

变应性鼻炎鼻黏膜组织重塑的研究及转化生长因子 $\beta 1$ 在鼻黏膜中的表达*

冯会杰¹ 周 焕¹ 杨 扬¹ 袁 亚² 白素娟^{1△}

(1 上海市普陀区人民医院耳鼻咽喉科 上海 200060; 2 上海市普陀区人民医院病理科 上海 200060)

摘要 目的 探讨变应性鼻炎(allergic rhinitis AR)鼻黏膜组织是否存在重塑并检测与组织重塑密切相关的转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在 AR 患者鼻黏膜组织中的表达及意义。方法 取健康自愿者、轻度间歇性 AR 患者、重度持续性 AR 患者的中鼻甲黏膜组织各 10 例。苏木素伊红(HE)染色法观察嗜酸细胞浸润并测定上皮损伤情况, 阿辛蓝-过碘酸-希夫(AB-PAS)染色法计数杯状细胞数; 三色胶原(MT)染色测定细胞外基质沉积面积百分比。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定组织中 TGF- $\beta 1$ 的表达。结果 ①对照组无明显嗜酸细胞浸润, 两鼻炎组较多嗜酸细胞浸润($P < 0.01$), ②轻度 AR 组中仅上皮细胞损伤 1 级比对照组明显($P < 0.01$), 重度 AR 组上皮损伤 1、2、3 级均比对照组明显($P < 0.01$), ③两鼻炎组杯状细胞数明显多于对照组(P 值均 < 0.01), ④与对照组相比, 轻度 AR 组胶原沉积面积增多, 但无统计学意义($P > 0.05$), 重度 AR 组明显增多($P < 0.01$), ⑤TGF- $\beta 1$ 在两鼻炎组黏膜中的表达均比对照组显著增高($P < 0.01$) 重度 AR 组 TGF- $\beta 1$ 的表达均比轻度 AR 组增高, 具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 AR 的鼻黏膜组织发生了重塑, 表现为: 上皮细胞损伤, 杯状细胞化生, 细胞外基质沉积, 重度 AR 患者的鼻黏膜重塑更强, 更广泛。TGF- $\beta 1$ 积极参与了 AR 鼻黏膜组织重塑过程。

关键词 变应性鼻炎 嗜酸细胞 上皮细胞 杯状细胞 细胞外基质 转化生长因子 $\beta 1$ 重塑

中图分类号 R76 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)11-2151-04

The Study of the Remodeling and the Protein Expression of Transforming Growth Factor $\beta 1$ in the Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis*

FENG Hui-jie¹, ZHOU Huan¹, YANG Yang¹, YUAN Ya², BAI Su-juan^{1△}

(1 Dept. of Otorhinolaryngology, People's Hospital of Shanghai Putuo District, Shanghai 200060, China;

2 Dept. of Pathology, People's Hospital of Shanghai Putuo District, Shanghai 200060, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether there was remodeling and the protein expression of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in the nasal mucosa of allergic rhinitis (AR) patients. **Methods:** Pathology staining explore the middle turbinate tissues from 10 patients with light-AR, from 10 patients with heavy-AR, from 10 non-AR. The infiltrating of eosinophils and damage of epithelium were examined by the hematoxylin and eosin staining (HE); goblet cell hyperplasia were counted by the alcian blue-periodic acid-Schiff staining (AB-PAS); the percentage area of extracellular matrix (ECM) deposition were used by the masson's Trichrome Staining (MT); the protein expression of TGF- $\beta 1$ in the middle turbinate tissues was detected by the enzyme-linked immunosorbent Assay(ELISA). **Results:** Compared with the control group significant eosinophil infiltration and goblet cells was observed in both AR groups ($P < 0.01$). Evident epithelial damage and ECM deposition were observed in heavy-AR group($P < 0.01$). The expression of TGF- $\beta 1$ in AR tissues was significant higher ($P < 0.01$). **Conclusions:** The nasal mucosa remodeling were observed in AR groups: eosinophils infiltration, epithelial damage, goblet cells hyperplasia and ECM deposition. TGF- $\beta 1$ may play a role in the tissue remodeling processes.

