算mRNA的相对表达量。

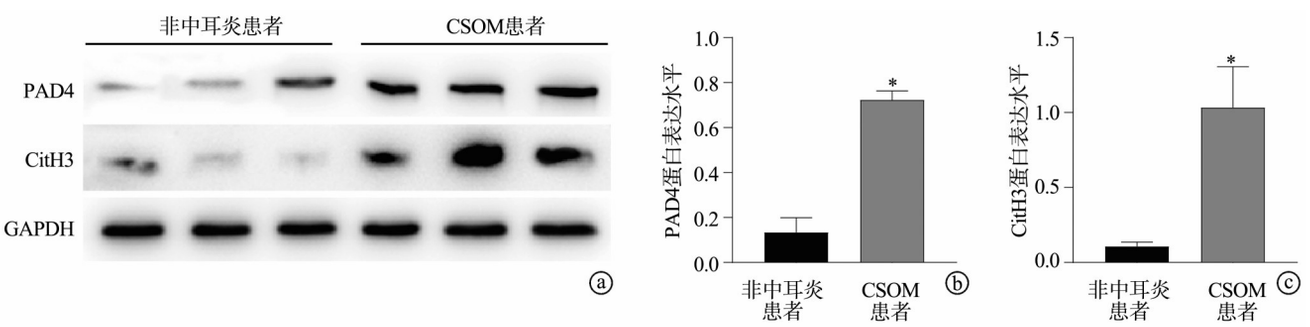
1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件对相关数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。使用*Spearman*法进行相关性分析。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CSOM患者PAD4和CitH3表达上调

Western blot结果显示,与非中耳炎患者比较,CSOM患者耳组织中PAD4、CitH3蛋白表达水平升高,差异有统计学意义(P<0.05),见图1。ELISA结果显示,与非中耳炎患者比较,CSOM患者血清中PAD4、CitH3浓度升高,差异有统计学意义(P<0.05),见图2a、b。*Spearman*相关性分析结果显示,CSOM患者血清中PAD4和CitH3浓度呈正相关(R=0.363 6,P=0.000 4),见图2c。

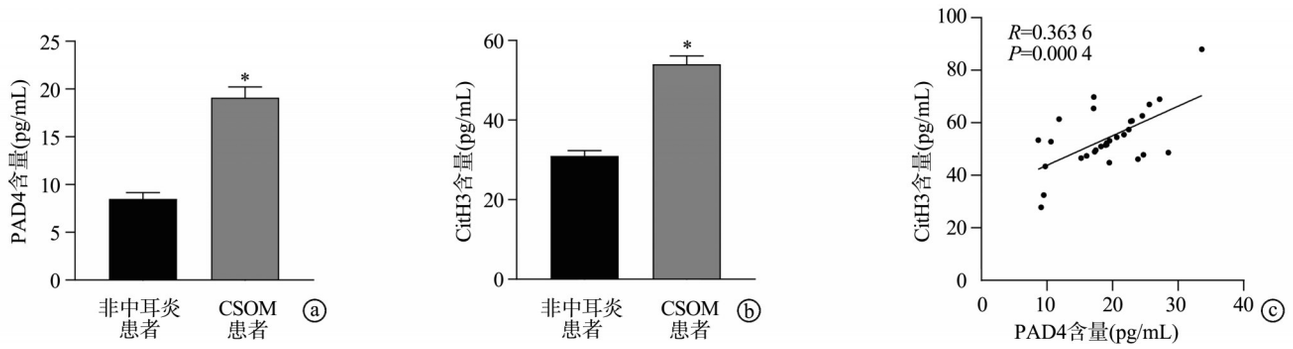


a:患者耳组织中PAD4和CitH3蛋白条带;b:PAD4蛋白定量图;c:CitH3蛋白定量图 *:与非中耳炎患者比较,P<0.05

图1 非中耳炎患者和CSOM患者耳组织中PAD4、CitH3表达水平比较

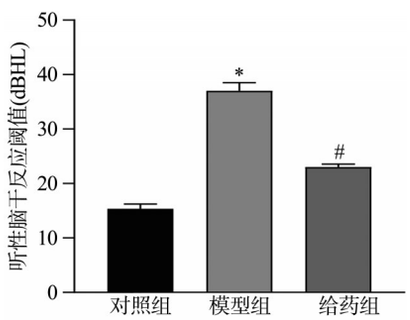
2.2 抑制PAD4缓解CSOM小鼠症状

听性脑干反应测试结果显示，与对照组比较，模型组听性脑干反应阈值升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组听性脑干反应阈值降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图3。



