肿瘤诊断与治疗 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.000796

嗅黏膜中 Caspase- 3 的表达对嗅神经细胞凋亡的影响

谢天飞[1]，娄卫华[2]
（1. 河南医学高等专科学校耳鼻咽喉科，郑州 451191；2. 郑州大学第一附属医院耳鼻咽喉科，郑州 450052）

[摘 要]目的：探讨大鼠急性鼻窦炎时嗅黏膜中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3（Caspase-3）的表达对嗅神经细胞（olfactory receptor neurons，ORNs）凋亡的影响。方法：将 70 只成年 SD 大鼠，按照配对设计，分成对照组和炎症组，造模后于不同时间取材，采用免疫组织化学方法检测嗅黏膜 Caspase-3 蛋白表达情况，原位细胞 DNA 断裂检测末端标记（TUNEL）法观察 ORNs 凋亡变化。结果：免疫组化结果，对照组 ORNs 中 Caspase-3 未见明显表达，炎症组 ORNs 中 Caspase-3 的表达在接种细菌后第 2 天开始升高，第 5 天明显升高（$P<0.05$），第 8 天达到高峰（$P<0.01$），第 14 天逐渐下降，第 21 天接近正常（$P>0.05$）。细菌接种后第 2、21 天，炎症组 TUNEL 阳性细胞计数与对照组相比没有统计学意义（$P>0.05$），第 5、8、14 天差异有统计学意义（$P<0.05$）。结论：急性鼻窦炎时 Caspase-3 的过度表达可能是促进大鼠 ORNs 凋亡，导致嗅觉功能下降的原因之一。

[关键词]急性鼻窦炎；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3；嗅神经元；细胞凋亡
[中图分类号]R765.4+1 [文献标志码]A [收稿日期]2015-02-05

Effects of excessive expression of Caspase-3 on the apoptosis of olfactory receptor neurons

Xie Tianfei[1]，*Lou Weihua*[2]
（*1. Department of Otorhinolaryngology，Henan Medical College；2. Department of Otorhinolaryngology，the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University*）

[Abstract] ***Objective*** To explore the effects of excessive expression of Caspase-3 on the apoptosis of olfactory receptor neurons (ORNs). ***Methods*** According to the matching design，70 adult SD rats were divided into two groups：control group and nasosinusitis group. The rats were sacrificed on 2 d，5 d，8 d，14 d and 21d after inoculating bacterium. The tissues were analyzed for the expression of Caspase-3 by immunohistochemical method and the apoptosis by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). ***Results*** Caspase-3 immunoreactivity in nasosinusitis group began to increase on 2 d，increased clearly on 5 d ($P<0.05$)，peaked on 8 d ($P<0.01$) and began to decline on 14 d，closed to the normal on 21 d. On 2 d and 21 d in nasosinusitis group，a little TUNEL positive cell appeared in the olfactory mucosa，peaked on 8 d ($P<0.05$) and began to decline on 14 d. ***Conclusion*** The expression of Caspase-3 may be a factor inducing the apoptosis of the ORNs.

[Key words] acute nasosinusitis；Caspase-3；olfactory receptor neurons；cell apoptosis

嗅觉是人们生活中重要的生理功能之一，嗅觉障碍会影响人的内脏反应和情绪活动，而引起嗅觉障碍的常见原因之一是鼻窦炎。已往文献报道 14%~30% 的慢性鼻窦炎患者伴有嗅功能异常[1]，其病变部位通常存在于第一级感觉神经元上，主要表现为嗅黏膜区嗅感觉神经元（olfactory receptor neurons，ORNs）明显减少[2]，而有研究报道 ORNs 在人的一生中是可以不断再生和更新的[3]，因此推测鼻窦炎可能会引起 ORNs 的破坏而使其不能再生，导致嗅黏膜上皮中的 ORNs 数量减少，嗅觉功能下降或丧失。本实验主要通过大鼠急性细菌性鼻_鼻窦炎模型，对大鼠 ORNs 中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3（Caspase-3）的表达进行观察，探讨 Caspase-3 对急性鼻窦炎时 ORNs 凋亡的影响，为临床治疗鼻窦炎引起的嗅觉障碍提供新的方法。