Key words: Allergic rhinitis; Eosinophils; Epithelial cell; Goblet cell; Extracellular matrix; Transforming growth factor $\beta 1$; Remodeling

Chinese Library Classification(CLC): R76 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)11-2151-04

前言

变应性鼻炎(allergic rhinitis AR)是由抗原引起的多种细胞和细胞因子参与的鼻黏膜的变应性炎症。具体发病机理不清,现临床治疗往往难于收到满意效果。

变应性鼻炎发病率高,与哮喘有密切关系^[1],严重影响患者的生活质量。由于二者在流行病学、病理生理学和免疫病理学等诸方面的密切联系和治疗原则多方面的共同性,提出"一个呼吸道,一种疾病"。目前已明确气道重塑是哮喘的重要组织学特点。目前国内对 AR 鼻黏膜组织重塑的研究多局限在动物模

* 基金项目:上海市普陀区卫生局科研课题基金资助(PWG-06-04)

作者简介:冯会杰(1979),女,主治医师,硕士,主要研究方向:鼻部疾病及鼻微创外科基础与临床

电话:021-32274550,15921447892, E-mail: ylrccx@hotmail.com

△通讯作者:白素娟,电话:021-32274550, E-mail: baisj312@yahoo.cn

(收稿日期:2011-09-26 接受日期:2011-10-22)

型抗原攻击而引起的鼻黏膜变应性炎症^[2],而 AR 患者的鼻黏膜组织是否也存在重塑还不清楚。本实验通过研究不同程度 AR 患者鼻黏膜的病理学改变,来观察 AR 患者鼻黏膜组织是否存在重塑,从另一方面检测与重塑密切相关的 TGF- β 1 在 AR 患者鼻黏膜组织中的表达情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2007 年 1 月-2010 年 6 月在我院接受鼻内镜下行鼻中隔偏曲矫正术病例 30 例。其中对照组 10 例单纯性鼻中隔偏曲患者(男 6 例,女 4 例),年龄 18~52 岁,平均 30 岁,均无 AR、鼻窦炎、支气管哮喘、阿司匹林耐受不良等疾病。轻度 AR 组 10 例鼻中隔偏曲伴轻度 AR(男 5 例,女 5 例)年龄 19~44 岁,平均 29 岁。重度 AR 组 10 例鼻中隔偏曲伴重度 AR 患者(男 7 例,女 3 例),年龄 18~62 岁,平均 36.6 岁。按 2004 年兰州会议制定的诊断标准^[3]。所有患者 1 个月内均未进行激素和抗组胺药物治疗并签署知情同意书。术中取中鼻甲黏膜组织,放入 -80℃ 冰箱保存。

1.2 实验方法

1.2.1 病理标本制备 标本解冻,制成石蜡切片。分别行苏木素-伊红(HE)染色、阿辛蓝-过碘酸-希夫(AB-PAS)染色、三色胶原(MT)染色。

1.2.2 TGF- β 1 的表达 标本解冻、称重,每 100 mg 组织加入 1 ml 蛋白提取缓冲液,缓冲液含 0.01 mol/L Tris、0.15 mol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、1 % Triton 和 1/8 片复合蛋白酶抑制剂(Roche,USA)。然后将组织以匀浆器于 4℃ 1000 r/min 匀浆 5min,然后在 4℃ 离心 10 min,取上清以 250 μ l 为单位分装,用商品化酶联免疫吸附试验试剂盒(R&D Systems,USA),依照说明检测组织匀浆上清中 TGF- β 1 的蛋白含量。

1.2.3 结果测定 1)嗜酸细胞浸润 HE 染色,每个标本选五张切片,每张随意选取 5 个高倍视野,计数中鼻甲黏膜组织嗜酸细胞数。2)上皮细胞损伤 HE 染色,按 Ponikau(2003 年)分级法^[4]: 0 级纤毛上皮无损伤,纤毛完整;1 级纤毛缺失,无上皮细胞脱落;2 级上皮细胞剥脱但未至基底膜;3 级上皮细胞全部剥脱,

基底膜暴露。测定各种状态上皮细胞所占基底膜总长百分比表示。3)杯状细胞化生 AB-PAS 染色阳性细胞为杯状细胞,计数中鼻甲黏膜上皮单位面积中杯状细胞数。4)细胞外基质沉积: MT 染色蓝色胶原为细胞外基质成分标志。可见胶原沉积于基底膜区及黏膜内的血管腺体周围,测量鼻黏膜内及基底膜区 MT 染色蓝色所占的百分比面积。5) TGF- β 1 的蛋白表达 以分光光度计读出每孔的 450 nm 吸光度(A),根据标准曲线计算被测蛋白的浓度。

