DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.028
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
1866 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1866-03

嗜酸性粒细胞趋化因子在鼻内镜术腔粘膜中表达变化的研究

施祝良,张学渊 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉头颈外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)在鼻内窥镜术腔粘膜转归过程中表达变化规律。方法 采用Westem blot与免疫组织化学技术检测eotaxin在10例Ⅰ型Ⅱ型慢性鼻窦炎患者功能性鼻窦开放术后术腔粘膜恢复过程中的表达变化。结果 Eotaxin蛋白在正常鼻粘膜中少量表达,而在慢性鼻窦炎粘膜或息肉中明显升高,且随时间呈现如下变化规律:①术后1~2周较术前明显降低($P<0.01$);②术后4~6周达高峰,基本恢复至术前水平;③术后10~12周回落,接近于术后1~2周水平。结论 Eotaxin在内窥镜鼻窦术腔粘膜转归过程中可能起重要作用。

关键词:免疫组化;western-blot法
中图法分类号:R322.31;R392.11;R765.041 文献标识码:A

Changes of eotaxin expression during different phrases of recovery process of mucosa in sinus cavity after endoscopic sinus surgery

SHI Zhu-liang, ZHANG Xue-yuan (Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of eotaxin expression during different phrases of recovery process of mucosa in sinus cavity after endoscopic sinus surgery. Methods Expression of eotaxin during different phrases of recovery process of mucosa in sinus cavity in 10 patients with type Ⅰ and type Ⅱ chronic sinusitis after endoscopic sinus surgery was determined by immunohistochemitry and Western blotting. Results At 1—2 weeks after surgery, there was a significant difference in expression of eotaxin ($P<0.01$). The expression of eotaxin peaked at 4—6 weeks after surgery and nearly recovered the preoperative level. At 10—12 weeks after surgery, the expression of eotaxin decreased, tending to the level at 1—2 weeks after surgery. Conclusion Eotaxin is involved in the recovery process of mucosa in sinus cavity after endoscopic sinus surgery.

Key words: immuohistochemistry; Western blot

功能性内窥镜鼻窦手术(functional endoscopic sinus surgery, FESS)术后粘膜水肿增生及息肉复发影响其手术效果,是临床亟待解决的难题。嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)在FESS后不同时期术腔粘膜中的表达,目前国内外尚少见报道。本研究旨在初步探讨在内窥镜鼻窦术腔粘膜转归过程中eotaxin的表达变化规律,为深入探讨eotaxin与术后粘膜上皮化之间的关系,进而解决鼻窦功能性开放术后粘膜水肿及息肉复发提供依据和思路。

1 材料与方法

1.1 病例分组及取材

2003年3—6月到我科就诊并行FESS的慢性鼻窦炎Ⅰ型或Ⅱ型患者(参照1997年海口会议制定的慢性鼻窦炎鼻息肉诊断与治愈标准[1],最后均经病理学证实)中各选取10例为研究对象,所有病例均于术中、术后1~2周、术后4~6周及术后8~12周取上颌窦口周边水肿的鼻粘膜组织。对照组10例,为2003年3—6月在我科住院的鼻中隔偏曲病或单纯上颌窦囊肿诊鼻内镜手术患者的中鼻粘膜。上述标本离体后迅速于液氮中保存备用。

1.2 免疫组织化学法检测鼻粘膜组织的eotaxin阳性细胞率

标本经4%多聚甲醛固定4~6 h后5 μm连续冰冻切片。参照SP-9003免疫组织化学试剂盒(北京中心生物技术有限公司产品)说明书进行。大鼠抗人eotaxin多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology产品)稀释度为1∶200(阴性对照用PBS代替eotaxin多克隆抗体),辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠的二抗(北京中山生物技术有限公司产品)稀释度为(1∶100)。二氨基联苯(DAB)显色,苏木精复染,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜观察,以细胞浆中出现棕黄色染色为阳性细胞,并计数阳性细胞百分率:每个标本取4张切片,每张切片选择10个高倍视野(10

作者简介:施祝良(1970—),男,浙江省宁波市人,硕士研究生,主治医师,主要从事鼻窦疾病方面的研究。电话:(023)68754405
通信作者:张学渊,电话:(023)68754405
收稿日期:2004-03-31;修回日期:2004-09-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