作者介绍：谢天飞，Email：xtfei7905@126.com，
研究方向：耳鼻咽喉科临床与教学。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151022.2102.024.html（2015-10-22）

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年 SD 大鼠 70 只（郑州大学医学院实验中心提供），无鼻腔或上呼吸道疾患。采用配对设计，将动物初始体

质量、日龄相近者配成对子，分为炎症组和对照组，各 35 只。各组取接种细菌后 2、5、8、14、21 d 等 5 个时间点，炎症组和对照组每个时间点 7 只大鼠。对照组大鼠平均体质量（283.51±7.69）g，平均日龄（87.03±3.29）d；炎症组平均体质量（284.17±7.66）g，平均日龄（88.06±2.62）d。

1.2 模型制作

1.2.1 方法 用水合氯醛（5 mg/kg 体质量）腹腔注射麻醉后，将小鼠鼻背正中的毛剪短，刮光。常规消毒，铺巾，先在大鼠鼻背正中线上切开一个长切口，选择右侧上颌窦，分离其前壁皮肤、皮下组织及骨膜，并用显微电钻在前壁钻一个直径约 1.5 mm 的小孔，然后用生理盐水冲洗上颌窦腔。经上颌窦前壁所钻小孔处，放入少量可吸收性止血海绵于上颌窦窦口，不完全堵塞窦口。用 1 ml 注射器抽取 0.3 ml 细菌悬浊液（金黄色葡萄球菌悬浊液），小心通过上颌窦前壁所钻小孔，注入窦口处的止血海绵上。手术创面用双氧水消毒后，逐层缝合骨膜、皮下组织及皮肤，整个过程严格按照无菌要求操作。对照组不进行细菌接种。动物于郑州大学医学院耳鼻喉科动物房饲养。

1.2.2 模型评价 炎症组从第 2 天起，部分大鼠出现饮食减少、活动减退、频繁搔抓鼻部皮肤等表现；第 5 天所有大鼠逐渐出现流脓涕、打喷嚏及结膜充血等症状。对照组大鼠未见异常。没有大鼠死亡。

1.3 组织学与免疫组织化学观察

1.3.1 取材、切片 分别于接种细菌后第 2、5、8、14、21 天处死各组大鼠。处死前给予水合氯醛（5 mg/kg 体质量）腹腔注射全身麻醉，开胸经左心室插管至主动脉用生理盐水进行灌注，冲净血液后，用 4%多聚甲醛（0.01 mol/L）灌注固定。断头、剔除鼻面骨周围的软组织后，将头部浸入新鲜配置的 4%多聚甲醛溶液中，置入 4 ℃冰箱内固定 48 h。脱钙后于解剖显微镜下剥离右侧包括鼻顶部嗅区黏膜鼻腔鼻窦黏膜组织，于上述固定液中固定 24 h。固定后的不同时间点的各组黏膜组织，随机分为 3 组，1 组做 HE 染色，1 组做免疫组织化学染色观察，1 组做 TUNEL 法观察。HE 染色和免疫组化染色 2 组黏膜组织经梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋后，标本切片厚度 4 μm。

1.3.2 HE 染色 切片脱蜡、水化后，进行 HE 染色，在 Olympus 光学显微镜下观察大鼠鼻腔黏膜病理改变情况，记录结果。

1.3.3 免疫组织化学染色 兔抗鼠 Casepase-3 多克隆作为一抗，按照免疫组织化学试剂盒（抗体和试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司）说明书进行操作。胞浆呈棕黄色者视为阳性细胞，采用盲法对炎症组阳性细胞数进行分析：由实验组织者对各时间点切片进行编号，并交由实验员；在 400 倍光镜视野下，实验员对提交的切片，随机选取大鼠嗅神经区 5 个视野，记录各视野 1 000 个 ORNs 中的阳性细胞数；实验组织者按编号，统计 5 个视野阳性细胞数的均值作为该时间点的阳性细胞数，结合对照组，进行数据分析。

