doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.014

鼻息肉中 HIF-1α、VEGF 和 miR-200a 表达及其与复发相关性研究*

雍 军! 李林格! 李 亮² 马遇庆³ 冯 娟! 范宇琴! 古扎力努尔!

尼力帕尔! 王 松! 张 华!

(新疆医科大学第一附属医院 1 耳鼻喉科;2 临床研究院;3 病理科 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:分析不同病理分型鼻息肉中 HIF-1α、VEGF 和 miR-200a 表达及其与复发相关性研究。方法:选取鼻息肉患者 42 例, 在随访期间有 15 例鼻息肉复发。采用免疫组化 SABC 法检测鼻息肉及下鼻甲组织中 HIF-1α、VEGF 表达水平,采用 qRT-PCR 技 术检测鼻息肉及下鼻甲粘膜组织中 miRNA-200a 表达量。对比分析不同病理分型 HIF-1α、VEGF (miRNA-200a 表达差异并分析鼻 息肉复发的因素。结果:鼻息肉中 miR-200a 表达量明显低于下鼻甲粘膜组织(P<0.05)。鼻息肉中 HIF-1α、VEGF 表达量明显高于 于下鼻甲粘膜组织 (P<0.05)。鼻息肉病组织中 miR-200a 表达量明显低于单发鼻息肉、多发鼻息肉 (P<0.05);鼻息肉病标本中 HIF-1α、VEGF 表达量明显高于单发鼻息肉、多发鼻息肉组织(P<0.05)。鼻息肉复发与鼻息肉的病理分型、HIF-1α、VEGF 表达密切 相关(P<0.05)。结论:鼻息肉增生和局部血管的生成密切相关,HIF-1α 可能是同构调节 miR-200a 表达,来控制 VEGF 及血管生成的。 关键词:鼻息肉;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子 -1α;miR-200a

中图分类号:R765 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)21-4059-04

Expressions of HIF-1α, VEGF and miR-200a and Its Correlation with Recurrence of Nasal Polyps*

YONG Jun', LI Lin-ge', LI Liang², MA Yu-qing³, FENG Juan', FAN Yu-qin', GUZALINUER',

NILIPAER¹, WANG Song¹, ZHANG Hua¹

(1 Department of ENT, 2 Clinical Research Institute, 3 Department of pathologists, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical

University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expressions of HIF-1 α , VEGF and miR-200a in different pathological types of nasal polyps and its correlation with recurrence. **Methods:** The data of 42 patients with nasal polyps were selected, and 15 of them had recurrence during the follow-up period. The immunohistochemical SABC method was applied to detect expression levels of HIF-1 α and VEGF in nasal polyps and inferior turbinate tissues. The qRT-PCR technique was used to detect the microrRNA 200a quantity expression in nasal polyps and inferior turbinate mucosa tissues. Compare the differences of expressions of HIF-1 α , VEGF and miRNA-200a in different pathological classifications and analyze the factors of recurrence of nasal polyps. **Results:** The miR-200a expression in nasal polyps was significantly lower than in the inferior turbinate mucosa tissue (P<0.05). The HIF-1 α and VEGF expressions in nasal polyps were significantly higher than in inferior turbinate mucosa tissues (P<0.05). The miR-200a expression level in nasal polyposis tissues was obviously lower than in tissues of single nasal polyps and multiple nasal polyps (P<0.05). The expressions of HIF-1 α and VEGF in nasal polyposis specimens were obviously higher than in tissues of single nasal polyps and multiple nasal polyps (P<0.05). The recurrence of nasal polyps was closely related to the nasal polyps pathological classifications and expressions of HIF-1 α and VEGF (P<0.05). **Conclusion:** Nasal polyps hyperplasia had close relation with the local blood vessel formation. HIF-1 α may control the VEGF and angiogenesis by homogeneously regulating the miR-200a expression.