a:患者血清中PAD4水平；b:患者血清中CitH3水平；c:*Spearman*分析PAD4和CitH3含量的相关性 *:与非中耳炎患者比较，$P<0.05$

图2 非中耳炎患者和CSOM患者血清中PAD4和CitH3含量情况

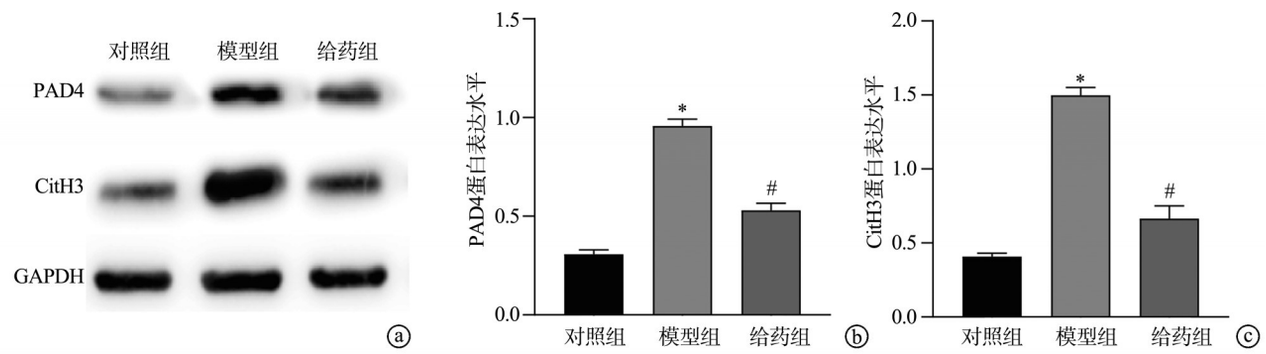


*:与对照组比较，$P<0.05$；#:与模型组比较，$P<0.05$

图3 小鼠听性脑干反应阈值比较

2.3 抑制PAD4降低CitH3表达

Western blot结果显示，与对照组比较，模型组耳组织中PAD4、CitH3蛋白表达水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组耳组织中PAD4、CitH3蛋白表达水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图4。ELISA结果显示，与对照组比较，模型组血清中PAD4、CitH3浓度升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组血清中PAD4、CitH3浓度降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图5。



a:小鼠耳组织中PAD4和CitH3蛋白条带；b:PAD4蛋白定量图；c:CitH3蛋白定量图 *:与对照组比较，$P<0.05$；#:与模型组比较，$P<0.05$

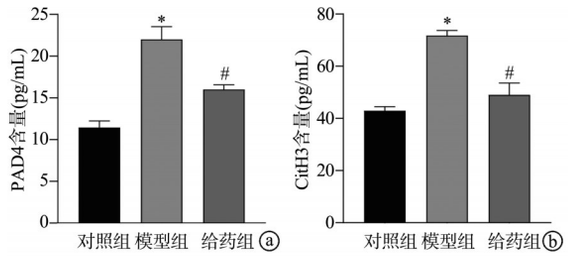
图4 小鼠耳组织中PAD4、CitH3表达水平比较

2.4 抑制PAD4减轻CSOM小鼠炎症反应

qRT-PCR结果显示，与对照组比较，模型组耳组织中IL-6、TNF-α mRNA表达水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组耳组织中IL-6、TNF-α mRNA表达水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图6。ELISA结果显示，与对照组比较，模型组血清中IL-6、TNF-α含量升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组血清中IL-6、TNF-α浓度降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图7。