1.3 统计学处理

所得数据输入 SPSS 软件包进行统计学处理,以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料 2 组均数间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 嗜酸细胞浸润

对照组很少嗜酸细胞浸润 (7.89 ± 2.46),而轻度 AR 组 (79.6 ± 28.5) 和重度 AR 组 (88.7 ± 30.3) 嗜酸细胞数明显增多 (P 值均 < 0.01)。

2.2 上皮细胞损伤

与对照组相比,轻度 AR 组中上皮损伤较轻,仅上皮损伤 1 级与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.01$),重度 AR 组上皮损伤 1、2、3 级均较重 ($P < 0.01$ 表 1,图 1)。

2.3 杯状细胞化生

与对照组相比 [54.2 ± 23.7 个/ mm^2],轻度 AR 组 [143.8 ± 37.9 个/ mm^2]和重度 AR 组 [169.7 ± 36.8 个/ mm^2]杯状细胞数均明显增多 (P 值均 < 0.01)。

2.4 细胞外基质沉积

与对照组相比,轻度 AR 胶原沉积面积增多,但无统计学意义 ($P > 0.05$),重度 AR 组胶原沉积面积明显增多 ($P < 0.01$ 见表 2,图 2-3)。

2.5 TGF- β 1 表达

与对照组相比,TGF- β 1 在病例组中鼻甲黏膜中的表达显著增高 ($P < 0.01$),重度 AR 组 TGF- β 1 表达均比轻度变应性鼻窦组的表达增高,具有统计学意义 ($P < 0.05$ 见表 2)。

表 1 鼻黏膜上皮损伤情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The epithelial damage of the nasal mucosa

Group (cases)	The area of epithelial damage (%)			
	0 degree	1 degree	2 degree	3 degree
Control group (10)	81.1 $\pm$ 6.7	9.7 $\pm$ 2.8	7.8 $\pm$ 4.9	0.4 $\pm$ 0.3
Light-AR group (10)	75.2 $\pm$ 12.9	18.5 $\pm$ 4.9	6.1 $\pm$ 3.5	0.4 $\pm$ 0.2
Heavy-AR group (10)	49.1 $\pm$ 11.5	23.7 $\pm$ 6.8	24.8 $\pm$ 9.1	2.2 $\pm$ 1.3

表 2 各组胶原沉积面积及 TGF- β 1 的蛋白表达
Table 2 The percentage area of collagen deposition and the protein expression of TGF- β 1

Group	Cases	The area of collagen deposition (%)	TGF- β 1 (ng/ml)
Control group	10	8.24 $\pm$ 3.22	339.52 $\pm$ 129.64
Light-AR group	10	9.36 $\pm$ 3.46	596.49 $\pm$ 176.12
Heavy-AR group	10	26.63 $\pm$ 8.96	842.87 $\pm$ 297.32

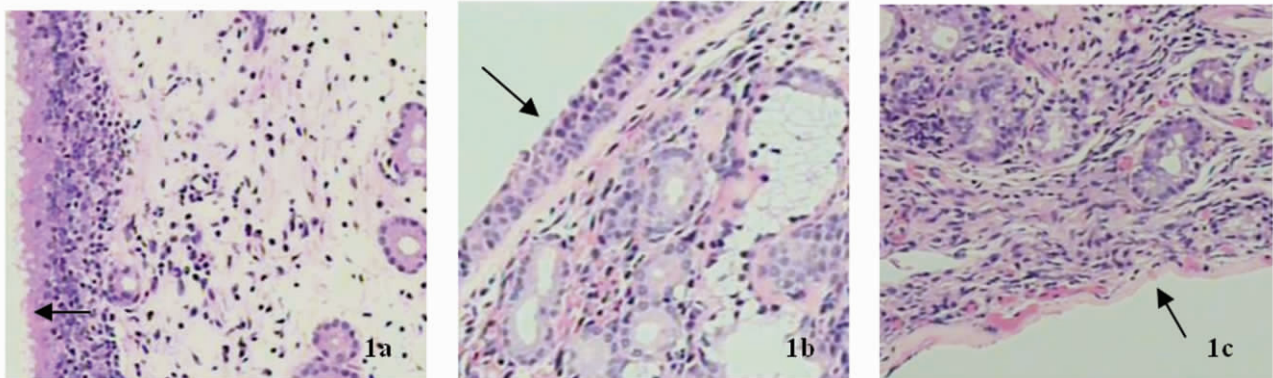


图1 上皮损伤情况。a:上皮损伤0级,纤毛完整;b:上皮损伤1级,纤毛缺失,无上皮脱落;c:上皮损伤3级,上皮脱落,基底膜暴露。(HE×200)