Key words: Nasal polyp; VEGF; HIF-1 α ; miR-200a

Chinese Library Classification(CLC): R765 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)21-4059-04

前言

鼻息肉是由上呼吸道感染引起,发生机制尚不明确的长期 慢性炎症疾病,以嗜酸性粒细胞广泛浸润、间质水肿增生为主 要病理特征^[1]。大量研究证实血管生成因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在鼻息肉组织中高表达并且与血管、 上皮增殖及息肉复发相关^[23]。MicroRNAs (miRNAs)是一组内 源性、功能性的非编码小 RNA 片段,长度为 21-23 个碱基对, 小 RNA 从转录后水平调节基因蛋白的表达^[45]。本研究主要探 讨 HIF-1α、VEGF 和 miR-200a 和鼻息肉的相关性,及其和鼻息

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81460094)

作者简介:雍军(1970-),男,硕士,副主任医师,主要从事耳鼻喉方面的临床研究,电话:0991-4362974,E-mail:ttyxvip@yeah.net (收稿日期:2016-11-30 接受日期:2016-12-23)

肉复发的机制研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

从 2011 年 3 月到 2016 年 7 月期间我科住院或门诊手术 的鼻息肉患者 42 例,均在我院完成首次鼻息肉手术,其中男 29 例,女 13 例,年龄 17~63(34.3± 14.7)岁。其中第二次手术复 发的病例 15 例,首次手术均在本院完成,且病理标本保留完 整。所有患者均经过病理诊断,排除了其他鼻咽部疾病可能,有 完整的临床病例资料,包括病理切片、影像学、血常规、生化、随 访等资料。

1.2 鼻息肉病理分型

根据国内韩德民等鼻息肉分类标准⁶⁰,根据病理特点将鼻 息肉分为单发鼻息肉、多发鼻息肉、鼻息肉病三种病理类型。鼻 息肉肉眼为有蒂部,或较宽的基底,镜下主要表现为假复层纤 毛上皮,可见鳞状上皮化生,间质水肿,伴有大量炎性细胞浸 润;鼻息肉病主要表现组织广泛水肿,正常组织细胞成分较少, 主要临床特征是鼻粘膜广泛水肿,充满鼻腔,多数有鼻息肉切 除病史。

1.3 鼻息肉标本 miR-200a 检测

miRNA 采用 qRT-PCR 技术, miRNA-200a 引物及内参杰 特伟公司设计合成;采集荧光信号水平测定鼻息肉组织及下鼻 甲组织中 miR-200a 表达量。

1.4 鼻息肉 HIF-1α、VEGF 表达水平检测

采用免疫组化 SABC 法检测息肉组织、下鼻甲组织中

VEGF 蛋白的表达。根据细胞浆的着色程度及着色细胞的百分率进行评分计算阳性系数:基本不着色者为0分,着色淡者为1分,着色适中者为2分,着色深者为3分。着色细胞占计数细胞百分率 \leq 5%为0分,6%-25%为1分,26%-50%为2分, \geq 51%为3分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,即为阳性系数。阳性系数为0,1分为阴性(-);2,3分为弱阳性(+);4-6分为阳性(++);9分为强阳性(+++)。同样采用免疫组织化学法测定息肉组织、下鼻甲组织中HIF-1 α 表达水平,HIF-1 α 主要位于细胞核中,将细胞阳性率与染色强度两者积分相乘,0分为阴性(-),1-4分为弱阳性(+),5-8分为中度阳性(++),9-12分为强阳性(+++)。

1.5 统计学方法

计量资料采用均值±标准差(x±s),应用t检验;计数资料 采用x²检验;分析影响鼻息肉复发的因素;P<0.05为差异有统 计学意义。

2 结果

2.1 鼻息肉和下鼻甲组织标本 miR-200a、HIF-1α、VEGF 表达 差异

所有鼻息肉病历首次所取得鼻息肉及下鼻甲标本组织对 比发现,鼻息肉中 miR-200a 表达量明显低于下鼻甲正常鼻粘 膜组织,差异有统计学意义(P<0.05)。鼻息肉中 HIF-1α、VEGF 表达量明显高于于下鼻甲正常鼻粘膜组织,差异有统计学意义 (P<0.05)(表1)。

	n	miR-200a	HIF-1a				VEGF			
Groups			Negative	Weakly	Positive	Strong	Negative	Weakly	Positive	Strong
				positive		Positive		positive		Positive
Nasal polyp	42	0.56 ± 0.082	0	3	27	12	0	6	22	14
The inferior turbinate organization	42	2.34± 0.28	5	32	5	0	3	27	10	2
t/x ²		17.33		43	.06			27	.56	
Р		0.00		0.	00			0.	00	