1.4 TUNEL 法

TUNEL 试剂盒购于宝信生物工程公司，严格按说明书进行操作。荧光显微镜观察，激发光波长为 450~500 nm，发射光波长为 515~565 nm，阳性者显示为绿色荧光。计算 TUNEL 阳性细胞数量方法类似 1.3.3 节盲法，即在 400 倍光镜视野下，由实验员对 2 组各时间点编号的切片随机选取 5 个视野，计算出单位面积（0.01 mm²）中的阳性细胞数；实验组织者对阳性细胞数据进行分析处理。

1.5 统计学方法

数据应用 SPSS 13.0 软件处理，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间采用单因素方差分析，均数间两两比较采用 SNK-q 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 HE 染色结果

2.1.1 特征与解剖 大鼠具有与人相似的上颌窦和筛窦，但没有蝶窦和额窦。鼻窦与鼻腔是相通的，鼻腔黏膜分为呼吸区黏膜上皮和嗅区黏膜上皮。大鼠嗅上皮分布范围很广，十分发达，因此嗅觉很灵敏。

2.1.2 HE 染色结果 HE 染色显示，炎症组大鼠在细菌接种后第 2 天，嗅上皮纤毛和厚度无明显变化，鼻腔鼻窦可见少量红细胞渗出（见图 1A）；第 5 天可见黏膜下血管内充满红细胞，呈现出血性炎症（见图 1B）；在第 8 天纤毛几乎完全脱落，黏膜下出现中性粒细胞浸润，上皮细胞排列较乱（见图 1C）；至第 14 天炎症出现逐渐减轻趋势，炎症细胞数量开始减少，嗅上皮逐渐增厚（见图 1D）。在第 21 天炎症反应明显减轻，嗅上皮厚度及纤毛基本恢复（见图 1E）。对照组均未见炎症反应，纤毛结构清晰，黏膜上皮排列整齐，黏膜及黏膜下无明显炎症细胞浸润（见图 1F）。

2.2 嗅黏膜上皮 ORNs 中 Caspase-3 免疫组化染色结果

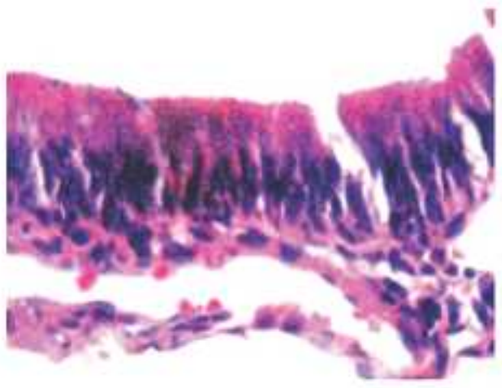
镜下观察炎症组 Caspase-3 大量表达的细胞表现为胞浆弥漫性着色，呈棕黄色颗粒；而对照组未观察到明显 Caspase-3 表达阳性细胞；炎症组在造模后第 2 天嗅区黏膜神经元细胞内 Caspase-3 开始表达，第 5 天明显增强（P<0.05），第 8 天达到高峰（P<0.01），染色最强（见图 2），其后逐渐减弱，第 21 天时接近正常（P>0.05），结果见表 1 和图 2。

进一步进行两两比较，炎症组和对照组分别于第 5 天（q=55.76，P<0.05）、8 天（q=160.73，P<0.01）、14 天（q=61.82，P<0.05）差异明显有统计学意义；第 2 天（q=1.12，P>0.05）、21 天（q=1.77，P>0.05）2 组相应时间点上比较差异无统计学意义。