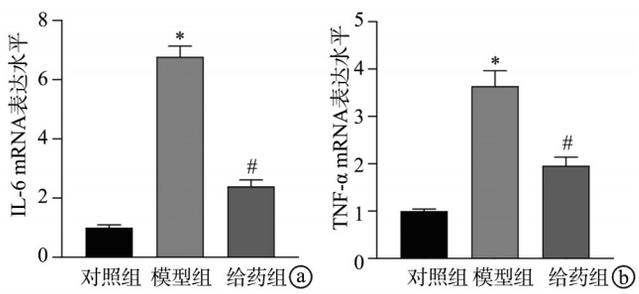
2.5 抑制PAD4拮抗CSOM小鼠NF-κB信号通路

Western blot结果显示，与对照组比较，模型组耳组织中p-P65/P65水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，给药组耳组织中p-P65/P65蛋白表达水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图8。



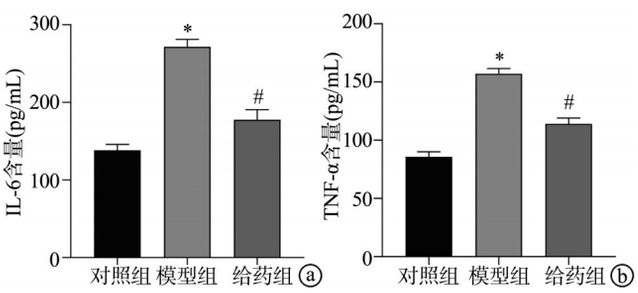
a:小鼠血清中PAD4水平;b:小鼠血清中CitH3水平 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图5 小鼠血清中PAD4、CitH3含量比较



a:小鼠耳组织中IL-6 mRNA表达;b:小鼠耳组织中TNF-α mRNA表达 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图6 小鼠耳组织IL-6、TNF-α mRNA表达比较



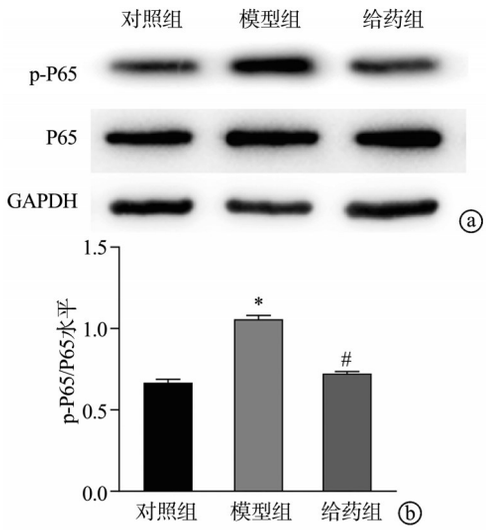
a:小鼠血清中IL-6水平;b:小鼠血清中TNF-α水平 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图7 小鼠血清中IL-6、TNF-α含量比较

3 讨论

中耳炎的病程迁延,可引起注意力、认知感及听力下降,从而影响患者生活质量,严重者会引起颅内外并发症甚至危及生命[8-9]。CSOM患者鼓膜穿孔后,脓液一方面侵蚀听骨链听小骨,听骨链骨质破坏引起传导性耳聋,另一方面脓液也会循内耳圆窗破坏内耳的微细结构,造成感音神经性聋[10]。目前关于CSOM的标准治疗虽然已经有了多种方案,但无论手术治疗还是保守治疗,约有41%患者经过各种内外科治疗后耳溢液仍然持续存在,因此迫切需要发现新的生物标志物用于临床疗法的开发[11]。

CitH3与多种炎症疾病的形成有关,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等[12]。PAD4作为脒基转移酶超家族的成员,可以催化组蛋白H3的精氨酸残基瓜



a:小鼠耳组织中p-P65、P65蛋白条带;b:p-P65/P65定量图 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图8 小鼠耳组织中p-P65蛋白激活水平比较

