

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.018

TLR-8 在慢性伴鼻息肉中的表达

柳 笛¹, 史文静^{2△}, 李重文³(1. 山西医科大学第二临床医学院临床医学系, 太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院西院
防保科, 太原 030053; 3. 山西医科大学第二医院西院耳鼻喉科, 太原 030053)

[摘要] **目的** 通过检测鼻黏膜上皮组织中 Toll 样受体(TLR)-8 的表达, 揭示慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的发病机制。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 18 例鼻中隔偏曲伴下鼻甲肥大患者下鼻甲鼻黏膜上皮组织(对照组)和 50 例慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(鼻息肉组)黏膜上皮组织中 TLR-8 的表达。应用 SPSS13.0 软件对鼻息肉组及对照组相关指标进行统计学分析。**结果** TLR-8 在鼻息肉组中的平均光密度值为 0.52 ± 0.06 , 而在对照组中为 0.30 ± 0.05 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。鼻息肉组和对照组中 TLR-8 蛋白的阳性表达率分别为 76.0% 和 27.8%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TLR-8 可能参与了鼻黏膜上皮细胞免疫防御性炎症反应。

[关键词] 人鼻黏膜上皮组织;慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉;TLR-8**[中图分类号]** R765.04 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)05-0799-04

Expression of TLR-8 in chronic rhinosinusitis complicating nasal polyps

LIU Di¹, SHI Wenjing^{2△}, LI Chongwen³

(1. Faculty of Clinical Medicine, Second College of Clinical Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Prevention and Health Care, Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030053, China; 3. Department of Ear-Nose-Throat, West Hospital of Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030053, China)

[Abstract] **Objective** To reveal the pathogenesis of chronic rhinosinusitis complicating nasal polyps by detecting the expression of Toll-like receptor-8 (TLR-8) in nasal mucosa epithelial tissue. **Methods** The expression of TLR-8 in inferior turbinate mucosal tissue of 18 patients with nasal septum deviation complicating inferior turbinate hypertrophy (control group) and in mucosal epithelial tissue of 50 patients with chronic rhinosinusitis complicating nasal polyps (nasal polyps group) were detected by using the immunohistochemistry method. The SPSS13.0 software was used to conduct the statistical analysis on the related indicators in the nasal polyps group and control group. **Results** The average integral optical density value of TLR-8 in the nasal polyps group was 0.52 ± 0.06 , which in the control group was 0.30 ± 0.05 , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression rates of TLR-8 in the nasal polyps group and the control group were 76.0% and 27.8%, respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** TLR-8 might participate in immune defensive response of nasal mucosal epithelial cells.

[Key words] human nasal epithelial tissues; chronic rhinosinusitis complicating nasal polyps; TLR-8

慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉是耳鼻咽喉头颈外科的一种常见病和多发病。它以反复发作和持续性黏膜炎症为主要特征。鼻黏膜作为呼吸道天然免疫的第一道防线,它通过产生自然抗微生物因子和启动炎症反应对微生物做出反应。上皮组织还是产生细胞因子、化学因子和其他炎症因子的重要来源^[1],其中 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)在鼻黏膜免

疫中的作用越来越受到人们的重视^[2-3]。研究表明,TLRs 在人鼻黏膜中有表达,并且参与了鼻黏膜的免疫防御,对鼻黏膜抵抗微生物入侵发挥关键作用^[4]。

TLR-8(Toll-like receptor 8)作为 TLRs 的成员,主要识别单链 RNA,参与病毒感染,其活化的信号传导属于经典的 Toll 样信号通路,可介导 MyD88 依赖型信号通路,启动 NF- κ B 途径和应激激酶途径,最终