2.3 TUNEL 法结果

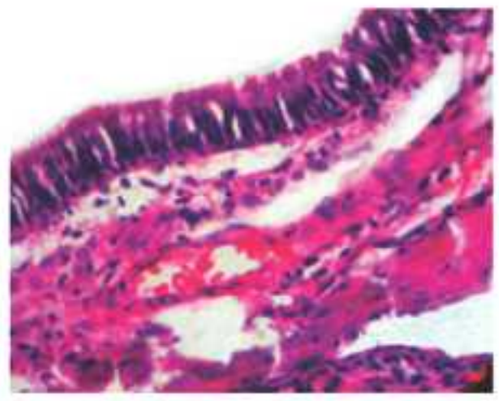
荧光显微镜下观察到凋亡的细胞显示为绿色荧光。对照组大鼠嗅黏膜上皮中仅见到少量绿色荧光点；炎症组第 2、5 天逐渐出现增多的阳性荧光点，第 8 天达到高峰，第 14 天逐渐减少，到第 21 天时基本恢复正常。凋亡的细胞主要位于嗅上皮的中下层。在 400 倍镜视野下，观察并记录各组不同时间点视野内荧光点的个数，结果见表 2。

进一步两两比较，炎症组和对照组分别于第 5 天（q=5.69，P<0.05）、8 天（q=12.67，P<0.05）、14 天（q=6.70，P<0.05）差异有统计学意义；炎症组第 2 天（q=0.88，P>0.05）、第 21 天（q=0.99，P>0.05）和对照组相应时间点差异无统计学意义。



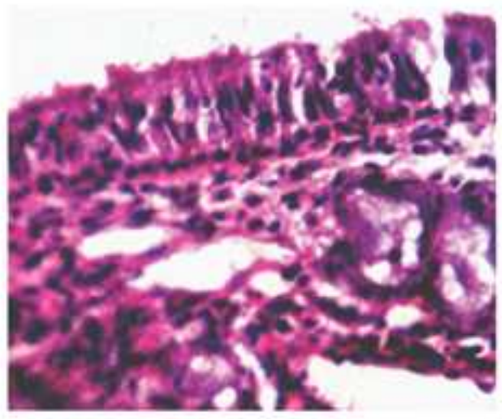
黏膜和黏膜下细胞排列整齐，纤毛排列尚齐，黏膜下血管腔略扩张，未见明显的白细胞渗出