×40), 计数每个高倍视野中的阳性细胞及细胞总数, 计算百分率, 取其均值作为该标本的阳性细胞百分率。阴性对照片中未见棕黄色染色。

1.3 Western blot 法检测鼻粘膜中 eotaxin 蛋白的表达[2]

鼻粘膜组织用细胞裂解液 RIPA (1× PBS, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5 mmol/L EDTA, 0.5% 去氧胆酸钠, 1 mmol/L 偏钒酸钠, 1 mmol/L PMSF) 1 ml 于 4 ℃条件下裂解 20 min (其间震荡数次), 12 000× *g* 4 ℃离心 2 min, 取上清液经考马氏亮蓝法蛋白定量。上清液用 Tricine-甘氨酸系统电泳后, 电转移至 0.22 μm 硝酸纤维素膜, 该膜经含 1% BSA 的 TBS (50 mmol/L pH 7.5) 振摇 2 h, 于 4 ℃封闭过夜后, 与大鼠抗人 eotaxin 多克隆抗体 (稀释度 1∶500) 在 4 ℃下孵育过夜, 再与辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠的二抗 (稀释度 1∶500) 室温下孵育 90 min, 最后经 ECL 发光试剂盒显影, X 光胶片记录结果。并用 Quantity one Version 4.4 软件测定蛋白条带的积分密度 (IOD)。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学法检测鼻粘膜组织的 eotaxin 阳性细胞率

Eotaxin 蛋白主要表达于增生的腺体上皮细胞胞质中, 部分分泌至细胞外。在正常鼻粘膜中阳性细胞少, 在慢性鼻窦炎粘膜或息肉中阳性细胞数明显增多, 在 FESS 术后术腔粘膜中的阳性细胞数随时间呈现如下变化规律: 术后 1~2 周较术前明显降低 ($P=0.027$), 但术后 4~6 周达高峰, 基本恢复至术前水平 ($P=0.998$), 术后 10~12 周明显回落, 接近于术后 1~2 周水平 ($P=0.983$) (图 1、2, 表 1)。



A small quantity of expression of eotaxin protein in nasal mucosa of the normal person

图 1　正常人鼻腔粘膜 **eotaxin** 免疫组化染色　(S-P× 400)

Fig 1　Immunochemical staining of eotaxin in nasal mucosa of the normal person　(S-P× 400)



Eotaxin protein was mainly expressed in cytoplasm of hyperplastic gland epithelial cells. Percentage of positive cells in hyperplastic gland epithelial cells was significant higher than that in nasal mucosa of normal person

图 2　鼻内窥镜术后 4~6 周术腔粘膜 **eotaxin** 免疫组化染色　(S-P× 400)

Fig 2　Immunochemical staining of eotaxin in sinu cavity mucosa at 4 − 6 weeks after endoscopic surgery　(S-P× 400)

表 1　**ESS** 手术前后鼻粘膜组织中 **eotaxin** 阳性细胞百分率的变化 (***n*= 10**)

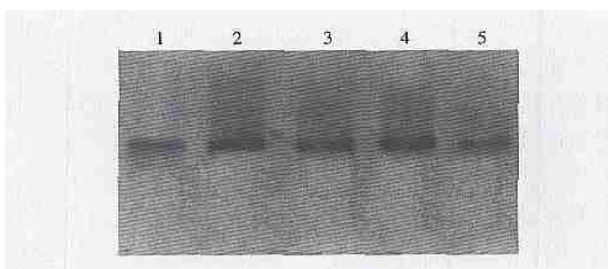
Tab 1　Percentages of eotaxin positive cells in different phrases of recovery process of mucosa in sinus cavity after endoscopic surgery (*n*= 10)

Group	Percentage of eotaxin positive cells (%, $\bar{x}\pm s$)
Control	12.90±6.026
Preoperative	48.41±18.01 **##
1−2 weeks after surgery	25.36±6.21 **
4−6 weeks after surgery	43.52±11.15 **##
10−12 weeks after surgery	21.56±10.25

$F=18.008$　$P=0.000$;　**: $P<0.01$ *vs* control;　##: $P<0.01$ *vs* 1−2 week after endoscopic surgery

2.2 Western blot 法检测鼻粘膜中 eotaxin 蛋白的表达

对照组、术前组及术后各组中 eotaxin 蛋白条带的积分密度分别为 0.348±0.09, 0.722±0.181, 0.410±0.137, 0.800±0.229, 0.464±0.110, 其变化规律与免疫组化结果基本一致 (图 3、4)。

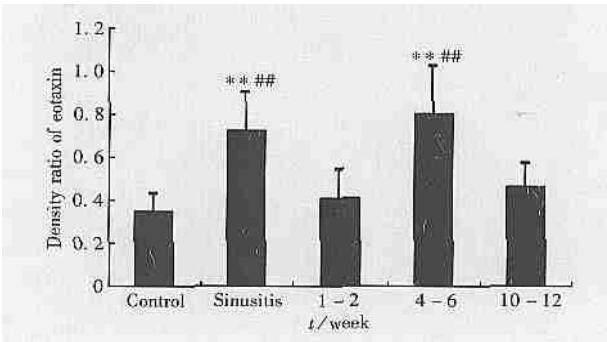


1: Nasal mucosa of normal persons; 2: Chronic sinus mucosa of patients; 3: Sinus cavity mucosa at 1−2 weeks after endoscopic surgery; 4: Sinus cavity mucosa at 4−6 weeks after endoscopic surgery; 5: Sinus cavity mucosa at 10−12 weeks after endoscopic surgery