导致炎性反应^[5-6]。尽管已有揭示 TLRs 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的发生与发展中作用的报道^[7],然而少见有关 TLR-8 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉发病过程中的作用和表达调控机制的报道。本文通过免疫组织化学技术,研究鼻中隔偏曲伴下鼻甲肥大患者下鼻甲鼻黏膜上皮组织和慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉黏膜上皮组织中 TLR8 的表达情况,探讨其在人鼻黏膜上皮组织免疫中的作用,揭示慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉发病机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月至 2015 年 4 月山西医科大学第二医院 18 例鼻中隔偏曲伴下鼻甲肥大患者下鼻甲鼻黏膜上皮组织作为对照组,排除慢性鼻窦炎、过敏性鼻炎性疾病,其中男 11 例,女 7 例,平均年龄(31.0±4.8)岁,再选取 50 例慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉黏膜上皮组织标本作为鼻息肉组,其中男 34 例,女 16 例,平均年龄(44.0±6.7)岁。所采用病例术前经临床症状、体征、内窥镜检查、CT 检查及术后病理证实。所有患者排除 1 周内上呼吸道感染、类固醇药物及抗组胺药物等应用史,标本收集前告知患者并取得患者同意及签署同意书,且本研究方案通过医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 小鼠抗人 TLR-8 多克隆抗体购于启动子生物有限公司。免疫组织化学检测试剂盒与抗体专用稀释液购于武汉博士德生物工程有限公司。DAB 显色试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。磷酸盐缓冲液(PBS)与枸橼酸钾缓冲液均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 实验方法 本实验采用免疫组织化学方法。钳取鼻息肉组患者息肉头端组织;根据以往文献中相关手术操作方案^[8-10],取同时行中鼻甲切除术和鼻中隔偏曲矫正术的患者中鼻甲头端距上缘约 5 mm 处一约 3 mm×3 mm 大小黏膜组织作为对照组。取材后固定、包埋。蜡块连续 4 μm 切片后置于 47 °C 温水中,选取平整的切片于事先经防脱片处理过的载玻片上摊片、烤片(60~62 °C) 12~18 h,脱蜡水化后放入 3% H₂O₂,在室温下孵育 10 min,然后用蒸馏水和 PBS 分别洗涤 3 次,并用 0.01 mmol/L 枸橼酸盐缓冲

液(pH 6.0)于高压锅中进行抗原修复,PBS 洗涤 3 次。除去 PBS,于室温下放置 25 min 后,除去血清加一抗[TLR-8 切片加 1 滴第一抗体(TLR-8 抗体滴度为 1:400),PBS 代替一抗作为阴性对照,湿盒中 4 °C 过夜]。24 h 后加二抗(PBS 冲洗 4 次,除去 PBS,每张切片加 1 滴生物素标记的第二抗体,室温下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次)。加三抗(除去 PBS,每张切片加 1 滴链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 30 min,PBS 冲洗)。DAB 显色后,苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片、镜检。

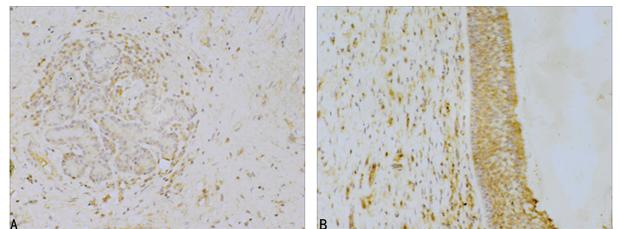
1.2.3 结果判定 应用 BI-2000 病理图文分析系统进行图像采集。细胞染色强度分为:阴性(-)为不着色,弱阳性(+)为淡黄色,阳性(++)为棕黄色,强阳性(+++)为深棕黄色。

1.2.4 平均积分光密度值(AIOD)的测定 每张组织切片于 400 倍镜下取 5 个阳性部位,所取部位均不重叠,在测量窗标准相同的前提下,经校正后测量位于阳性目标区域内的积分光密度值,将所测的积分光密度值取均值即为 AIOD,其值越大表示炎性反应越强。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理。计数资料以率表示,比较采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,进行 Pearson 相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 TLR-8 在鼻中隔偏曲伴下鼻甲肥大患者下鼻甲鼻黏膜上皮组织和慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉黏膜上皮组织中均有表达。阳性细胞染色后呈淡黄色到深棕黄色分布,主要位于细胞质,细胞膜上也有分布。见图 1。



A: 对照组; B: 鼻息肉组

图 1 TLR-8 在对照组和鼻息肉组的表达(×200)

表 1 TLR-8 在鼻息肉组和对照组中的阳性表达率[% (n/n)]

组别	n	阳性表达率	+	++	+++	-
鼻息肉组	50	76.0(38/50)	62.0(31/50)	10.0(5/50)	4.0(2/50)	24.0(12/50)
对照组	18	27.8(5/18)	16.7(3/18)	5.6(1/18)	5.6(1/18)	72.2(13/18)

2.2 AIOD 测定结果 TLR-8 在鼻息肉组中的 AIOD 为 0.52 ± 0.06 , 而其在对照组中为 0.30 ± 0.05 , 鼻息肉组明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。鼻息肉组中 TLR-8 蛋白的阳性表达率为 76.0% (38/50), 明显高于对照组的 27.8% (5/18), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉具有持续性黏膜炎症的特征, 天然免疫和获得性免疫在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉发生、发展中起重要作用。天然免疫系统对病原体的识别涉及模式识别受体 (PRRs) 和病原相关分子模式的相互作用。最广泛具有特征性的跨膜 PRRs 是 TLRs。目前, 已经发现 TLRs 家族包含 11 种受体, 分别对不同种类的配体具有特异识别性^[11]。