A. 接种第 2 天



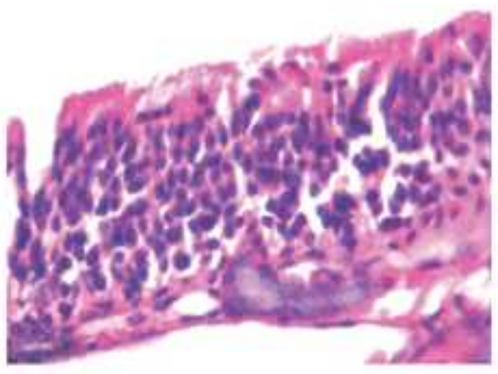
黏膜开始变薄，纤毛结构略紊乱，黏膜下血管充满大量红细胞，黏膜层可见少量白细胞

B. 接种第 5 天



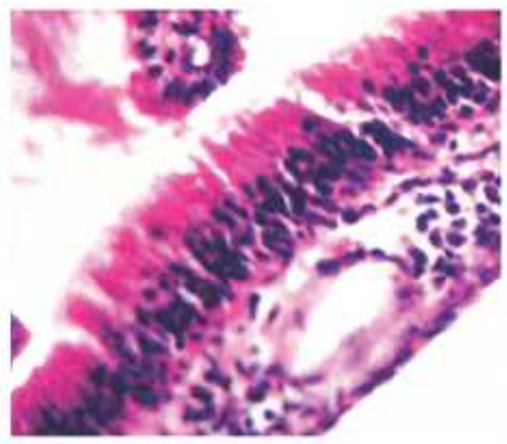
纤毛上皮结构紊乱，脱落明显，黏膜和黏膜下可见中性粒细胞渗出

C. 接种第 8 天



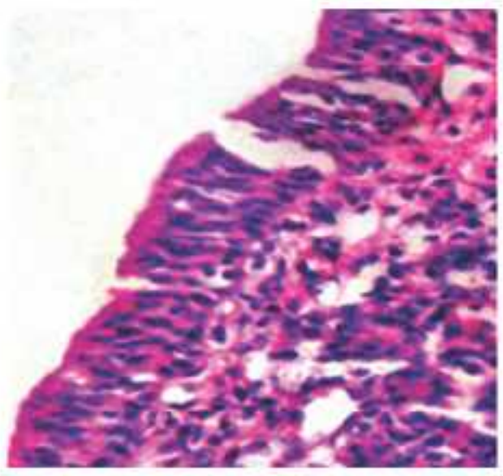
黏膜和黏膜下无明显的炎性细胞渗出，纤毛结构趋于恢复正常

D. 接种第 14 天



黏膜和黏膜下细胞结构基本恢复正常，无明显炎性细胞渗出

E. 接种第 21 天



上皮细胞排列整齐，纤毛无脱落，黏膜和黏下层无炎性细胞浸润，窦腔内无渗出物

F. 对照组

图 1　炎症组和对照组 HE 染色结果（400× ）

Fig.1　HE staining results in the inflammatory group and control group (400×)

表 1　Caspase-3 蛋白在大鼠嗅上皮中的表达结果

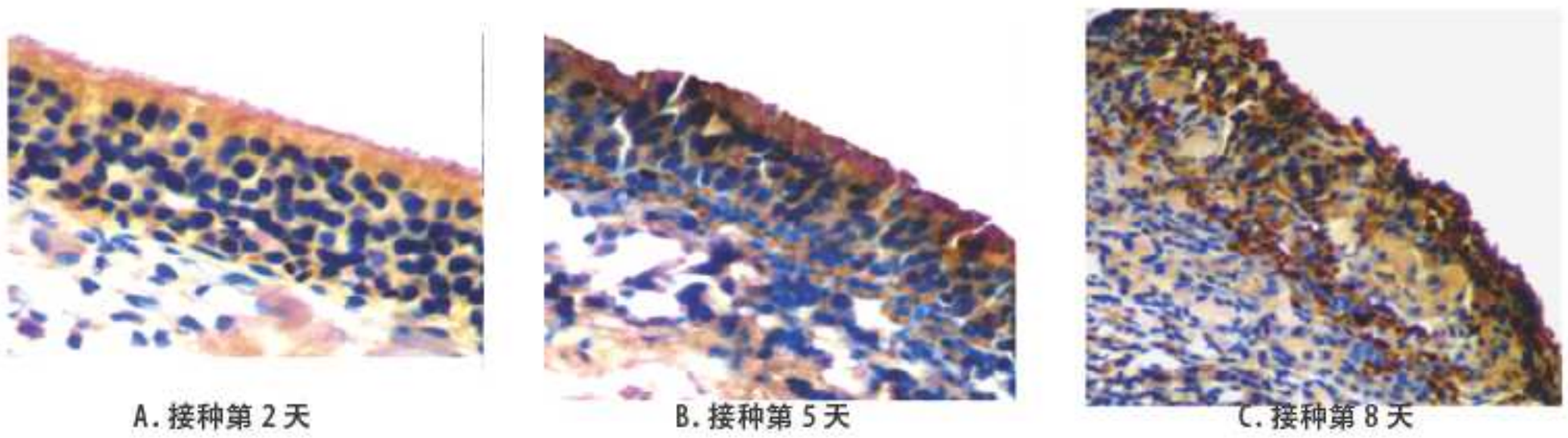
Tabl.1　Expression of Caspase-3 protein in rat olfactory epithelium

分组	第 2 天	第 5 天	第 8 天	第 14 天	第 21 天	*F* 值	*P* 值
对照组	4.77± 0.29	4.77± 0.24	4.78± 0.21	4.89± 0.23	4.70± 0.29	23.81	<0.05
炎症组	5.10± 0.53	21.16± 0.90	52.02± 0.39	23.03± 0.31	5.22± 0.55		