Fig. 1 The epithelial damage.a:0 degree, cilium integrity;b:1 degree, cilium absence, no exfoliation;c: 3 degree, exfoliation, basal membrane expose.(HE×200)

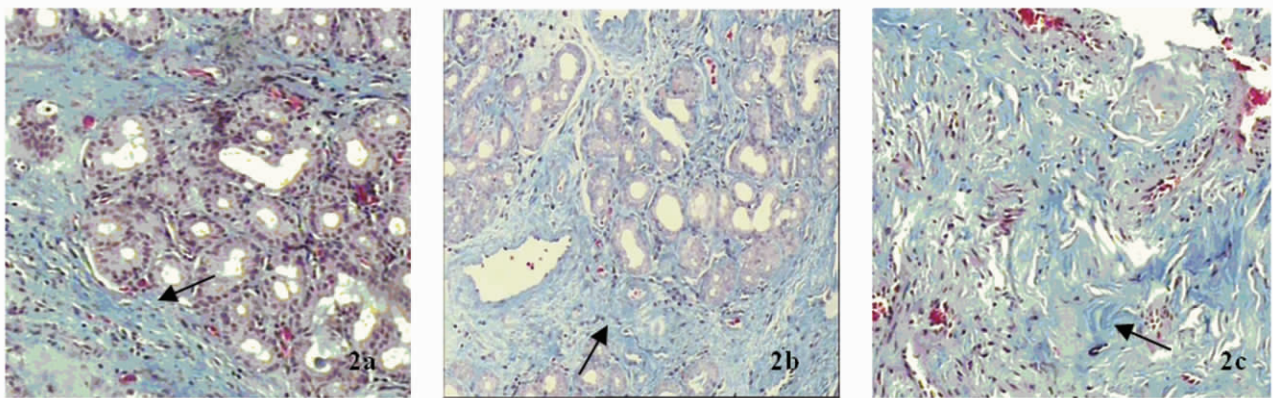


图2 鼻黏膜内胶原沉积情况。a:对照组鼻黏膜内胶原沉积较少;b:轻度鼻炎组鼻黏膜内胶原沉积略增多;c:重度鼻炎组鼻黏膜内胶原大量沉积。(MT×200)

Fig. 2 Collagen deposition in the nasal mucosa.a: control group, collagen deposition less;b:light-AR group, collagen deposition increase;c:heavy-AR group, large collagen deposition. (MT×200)

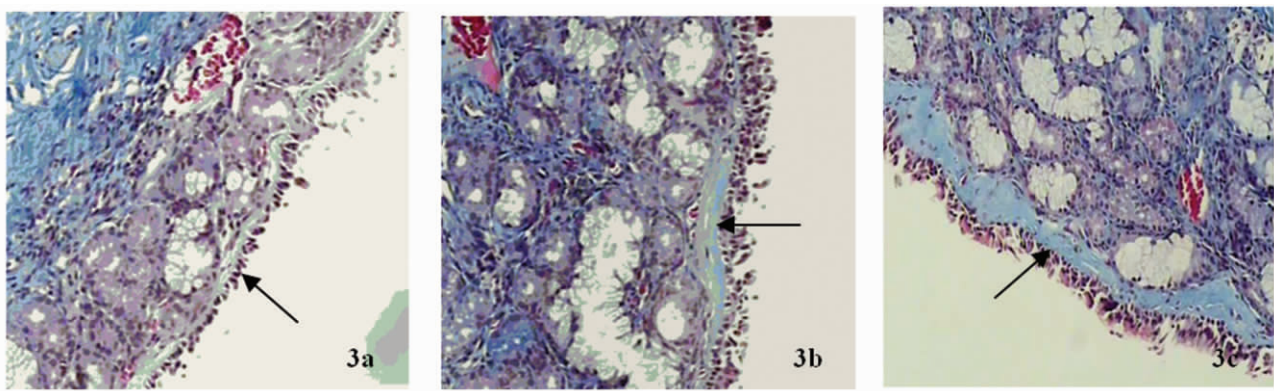


图3 鼻黏膜基底膜区胶原沉积情况。a:对照组基底膜无明显增厚;b:轻度鼻炎组基底增厚;c:重度度鼻炎组基底膜增厚明显。(MT×200)