氨酸化[13]。有研究表明,CitH3是一种常见的炎症疾病标志物,细胞外CitH3表现出高毒性,引起组织损伤,可能导致多器官衰竭并最终导致患者死亡。本研究结果显示,CSOM患者的中耳液和血清中PAD4和CitH3含量增加,且二者表达呈正相关,表明PAD4和CitH3参与了CSOM的发展,并提示PAD4可能介导CitH3的形成。

有研究发现,引发CSOM的致病菌主要是革兰氏阴性菌[14],其产物LPS可加剧CSOM的发病与病程进展。80%的中耳渗液中可发现LPS[15]。cl-amidine是一种PAD4抑制剂,可以抑制PAD4的酶活性,降低细胞中CitH3水平[16]。本研究通过少量多次向小鼠鼓室内注射LPS构建CSOM模型,然后通过中耳注射5 mg/kg cl-amidine抑制PAD4酶活性,结果表明,cl-amidine治疗可以缓解CSOM小鼠症状,恢复听力,并降低中耳组织和血清中CitH3的水平,表明PAD4可以通过促进CitH3形成而加重CSOM的发展。

CSOM的病因较多,其发病率可能受传染性病原体变异、宿主解剖结构和免疫状态的影响[17]。在分子水平上,CSOM是由促炎转录因子激活、炎症细胞因子产生和释放,黏液分泌增加、黏膜增生、白细胞浸润中耳腔等一系列复杂的生理过程驱动[18]。研究报道,NF-κB可通过刺激因子(病毒、肿瘤坏死因子、B细胞活化因子、淋巴毒素等)的活化诱导多种基因的表达,产生IL-6、TNF-α等多种细胞因子,参与炎症反应[19]。IL-6、TNF-α作为促炎细胞因子,均参与了细菌性和非细菌性急性中耳炎的持续炎症过程[20]。Zhao等[21]的研究发现,抑制PAD4可通过调节上皮细胞核p65定位来保护

LPS诱导的急性肺损伤。而本研究结果显示,使用cl-amidine抑制PAD4后,p-P65蛋白表达受到抑制,cl-amidine治疗可以降低CSOM小鼠耳组织与血清中的IL-6、TNF-α水平,缓解炎症反应。因此,PAD4介导CitH3生成可能通过活化NF-κB信号通路,增加炎症信号因子来加重CSOM进程,但具体的分子机制仍有待进一步研究。

综上所述,CSOM患者血清中PAD4与CitH3含量增加,且呈正相关,PAD4通过介导CitH3形成加重了CSOM,抑制PAD4酶活性可显著降低CitH3的表达水平,并通过抑制NF-κB信号通路抑制炎症细胞因子的表达。以上结果初步明确了PAD4介导CitH3形成在CSOM中的作用,可为进一步探索CSOM的治疗提供新的思路。

[参考文献]

[1] Morris PS, Leach AJ. Acute and chronic otitis media[J]. Pediatr Clin North Am, 2009, 56(6): 1383-1399. doi: 10.1016/j. pcl. 2009. 09. 007.

[2] Bhutta MF, Thornton RB, Kirkham LS, et al. Understanding the aetiology and resolution of chronic otitis media from animal and human studies [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(11): 1289-1300. doi: 10.1242/dmm. 029983.

[3] Tsourouktsoglou TD, Warnatsch A, Ioannou M, et al. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4[J]. Cell Rep, 2020, 31(5): 107602. doi: 10.1016/j. celrep. 2020. 107602.

[4] Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, et al. Citrullination is an inflammation-dependent process[J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(9): 1219-1222. doi: 10.1136/ard. 2005. 049403.

[5] Morita S, Nakamaru Y, Fukuda A, et al. The quantification of extracellular trap cell death-derived products as diagnostic biomarkers for otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and eosinophilic otitis media[J]. Otol Neurotol, 2022, 43(3): e337-e343. doi: 10.1097/MAO. 0000000000003431.