表 2　TUNEL 法凋亡细胞数分析结果

Tab.2　Results of TUNEL method for the analysis of apoptotic cells

分组	第 2 天	第 5 天	第 8 天	第 14 天	第 21 天	*F* 值	*P* 值
对照组	2.25± 0.84	2.63± 0.54	2.80± 0.83	2.80± 0.45	2.61± 0.87	25.37	<0.05
炎症组	2.83± 0.75	13.33± 1.86	32.17± 1.72	13.83± 1.17	3.17± 0.72		



A. 接种第 2 天　B. 接种第 5 天　C. 接种第 8 天

表达数量较多，主要位于胞浆中，染色呈棕黄色；炎症组第 5 天（B）Caspase-3 的表达较第 2 天（A）增多，第 8 天（C）极为明显

图 2　鼻窦炎大鼠嗅区黏膜 Caspase-3 的表达（免疫组织化学染色，400× ）

Fig.2　Expression of Caspase-3 in olfactory mucosa of rats with haso sinusitis（immunohistochemical staining，400× ）

3　讨　论

通常由鼻窦炎引起的嗅觉障碍在鼻塞减退后大多可恢复正常，即使 ORNs 被部分破坏，但嗅神经及嗅觉中枢是人类中枢神经系统内唯一具有再生能力的组织[4]，其会重新生长，促进嗅觉恢复。但有人观察到一些患者的嗅觉并未恢复正常，对这类患

者的嗅区黏膜活检，发现上皮下组织中嗅神经成分明显减少，说明 ORNs 存在凋亡现象，嗅上皮存在有较多的凋亡基因；亦有研究者 Kern[5]发现鼻窦炎伴嗅觉丧失患者的嗅上皮存在大量的凋亡细胞。而有很多种途径可以诱发细胞凋亡，一般是通过半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶（Caspase）家族的级联反应导致的。Caspase 是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶，与真核细胞的凋亡密切相关；其家族主要存在于细胞质中，参与细胞的生长分化及凋亡，在细胞凋亡中处于核心位置，能够选择性的切割某些底物蛋白质，造成细胞凋亡。其中 Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的凋亡执行者，是凋亡过程中最主要的终末剪切酶，因此 Caspase 家族介导的细胞凋亡最终通过激活 Caspase-3，催化裂解下游一系列的细胞内关键蛋白酶，导致细胞的结构及功能受损[6]。Saikumar 等[7]研究发现 Caspase-3 主要位于细胞凋亡通路下游，可被多种因素活化；经典的细胞内外凋亡途径可以引起线粒体释放细胞色素 C，然后直接作用于下游的 Caspase 家族蛋白水解酶，促使下游的 Caspase-3 等被激活；激活的 Caspase-3 分解细胞中的功能蛋白质，使细胞活性及生理机能丧失，不能发挥正常的功能，结果导致依赖性核酸内切酶的活性增高，进一步裂解核小体间的 DNA，促使 DNA 的特定部位断裂，细胞核结构变化，最终促使细胞走向凋亡。因此 Caspase-3 被认为是其家族中的关键蛋白酶[8]，与凋亡呈正相关，是细胞凋亡最直接、最关键的执行分子。故 Caspase-3 可被作为判断早期细胞凋亡的指标之一[9]。此外，其他研究证实，介导细胞凋亡的 Caspse-3，在不同刺激因素作用下可被激活，可存在于多种细胞中，触发细胞凋亡，并且 Caspase 介导的细胞凋亡过程可以被抗凋亡的药物所阻断[10]。