近年来, TLRs 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉发病机制中的作用引起了人们广泛关注。2012 年, LAURIELLO 等^[12] 对不同类型鼻炎中 TLR-4 和 TLR-9 表达水平的研究发现, 人正常鼻黏膜上皮细胞中有 TLR-4 和 TLR-9 表达, 在变应性鼻炎中其表达显著下降, 然而在慢性鼻-鼻窦炎中 TLR-4 表达显著提高。2013 年, 夏忠芳等^[13] 借助免疫组织化学方法检测了儿童慢性鼻-鼻窦炎鼻黏膜组织和正常鼻黏膜组织中 TLR-9 蛋白的表达和分布, 发现 TLR-9 在实验组和对照组中均有表达, 且在慢性鼻-鼻窦炎鼻黏膜组织低表达。MELVIN 等^[14] 发现囊性纤维化病伴慢性鼻窦炎患者中, TLR-9 在鼻黏膜上皮细胞中的表达显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外, TLRs 在鼻息肉组织中的表达也引起了人们极大兴趣。2013 年, 顾兆伟等^[15] 采用免疫组织化学技术检测了慢性鼻窦炎鼻息肉组织中 TLR-2 和 TLR-4 蛋白的表达和分布, 同时选取正常筛窦黏膜进行对照。结果表明 TLR-2 和 TLR-4 表达水平可能与慢性鼻窦炎鼻息肉的发病机制存在着一定的关联。ZHAO 等^[16] 对正常鼻黏膜和鼻息肉组织中 TLR-9 蛋白质表达进行了系统的比较, 发现感染性因素对鼻息肉发病有重要影响。汪际云等^[17] 对鼻黏膜中 TLR-5 表达的研究发现, 在所有息肉组织标本中均检测到 TLR-5 mRNA 和蛋白表达, 推测鼻息肉组织中 TLR-5 表达的提高可能与鼻息肉内持续的炎症状态密切相关。ZHANG 等^[18] 借助基因芯片技术初步发现 TLR-7 在慢性鼻-鼻窦炎细胞有显著表达。总之, 尽管人们对 TLRs 在慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉黏膜上皮组织中的表达进行了大量研究, 但对于人鼻黏膜上皮组织中 TLR-8 的表达鲜有报道。

本研究发现, 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉黏膜上皮组织和鼻中隔偏曲伴下鼻甲肥大患者下鼻甲鼻黏

膜上皮组织中均检测到的 TLR-8 的表达。由于蛋白质是机体生理功能的直接执行者, 因此, 鼻黏膜上皮有 TLR-8 蛋白行使功能。

本研究显示, 鼻息肉组黏膜上皮组织中 TLR-8 的 AIOD 和蛋白的阳性表达率均显著高于对照组下鼻甲鼻黏膜上皮组织。这一结果表明在鼻-鼻窦炎伴鼻息肉炎症过程中, 炎症刺激能上调 TLR-8 在鼻黏膜上皮细胞中的表达, 表明 TLR-8 可能参与了鼻黏膜上皮细胞免疫防御性炎症反应, 参与了鼻黏膜的免疫防御。鼻息肉在遭受病原微生物侵害时, 参与 TLR-8 相关的免疫反应对病原微生物的限制和清除能力较强, TLR-8 对鼻黏膜抵抗微生物入侵可能发挥关键作用。研究表明, TLR-8 可介导 MyD88 依赖型信号通路^[5-6]。因此, 结合以往文献可以推测, 慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的形成可能是 TLR-8 的信号通过 MyD88 途径, 引起了 NF- κ B 及各种酶 (如蛋白激酶, 基质金属蛋白酶-9 等) 的活化, 从而引起了嗜酸性粒细胞的活化, 形成炎症。同时, 嗜酸性粒细胞在鼻黏膜上皮细胞产生的细胞因子和间质细胞中的成纤维细胞的活化下发生了聚集和间质的纤维化的现象, 改变了上皮细胞纤毛系统生物电特性, 使鼻黏膜组织内环境遭到破坏, 水分和离子代谢失衡, 使水分进入细胞内和间质中, 形成组织水肿, 导致鼻息肉发生和发展。因此, 若能深入研究 TLR-8 参与鼻黏膜上皮细胞免疫防御性炎症慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉反应机制, 必将为慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的免疫治疗方向提供更系统的理论依据。