表 1 鼻息肉和下鼻甲粘膜标本中 miR-200a、HIF-1α、VEGF 表达差异 Table 1 Nasal polyps and inferior turbinate mucosa specimens of miR - 200 - a, the difference of HIF - 1 a VEGF expression

2.2 不同病理分型鼻息肉 miR-200a、HIF-1α、VEGF 表达差异 研究结果显示,鼻息肉病组织中 miR-200a 表达量明显低 于单发鼻息肉、多发鼻息肉组织中 miR-200a,差异有统计学意 义(P<0.05);单发鼻息肉和多发鼻息肉组间 miR-200a 表达无明</p> 显差异(P>0.05)。鼻息肉病标本中 HIF-1α、VEGF 表达量明显高 于单发鼻息肉、多发鼻息肉组织,差异有统计学意义(P<0.05) (表 2)。

表 2 不同病理分型鼻息肉 miR-200a、HIF-1α、VEGF 表达差异 Table 2 The difference of expressions of miR-200a HIE-1α and VEGE in different pathological pasal polyps classifications

Groups	n	Mir-200a	HIF-1a				VEGF			
			Negative	Weakly positive	Positive	Strong Positive	Negative	Weakly positive	Positive	Strong Positive
Single nasal polyps	13	0.76± 0.12	0	2	11	0	0	2	10	1
Multiple nasal polyps	18	0.82± 0.19	0	1	14	3	0	3	11	4
Nasal polyposis	11	0.35± 0.6	0	0	2	9	0	1	1	9
t/x^2		6.49 23.53			27.17					
Р		0.00 0.00			0.00					

分析鼻息肉复发和患者性别、年龄、鼻息肉病理分型、以及 miR-200a、HIF-1α、VEGF 表达水平的相关性,结果显示,鼻息 肉复发与鼻息肉的病理分型、HIF-1α、VEGF 表达密切相关

(P<0.05);和鼻息肉患者性别、年龄、以及miR-200a 表达量无明 显相关性(P>0.05)。鼻息肉病的复发率明显高于单发鼻息肉和 多发鼻息肉患者,以及 HIF-1α、VEGF 高表达水平明显明显具 有息肉复发的趋势(表 3)。

	Table 3 The correlation	of the pathological a	nd clinical features with recurrent	nce of nasal polyps		
	Recurrence group		NO recurrence group		Р	
n	15		27			
Age	35.36± 12.73		34.13± 13.25	0.89	0.34	
	male	10	19	2.34	0.28	
Gender	female	5	8			
	Single nasal polyps	3	10	3.87	0.02	
Pathological	Multiple nasal polyps	7	11			
classification	Nasal polyposis	5	6			
	weakly positive	1	2	6.93	0.00	
HIF-1α	positive	6	19			
	Strong Positive	8	3			
	weakly positive	1	5	5.54	0.01	
VEGF	positive	5	16			
	Strong Positive	8	6			
miR-20a		0.62± 0.17	0.66± 0.13	1.42	0.12	

表 3 鼻息肉病理及临床特征和复发的关系

3 讨论

鼻息肉是由上呼吸道感染引起,发生机制尚不明确的长期 慢性炎症疾病,以嗜酸性粒细胞广泛浸润、间质水肿增生为主 要病理特征四。新生血管的形成是鼻息肉另一个主要的病理特 征,这些新生血管与鼻息肉的生长和水肿的发生密切相关¹⁸。血 管生成因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在鼻息 肉组织中高表达并且与血管、上皮增殖及息肉复发相关¹⁹。关于 鼻息肉组织内调控 VEGF 表达和血管生成机制的研究仍较为 匮乏。近年来研究发现,微小 RNAmicro 是肿瘤和炎症发生过 程中重要的调节因子,通过调节关键蛋白的表达来实现控制肿 瘤和炎症发生的目的^[10]。