Fig. 3 Collagen deposition in the basal membrane.a: control group, thin basal membrane;b:light-AR group, basal membrane thickening;c:heavy-AR group, evident basal membrane thickening. (MT×200)

3 讨论

变应性鼻炎由多种细胞和细胞因子参与的,以鼻黏膜变应性炎症为特征性疾病,已成为一个全球性健康问题。AR和哮喘具有相同的发病机制,具有上下呼吸道炎症反应相关性^[5]。气道重塑是哮喘的重要病理特征,包括气道壁增厚,上皮细胞损伤,

杯状细胞和腺体增生,细胞外基质沉积,平滑肌细胞增多,血管形成,也是哮喘迁延难愈的重要环节^[6]。目前哮喘患者气道重塑已被广泛关注,但是AR患者的鼻黏膜是否存在重塑观点不一。Braunstaht等^[7]认为AR患者鼻黏膜没有出现结构的改变。Chanez^[8]等和Bousquet^[9]认为AR的鼻黏膜重塑的病理改变程度远没有哮喘的支气管黏膜广泛,上皮损伤小,网状基底膜未

显示假性增厚。我们通过研究 AR 患者鼻黏膜病理学改变来探讨 AR 鼻黏膜组织是否发生重塑,并且定量测定了 TGF- β 1 在鼻黏膜中的表达,探讨它在变应性鼻炎中的作用。

嗜酸粒细胞在炎症部位趋化,浸润,活化后合成和释放多种细胞因子及蛋白如 TGF- β 1, IL-3, IL-5, MMP9, TIMP-1, 嗜酸粒细胞阳离子蛋白(ECP)和主要碱性蛋白(MBP)^[10],这些产物的释放增加血管通透性及粘液分泌,造成局部上皮组织损伤破坏,炎症因子的长期作用使上皮细胞不能正常修复而发生纤毛缺失,上皮脱落等,从而导致鼻黏膜组织重塑的发生。本实验中两鼻炎均有较明显嗜酸粒细胞浸润。

变应性个体的(哮喘和鼻炎患者)上皮细胞的结构和功能失常,对损伤不能正常修复,处于持续活化状态并释放粘附分子 ICAM-1, IL-6, TNF- α , 等,进而激活邻近的成纤维细胞,黏膜下层的平滑肌细胞,粘液腺,启动并形成慢性炎症及重塑的循环过程。本组研究中,轻度 AR 组只有纤毛缺失,并无明显上皮细胞损伤,重度 AR 组上皮细胞损伤明显,部分基底膜暴露。上皮细胞参与了变应性炎症的发生和发展。活化的嗜酸粒细胞释放的多种物质可能导致上皮损伤的重要因素^[11]。

杯状细胞化生,高分泌状态是导致 AR 粘液增多的主要原因。抗原直接刺激和 Th2, IL-4 等在诱导黏液合成及上皮细胞化生中发挥重要作用。本实验重度 AR 组杯状细胞数量明显增多,为鼻黏膜重塑的特征之一。

细胞外基质沉积于黏膜基底膜及血管和腺体周围,表现为基底膜增厚和鼻甲黏膜内纤维组织增生,本实验组轻度 AR 组胶原沉积面积无明显增加,重度 AR 组明显增多,表明重塑程度加重。胶原沉积发生可能机制是细胞因子和炎症介质作用导致嗜酸细胞浸润,杯状细胞增生,上皮细胞损伤,胶原沉积,鼻黏膜可降解胶原等进行防御性修复。如果炎症因素持续刺激,胶原沉积和降解平衡破坏,胶原沉积范围扩大,致修复过度且不可逆。基底膜增厚一方面可抑制水肿导致的鼻腔气道闭塞,但另一方面鼻黏膜纤维化可导致肥厚和功能减退,对减充血剂敏感性下降。据陈奋华^[12]报道监测基底膜厚度的变化可用于评估哮喘的气道重塑病理,判断疗效及对哮喘的长期追踪,但鼻黏膜基底膜厚度变化监测可否作为判断疗效指标还有待深入研究。