本实验先进行急性鼻窦炎模型的建立。实验中先在右侧上颌窦口填塞少量可吸收性明胶海绵，后注菌，菌液被预先填塞的海绵吸附滞留于窦腔，避免了处于麻醉状态的动物因体位而造成的菌液外漏，有利于造模成功。接种细菌后，炎症组大鼠鼻腔第 5 天可以观察到明显的白细胞集落，第 8 天达到高峰，第 21 天基本消失。对照组没有这些炎症表现。有文献报道在接种第 2 天时即可以看到黏膜下白细胞浸润，第 5 天达到高峰，而第 10 天时基本消退[11]。本实验的结果与报道有所不同，分析可能的原因是：①选用动物的差异，不同种属的动物对疾病和外界刺激的耐受性可能不同，出现的反应有所差异；②细菌菌种的特性不同。

本实验采用免疫组织化学方法观察了 Caspase-3 染色结果，炎症组大鼠嗅黏膜 ORNs 中的 Caspase-3 活性明显高于对照组，其表达在炎症组造模后第 5 至第 8 天明显增强，尤其第 8 天时达到高峰，染色最强，其后逐渐减弱，说明在大鼠急性细菌性鼻窦炎早中期，嗅黏膜 ORNs 中存在较高的细胞凋亡现象。通过 TUNEL 法观察了 ORNs 的凋亡情况，实验中发现大鼠急性鼻窦炎可以诱发 ORNs 凋亡程度急剧增加，即随着鼻窦炎程度的加重，ORNs 凋亡的数量也迅速增多，这说明炎症组大鼠的 ORNs 在炎症急性期存在相对较高的细胞凋亡现象，且凋亡的表达程度和炎症反应的程度相一致。综合本实验 2 种观察结果，急性细菌性鼻窦炎时 ORNs 凋亡大部分可能是通过与凋亡呈正相关的凋亡执行分子 Caspase-3 介导的，即鼻_鼻窦炎时，凋亡蛋白 Caspase-3 的大量激活表达可能促进了大鼠 ORNs 的破坏和凋亡，从而使 ORNs 数量减少，使嗅素到达嗅裂时，无法与足够数量的 ORNs 结合，导致嗅觉功能下降或丧失。

参 考 文 献

[1] Holbrook EH，Leopold DA.An update dreview of clinical olfaction [J].Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg，2006，14(1)：23-28.

[2] 刘庆华，李志春.慢性鼻窦炎嗅觉障碍嗅上皮中 IGF-1R 和 Ki-67 的表达及意义[J].山东大学耳鼻喉眼学报，2011，25(3)：55-61.

[3] Miwa T，Moriizumi T，Horikawal，et al.Role of nerve growth factor in the olfactory system[J].Micro Res Tech，2002，58(3)：197-203.

[4] Kivity S，Optega-Hernandez OD，Shoenfeld Y. Olfaction-a window to the mind[J].Isr Med Assoc J，2009，11(4)：238-243.

[5] Kern RC. Chronic sinusitis and anosmia：pathologic changes in the olfactory mucoso[J].Laryngoscope，2000，110(9)：1071-1077.

[6] Kuranaga E.Caspase signaling in animal development[J].Dev Growth Differ，2011，53(2)：137-148.

[7] Saikumar P，Dong Z，Mikhailov V，et al.Apoptosis：definition，mechanisms，and relevance to disease[J].Am J Med，1999，107(5)：489-506.

[8] Brot S，Rogemond V，Perrot V，et al.CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth，thereby modulating the function of CRMP2 [J].J Neurosci，2010，30(32)：10639-10654.

[9] Yun N，Kim C，Cha H，et al.Caspase-3-mediated cleavage of PICOT in apoptosis[J].Biochem Biophy Res Commun，2013，432(3)：533-538.

[10] Müller MM，Middelanis J，Meier C，et al.17β-estradiol protects 7-day old rats from acute brain injury and reduces the number of apoptotic cells[J].Reprod Sci，2013，20(3)：253-261.

[11] Kara CO，Cetin CB，Demirkan N，et al.Experimental sinusitis in a rhinogenic model[J].Laryngoscope，2004，114(2)：273-278.

（责任编辑：冉明会）