综上所述, 本研究初步证实了 TLR-8 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉上皮组织中高表达, 其能在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉发生、发展中起重要作用。因此, 在临床中测定 TLR-8 的表达, 必将有助于慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉的确诊与治疗。

参考文献

- [1] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [2] KUMAGAI Y, AKIRA S. Identification and functions of pattern-recognition receptors [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5): 985-992.
- [3] BASITH S, MANAVALAN B, YOO T H, et al. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8): 1297-1316.
- [4] VANDERMEER J, SHA Q, LANE A P, et al. Innate immunity of the sinonasal cavity: expression of messenger RNA for complement cascade components and toll-like re-

- ceptors[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 130(12):1374-1380.
- [5] THOMPSON M R, KAMINSKI J J, KURT-JONES E A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection[J]. Viruses, 2011, 3(6):920-940.
- [6] LUND J M, ALEXOPOULOU L, SATO A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(15):5598-5603.
- [7] RIFKIN I R, LEADBETTER E A, BUSCONI L, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2005, 204(1):27-42.
- [8] 黄朝平, 张建辉, 朱力, 等. 紧密连接蛋白 Claudin-1 与变应性鼻炎发病机制相关性初探[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2014, 14(5):283-286.
- [9] 刘锐越, 刘涛, 周华容. TLR5 在变应性鼻炎患者鼻黏膜组织中的表达[J]. 中国医药科学, 2014, 4(3):58-62.
- [10] 李杰恩, 唐臻臻, 王扬, 等. 改良切口的鼻中隔成形术疗效观察[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2016, 20(1):38-42.
- [11] LICHTENEGGER F S, MUELLER K, OTTE B, et al. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e44266.
- [12] LAURIELLO M, MICERA A, MUZI PAOLA, et al. TLR4 and TLR9 expression in different phenotypes of rhinitis[J]. Int J Otolaryngol, 2012, 2012(1):1-7.
- [13] 夏忠芳, 王智楠, 乐建新, 等. TLR9 在儿童慢性鼻-鼻窦炎及正常鼻黏膜组织中的差异表达[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42(5):582-584.
- [14] MELVIN T A, LANE A P, NGUYEN M T, et al. Sinonasal epithelial cell expression of Toll-like receptor 9 is elevated in cystic fibrosis-associated chronic rhinosinusitis[J]. Am J Rhinol Allergy, 2013, 27(1):30-33.
- [15] 顾兆伟, 曹志伟, 王韞秀. TLR2 和 TLR4 在慢性鼻窦炎鼻息肉中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2013, 19(1):43-47.
- [16] ZHAO C Y, WANG X, LIU M, et al. Microarray gene analysis of Toll-like receptor signaling elements in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2011, 156(3):297-304.
- [17] 汪际云, 黄春鑫, 乐东海, 等. 鼻黏膜中 Toll 样受体 5 的表达[J]. 中国耳鼻喉咽喉头颈外科, 2012, 19(6):315-318.
- [18] ZHANG Q, WANG C H, HAN D M, et al. Differential expression of Toll-like receptor pathway genes in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps[J]. Acta Otolaryngol, 2013, 133(2):165-173.

(收稿日期:2018-09-22 修回日期:2018-11-06)

(上接第 798 页)

- in type 2 diabetes as mediators of insulin resistance and cardiovascular disease[J]. Can J Diabetes, 2018, 42(4):446-456.
- [8] YOO H J, HWANG S Y, HONG H C, et al. Association of circulating omentin-1 level with arterial stiffness and carotid plaque in type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2011, 10(1):103.
- [9] YOO H J, HWANG S Y, HONG H C, et al. Implication of circulating omentin-1 level on the arterial stiffening in type 2 diabetes mellitus[J]. Endocrine, 2013, 44(3):680-687.
- [10] PAN H Y, GUO L, LI Q. Changes of serum omentin-1 levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 88(1):29-33.
- [11] YAMAWAKI H, KURAMOTO J, KAMESHIMA S, et al. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(2):339-343.
- [12] YAMAWAKI H, TSUBAKI N, MUKOHDA M, et al. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(4):668-672.
- [13] TAN B K, ADYA R, FARHATULLAH S, et al. Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin resistant women with the polycystic ovary syndrome: ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose[J]. Diabetes, 2008, 57(4):801-808.
- [14] OUCHI N, PARKER J L, LUGUS J J, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(2):85-97.
- [15] 傅庆华, 刘适, 郭莹. 2 型糖尿病合并冠心病患者脂肪细胞因子水平及其意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(35):3611-3613.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2018-11-12)