图 3　**Eotaxin** 蛋白在 **FESS** 术腔粘膜中的表达 (**Western blot** 法)

Fig 3　Western blotting of eotaxin protein

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



$F=15.670$, $P=0.000$; **: $P<0.01$, *vs* control; ##: $P<0.01$, *vs* 1—2 weeks after endoscopic surgery

图 4 **Eotaxin** 蛋白含量在 **FESS** 手术前后鼻粘膜组织中表达的变化规律

Fig 4 Percentages of eotaxin protein in different phrases of recovery process of mucosa in sinus cavity after endoscopic surgery

3 讨论

随着功能性内窥镜鼻窦手术(FESS)的逐渐成熟,手术术腔粘膜上皮化的优劣已经成为从整体上影响手术疗效的重要原因。术后粘膜组织水肿、息肉样增生组织、炎性细胞浸润等均严重影响粘膜的上皮化[3],从而影响手术效果;从分子水平探讨影响术腔粘膜上皮化的因素将为后续提高和改善内窥镜鼻窦手术的术后处理措施提供一定的理论基础,具有重要的临床意义。

eotaxin 是由呼吸道粘膜上皮细胞和炎性细胞分泌的小分子量多肽,它对嗜酸性粒细胞有特异的趋化和激活作用,是目前为止发现的惟一对嗜酸性粒细胞特异趋化的因子,也被认为对嗜酸性粒细胞趋化作用最强的细胞因子[4]。

本实验表明,术后 1~2 周 eotaxin 明显降低,可能是因为术腔内微环境发生改变,病变粘膜及其所包含的炎症细胞、细胞因子明显减少所致;术后 4~6 周术区缺损粘膜及神经逐渐修复,但术腔粘膜纤毛功能恢复不全,不能形成"粘液毯",包括 eotaxin 在内的细胞因子不能及时带走,进而募集并激活以嗜酸性粒细胞为主的炎性细胞,这些炎性细胞又分泌各类细胞因子,形成"自我放大"[5,6]。另外,修复过程中的神经末梢处于暴露状态,对各类神经肽的刺激较敏感,导致血管扩张,腺体分泌增加。Savino 等认为免疫系统与神经系统之间直接的双向调节,细胞因子和神经肽作为其中的活性物质,在鼻腔、鼻窦粘膜的病理变化过程中相互作用,调节炎症的进展或消退。所以 eotaxin 表达达高峰,术区粘膜水肿较明显,部分呈息肉样变。在这个过程中如果粘膜及纤毛修复能力超过炎性细胞及各类细胞因子对上皮化的影响,则术腔向完整上皮化方向发展。反之,术腔粘膜进一步水肿,息肉复发;术后 10~12 周,大部分患者术腔粘膜逐步完成上皮化,同时随着术腔粘膜的恢复,降解神经肽的酶可能也逐渐增多,神经肽减少,神经末梢不再暴露,敏感度下降。纤毛功能恢复,及时把包括 eotaxin 在内的细胞因子通过"粘液毯"带走,所以粘膜组织中 eotaxin 表达减少,术腔粘膜水肿不明显。

目前大多数学者认为鼻腔中粘膜水肿、息肉形成由于局部各类细胞因子自分泌正反馈作用的结果。Eotaxin 作为其中重要的细胞因子之一,其表达的变化提示术腔各类细胞因子自分泌正反馈作用的水平[6,7]。本实验中术后 4~6 周 eotaxin 显著增多,考虑这一阶段为术后粘膜上皮化的关键时期,提示我们在临床上应该加强这段时期的治疗(换药、术腔冲洗、局部用药)。以利尽早完成术腔粘膜上皮化,避免神经末梢暴露,恢复纤毛功能。

参考文献:

[1] 中华医学会耳鼻咽喉科学会, 中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会. 附: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]. 中华耳鼻喉科杂志, 1998, 33(3): 134.

[2] Sato T, Saito R, Jinushi T, *et al*. IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(2): 468—475.

[3] 许 庚, 李 源, 谢民强, 等. 功能性内窥镜手术后术腔粘膜转归阶段的划分及处理原则[J]. 中华耳鼻喉科杂志, 1999, 34(5): 301—305.

[4] Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, *et al*. Nasal polyposis: from cytokines to growth[J]. Am J Rhinol, 2000, 14(5): 279—290.

[5] Wong C K, Zhang J P, Ip W K, *et al*. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB in tumour necrosis factor-induced eotaxin release of human eosinophils[J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(3): 483—489.

[6] Min Y G, Kin Y J, Yun Y S. Distribution of eosinophil granule proteins in nasal mucosa of atopic patients with nasal polyposis[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1996, 58(2): 82—86.

[7] Gorski P, Wittczak T, Walusiak J, *et al*. Eotaxin but not MCP-3 induces eosinophil influx into nasal fuluid in allergic patients[J]. Allergy, 2002, 57(6): 519—528.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net