[6] Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation [J]. J Cell Biol, 2009, 184(2): 205-213. doi: 10.1083/jcb. 200806072.

[7] Yang C, Dong ZZ, Zhang J, et al. Peptidylarginine deiminases 4 as a promising target in drug discovery[J]. Eur J Med Chem, 2021, 226: 113840. doi: 10.1016/j. ejmech. 2021.

[8] 童兴科,孙永东,向小红. 基于水通道蛋白清窍胶囊(Qingqiao Capsule)治疗分泌性中耳炎小鼠模型机制的研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 20-21. doi: 10.19613/j. cnki. 1671-3141. 2018. 72. 007.

[9] Hang A, Brietzke SE. Otitis media: epidemiology and management[J]. Infect Disord Drug Targets, 2012, 12(4): 261-266. doi: 10.2174/187152612801319339.

[10] Lasminingrum L, Mahdiani S, Dermawan A, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the volume of chronic suppurative otitis media surgeries: a cohort retrospective study [J]. Ann Med Surg (Lond), 2022, 79: 103921. doi: 10.1016/j. amsu. 2022.

[11] Safari D, Wahyono DJ, Tafroji W, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance profile of haemophilus influenzae isolated from school children with acute otitis media[J]. Int J Microbiol, 2022, 2022: 5391291. doi: 10.1155/2022/5391291.

[12] Thålin C, Aguilera K, Hall NW, et al. Quantification of citrullinated histones: development of an improved assay to reliably quantify nucleosomal H3Cit in human plasma[J]. J Thromb Haemost, 2020, 18(10): 2732-2743. doi: 10.1111/jth. 15003.

[13] Li M, Lin C, Deng H, et al. A novel peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) inhibitor BMS-P5 blocks formation of neutrophil extracellular traps and delays progression of multiple myeloma[J]. Mol Cancer Ther, 2020, 19(7): 1530-1538. doi: 10.1158/1535-7163.

[14] Matar GM, Sidani N, Fayad M, et al. Two-step PCR-based assay for identification of bacterial etiology of otitis media with effusion in infected Lebanese children[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(5): 1185-1188. doi: 10.1128/JCM. 36. 5. 1185-1188.

[15] Schousboe LP, Ovesen T, Eckhardt L, et al. How does endotoxin trigger inflammation in otitis media with effusion?[J]. Laryngoscope, 2001, 111(2): 297-300. doi: 10.1097/00005537-200102000-00020.

[16] Subramanian V, Knight JS, Parelkar S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of tetrazole analogs of Cl-amidine as protein arginine deiminase inhibitors[J]. J Med Chem, 2015, 58(3): 1337-1344. doi: 10.1021/jm501636x.

[17] Kim BG, Choi DY, Kim MG, et al. Effect of angiogenesis and lymphangiogenesis in diesel exhaust particles inhalation in mouse model of LPS induced acute otitis media[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 824575. doi: 10.3389/fcimb. 2022. 824575.

[18] Serban R, Filip C, Radulescu LM, et al. IL-1α, IL-6 and IL-8 serum values in patients with chronic suppurative otitis media[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(5): 1226. doi: 10.3892/etm.

[19] Fujita K, Tokuda H, Yamamoto N, et al. Incretins amplify TNF-α-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts: Suppression of the IκB/NF-κB pathway [J]. Int J Mol Med, 2017, 39(4): 1053-1060. doi: 10.3892/ijmm. 2017. 2892.

[20] Barzilaia A, Dekel B, Dagan R, et al. Middle ear effusion IL-6 concentration in bacterial and non-bacterial acute otitis media[J]. Acta Paediatr, 2000, 89(9): 1068-1071. doi: 10.1080/713794564.

[21] Zhao X, Gu C, Wang Y. PAD4 selective inhibitor TDFA protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury by modulating nuclear p65 localization in epithelial cells[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88: 106923. doi: 10.1016/j. intimp. 2020. 106923.

(编辑:杨 颖)