在肿瘤的发生和发展过程中,缺氧诱导因子 -1_{α} (hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)被证实是缺氧条件下诱导 VEGF 活化的关键调节因子^[11]。鼻息肉患者中,间质水肿造成粘膜堵 塞窦口,加之小血管肿胀粘膜血液不均,最终导致鼻腔局部缺 氧^[12]。研究发现,HIF-1α在鼻息肉组织内高表达,VEGF亦有高 表达,提示 HIF-1α 亦是在鼻息肉组织中缺氧环境下调节 VEGF 的关键因子^[13]。HIF-1α 在促进血管新生方面的作用已在 肿瘤和炎症疾病中被多项体外和体内试验证实。多种动物模型 都提示 HIF-1α 可以直接刺激肿瘤组织中新生血管的形成^[14]。 本研究发现鼻息肉中 HIF-1a、VEGF 表达量明显高于于下鼻甲 正常鼻粘膜组织,研究证实了鼻息肉组织中血管生存分子 VEGF 明显升高,且血管密度增加。鼻息肉病 HIF-1α、VEGF 表 达量明显高于其他两种病理类型,和鼻息肉复发明显相关。

越来越多的研究证实,miRNA 具有独特的表达特性,参与 了细胞的分化、增殖、免疫应答和细胞内的信号转导通路[15.16],

广泛影响或调控固有和适应性免疫的功能以及分子途径,可被 视作潜在的诊断指标、预后指标以及治疗靶点^[17]。miR-200家族 能够调控 VEGF 信号通路^[18]。有研究证实 miR-221 和 miR-222 能够通过作用于肝细胞因子受体 c-Kit, 间接调节内皮一氧化 氮合酶的表达,阻断内皮细胞迁移、增殖和血管生成¹⁹。在此基 础上,我们推测鼻息肉中可能存在 HIF-1α 通过 miRNA 调节 VEGF 生成和鼻息肉发展的分子事件。研究结果显示,鼻息肉 中miR-200a 表达量明显低于下鼻甲正常鼻粘膜组织,差异有 统计学意义,且鼻息肉病标本中 miR-200a 明显高于其他病理 类型息肉。

参考文献(References)

- [1] Lee T H, Nam J G, Lee H M, et al. Dexamethasone Induces Apoptosis of Nasal Polyp-Derived Tissue Cultures Through JNK and p38 MAPK Activation[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2014, 7(2): 112-118
- [2] Cho J S, Kang J H, Park I H, et al. Steroids inhibit vascular endothelial growth factor expression via TLR4/Akt/NF-kappaB pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyp[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(8): 913-921
- [3] Wang Shi-fei, An Wei. Expression of COX-2 and VEGF in nasal polyps and its clinical significance[J]. Chongqing Medicine, 2010, 39 (8): 905-906
- [4] Lee K I, Kim D W, Kim E H, et al. Cigarette smoke promotes eosinophilic inflammation, airway remodeling, and nasal polyps in a murine polyp model[J]. Am J Rhinol Allergy, 2014, 28(3): 208-214
- [5] Tengroth L, Arebro J, Kumlien G S, et al. Deprived TLR9 expression in apparently healthy nasal mucosa might trigger polyp-growth in chronic rhinosinusitis patients[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105618
- [6] Kim T H, Lim E J, Lee J K, et al. Intraosseous hemangioma of the

middle turbinate misdiagnosed as a nasal polyp [J]. Case Rep Otolaryngol, 2014, 2014: 217349

- [7] Cho H S, Kim K S. Nasal obstruction due to septochoanal polyp[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2014, 80(4): 362-363
- [8] Karikal A, Sharma S M, Gopinath A, et al. Osteolytic nasal polyp of the maxillary sinus mimicking malignancy [J]. Contemp Clin Dent, 2014, 5(3): 397-401
- [9] Cho J S, Han I H, Lee H R, et al. Prostaglandin E2 Induces IL-6 and IL-8 Production by the EP Receptors /Akt/NF-kappaB Pathways in Nasal Polyp-Derived Fibroblasts [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2014, 6(5): 449-457
- [10] Walford H H, Lund S J, Baum R E, et al. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness[J]. Clin Immunol, 2014, 155(1): 126-135
- [11] Chung S W, Park I H, Hong S M, et al. Role of caffeic Acid on collagen production in nasal polyp-derived fibroblasts[J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2014, 7(4): 295-301
- [12] Cho J S, Kang J H, Um J Y, et al. Lipopolysaccharide induces pro-inflammatory cytokines and MMP production via TLR4 in nasal polyp-derived fibroblast and organ culture[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e90683
- [13] Yoon Y H, Jin J, Kwon K R, et al. The role of B cell Activating Factor (BAFF) expression on pathogenesis of nasal polyp in chronic rhi-