TGF- β 1 最显著生物学效应是促进细胞外基质的产生和促进组织器官纤维化的作用,所以在气道重塑中起重要作用^[13,14]。TGF- β 1 主要由受损的上皮细胞分泌,可通过多种途径在疾病中发挥作用:它能减少降解 ECM 的酶的合成,如胶原酶、基质降解酶,包括 MMP-9;并能增加这些酶抑制剂的合成,包括 TIMP-1^[15]。本实验发现 TGF- β 1 在 AR 患者鼻黏膜中也存在显著的高表达,提示 TGF- β 1 可能也参与了 AR 的组织结构重塑。TGF- β 1 是一种多效的细胞因子,它在体内的生物学作用并不仅仅取决于其数量的多少,不能单纯通过升高或降低 TGF- β 1 来干预疾病的病理过程,因此,应进一步研究发病不同阶段 TGF- β 1 作用的特异治疗靶点,打断其恶性循环,维持 TGF- β 1 正常生物学功能。

综上所述 通过我们研究,AR 鼻黏膜发生了重塑,表现为:上皮细胞损伤、嗜酸性粒细胞浸润、杯状细胞化生、细胞外基质沉积。重度 AR 患者的鼻黏膜重塑更强,更广泛。TGF- β 1 积极参与了 AR 鼻黏膜组织重塑。治疗 AR 必须与防治重塑相结合,否则很难达到完全控制疾病的目的,但目前还有许多问题

值得今后探索,如:重塑发生机制,是否有预测的标志物,怎样可以干预重塑的发生和发展。

参考文献 (References)

- [1] Casale TB, Amin BV. Allergic rhinitis / asthma interrelationships [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2001,21:27-49
- [2] 余文煜,董震.实验性变应性鼻炎鼻黏膜组织重塑的特点[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41:48-53
Shi Wen-yu, Dong Zhen. Nasal mucosa remodeling in guinea pig model of allergic rhinitis [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2006,41:48-53
- [3] 顾之燕,董震.变应性鼻炎的诊治原则和推荐方案(2004 年,兰州)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40(3):166-167
Gu Zhi-yan, Dong Zhen. Principles of diagnosis and treatment of allergic rhinitis and recommended solutions(2004,Lanzhou) [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2005,40(3): 166-167
- [4] Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis:is the histopathology similar to asthma[J]. Allergy Clin Immunol,2003,112: 877-882
- [5] 王向东,韩德民,周兵,等.上下呼吸道炎症反应相关性研究 [J].中华耳鼻咽喉科杂志,2003,38:247-248
Wang Xiang-dong, Han De-min, Zhou Bing, et al. A study of the link between upper and lower respiratory inflammation [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg,2003,38:247-248
- [6] Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms,consequences, and pharmacologic modeling [J]. Chest, 2006,129(4):1068-1087
- [7] Braunstahl G J, Fokkens W J, Overbeek S E, et al. Mucosal and systemic inflammatory change in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways [J]. Clin Exp Allergy, 2003,33 (5):579-587
- [8] Chanez P, Vignola A M, Vic P, et al. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999,159(2):588-595
- [9] Bousquet J, Jacot W, Vignola A M, et al. Allergic rhinitis:a disease remodeling the upper airways[J]? J Allergy Clin Immunol, 2004,113(1): 43-49
- [10] Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma[J].Trends Immuno- l, 2004,25(9):477-482
- [11] Makino S, Fukuda T. Eosinophils and allergy in asthma [J].Allergy Proc, 1995,16:13-21
- [12] 陈奋华,陈壮桂,陈虹,等.哮喘患者气道网状基底膜厚度与气道重塑相关性探讨[J].中华医学杂志,2006,86(7):468-471
Chen Fen-hua, Chen Zhuang-gui, Chen Hong, et al. Correlation of reticular basement membrane thickness and airway wall remodeling in asthma patients [J]. National Medical Journal of China, 2006,86(7): 468-471
- [13] Leask A, Abraham D J. TGF-beta signaling and the fibrotic response [J]. FASEB J, 2004,18:816-827
- [14] Asakura T, Ishii Y, Chibana K, et al. Leukotriene D4 stimulates collagen productin from myofibroblasts transformed by TGF-beta [J]. Allergy Clin Immunol, 2004,114:310-315
- [15] Redington AE, Madden J, Frew AJ, et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma.Measurement in bronchoalveolar lavage fluid[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997,156(2 Pt 1):642-647