(上接第 4042 页)

- [13] Beasley MB, Brambilla E, Tavis WD. The 2004 World Health Organization Classification of Lung Tumors [J]. Semin Roentgenol, 2005, 40(2): 90
- [14] Showel M, Fuchs EJ. Recent developments inHLA-haploidentical transplantations [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2015, 28(2-3): 141-146
- [15] Aldinucci D, Celegato M, Casagrande N. Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumorgrowth, immune escape and drug resistance [J]. Cancer Lett. 2015 Oct 21. pii: S0304-3835(15)00624-2[Epub ahead of print]
- [16] 王红明,刘铮,李继梅,等.云南肺癌患者 HLA-A,B 基因多态性分析 [J].昆明医学院学报, 2010, (2): 8-11 Wang Hong-ming, Liu Zheng, Li Ji-mei, et al. Analysis for HLA-A, B alleles of lung cancer in Yunnan region[J]. Journal of Kunming Medical College, 2010, (2): 8-11
- [17] 白明,金阳,陶晓南,等.肺癌患者肺泡巨噬细胞上 HLA-2 类抗原的 表达[J].同济医科大学学报, 1998, 12,27(6): 481-483
 Bai Ming, Jin Yang, Tao Xiao-nan, et al. Antigen expression of HLA

nosinusitis with nasal polyposis[J]. Rhinology, 2014, 52(4): 390-396

- [14] Hirotsu M, Shiozawa A, Ono N, et al. Fungal extracts detected in eosinophilic chronic rhinosinusitis induced cytokines from the nasal polyp cells[J]. Laryngoscope, 2014, 124(9): E347-E353
- [15] Khlifi R, Olmedo P, Gil F, et al. Heavy metals in normal mucosa and nasal polyp tissues from Tunisian patients [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(1): 463-471
- [16] Shiono O, Sakuma Y, Komatsu M, et al. Differential expression of periostin in the nasal polyp may represent distinct histological features of chronic rhinosinusitis [J]. Auris Nasus Larynx, 2015, 42(2): 123-127
- [17] Jiang Y, Xu J, Chen Y, et al. Expression and distribution of epithelial sodium channel in nasal polyp and nasal mucosa[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2015, 272(11): 3361-3366
- [18] Yamin M, Holbrook E H, Gray S T, et al. Profibrotic transforming growth factor beta 1 and activin A are increased in nasal polyp tissue and induced in nasal polyp epithelium by cigarette smoke and Toll-like receptor 3 ligation[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2015, 5(7): 573-582
- [19] Kook J H, Kim H J, Kim K W, et al. The expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in nasal polyp-derived epithelial cells and its possible contribution to glucocorticoid activation in nasal polyp[J]. Am J Rhinol Allergy, 2015, 29(4): 246-250

-2 on alveolar macrophages in lung cancer patients [J]. Journal of Tongji University(Medical Science), 1998, 12, 27(6): 481-483

- [18] Cohen CJ, Denkberg G, Ler A, et al. Recombinant antibodies with MHC-restricted peptide-specific, T cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions[J]. Mol Recognit, 2003, 16 (51): 324-332
- [19] Rathika C, Murali V, Dhivakar M, et al.Susceptible and Protective Associations of HLA Alleles and Haplotypes with Cervical Cancer in South India[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(5): 2491-2497
- [20] Moffatt MF, James A, Ryan G, et al. Extended tumor necrosis factor/ HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample [J]. Thorax, 1999, 54: 757-761
- [21] Nishimaki K, Kawamura T, Inada H, et al. HLA DPB1*0201 gene confers disease susceptibility in Japanese with childhood onset type I diabetes, independent of HLA-DR and DQ genotypes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 47(1): 49-55
- [22] Park WS, Dong SM, Kim SY, et al. Somatic mutation in the kinase dominant of the Met/HGFR in children hepatocellar carcinoma [J]. Cancer Res, 1999, 59: 307-415