

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201301010

· 论著 ·

TLR2 和 TLR4 在慢性鼻窦炎鼻息肉中的表达及临床意义

顾兆伟¹, 曹志伟¹, 王韞秀²

(中国医科大学附属盛京医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 血液研究室, 辽宁 沈阳 110022)

摘要: **目的** 检测 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 和 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 蛋白在慢性鼻窦炎鼻息肉黏膜组织中的表达, 并探讨其在鼻窦炎鼻息肉发病机制中的作用。**方法** 采用免疫组织化学技术检测 62 例鼻窦炎鼻息肉黏膜组织中 TLR2 和 TLR4 蛋白的表达和分布, 同期选取 5 例正常筛窦黏膜组织进行对照。按照 1997 年海口制定的“慢性鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及鼻内镜下鼻窦手术疗效评定标准”将其分组, 比较各组间 TLR2 和 TLR4 表达程度的差异。**结果** ① TLR2、TLR4 主要表达在鼻腔黏膜上皮细胞、固有层炎性细胞及黏膜下层腺体的胞浆和胞膜上。②慢性鼻窦炎鼻息肉各型各期均较对照组高; 并且随着分型的升高, TLR2、TLR4 的表达量也随之增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** TLR2 和 TLR4 在鼻窦炎鼻息肉中的表达可能与鼻窦炎鼻息肉的发病机制存在着一定的相互关联, TLR 在该机制中可能扮演重要角色。

关键词: 慢性鼻窦炎; 鼻息肉; toll 样受体 2; toll 样受体 4

中图分类号: R765.4; R739.62

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2013)01-0043-05

Expression of TLR2/4 in chronic sinusitis and nasal polyps and its clinical significance

GU Zhao-wei, CAO Zhi-wei, WANG Yun-xiu

(Department of Otorhinolaryngology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract: **Objective** To study the role of Toll-like receptor 2 (TLR2) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in the development of chronic sinusitis, nasal polyps via comparing the expression differences of TLR2/TLR4 proteins among the chronic sinusitis tissue, nasal polyp, and normal ethmoid mucosa. **Methods** Immunohistochemical method was used for detecting the expression of TLR2 and TLR4 proteins in 62 specimens of sinusitis and nasal polyps, and in 5 normal ethmoid mucosa. The 62 specimens of sinusitis and nasal polyp were divided into subgroups according to Haikou Standard. The expression of TLR2/TLR4 proteins among different subgroups were also compared. **Results** ① The expression of TLR2/TLR4 protein could be detected on the epithelial and glandular cells membrane and in plasm in all specimens. ② The expression of TLR2/TLR4 proteins in all subgroups of sinusitis and nasal polyps was significantly higher than that of the controls ($P < 0.05$); and with the increase of grade of sinusitis and nasal polyps, their expression increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of TLR2/TLR4 may be correlated with the pathogenesis of sinusitis and nasal polyps, and TLRs may play an important role in it.

Key words: Sinusitis, chronic; Nasal polyp; Toll-like receptor2 (TLR2); Toll-like receptor4 (TLR4)

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872849); 国家自然科学基金青年基金(81200730); 辽宁省自然科学基金(20082115)。
作者简介: 顾兆伟, 男, 硕士, 住院医师。
通讯作者: 曹志伟, Email: caozw2008@yahoo.com.cn.

慢性鼻窦炎是常见的慢性疾病之一, 多因急性鼻窦炎反复发作未彻底治愈而迁延所致。目前许多观点认为血管内皮生长因子、肿瘤坏

死因子- α 等^[1-2] 因子的产生是由于在炎症刺激下,病原相关性分子模式能够直接被模式识别受体如 Toll 样受体识别,进而激活细胞内信号传导途径,产生多种能扩大炎症反应和增强杀菌作用的细胞因子。其中 Toll 样受体就是一类重要的模式识别受体,是最古老最保守的蛋白家族,可识别侵入体内的病原体进而激活免疫细胞应答。Toll 样受体的配体大多为病原微生物细胞壁成分,其中 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2 ,TLR2) 识别的配体范围较广,包括革兰氏阳性菌及其胞壁成分如肽聚糖、磷壁酸、分支菌属的阿拉伯甘露糖脂、螺旋体及支原体等^[3]。Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4 , TLR4) 的配体则主要为革兰氏阴性菌的脂多糖^[4]。TLR2 和 TLR4 的配体已经涵盖了自然界绝大多数对人体致病的微生物类别,两者在人类 Toll 样受体家族中最为重要。

因此,在鼻窦炎的发病因素中,鼻腔黏膜上皮细胞的免疫功能对疾病治疗的转归起着至关重要的作用。目前,TLR2、TLR4 在鼻息肉患者鼻腔黏膜中的表达及作用机制的研究报道少见,且存在争议。本研究拟通过对慢性鼻窦炎和鼻息肉标本中 TLR2、TLR4 的检测,探讨其在鼻窦炎鼻息肉中的状态及作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象及材料

收集 2008 年 2 月~2009 年 2 月住院的慢性鼻窦炎鼻息肉患者 62 例。根据 1997 年海口标准^[5],并结合病史、鼻内镜检查及鼻窦 CT 扫描进行临床分类。I 型 1 期 5 例,I 型 2 期 9 例,I 型 3 期 4 例;II 型 1 期 4 例,II 型 2 期 11 例,II 型 3 期 15 例;III 型 14 例。其中 I 型取自炎性黏膜,II 型和 III 型均取自息肉组织。对照组为 5 例单纯筛窦骨瘤患者手术切除之筛窦正常黏膜。所有标本均经 4% 甲醛固定、石蜡包埋并制成 4 μ m 厚切片。其中一张行 HE 染色验证原病理诊断。所有患者均无变应性鼻炎、支气管哮喘、阿司匹林耐受不良和其他严重疾患。

1.2 研究方法

采用免疫组化 SABC 法。石蜡切片常规脱蜡、水化,抗原修复,3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶,分别滴加兔抗人 TLR2、TLR4

多克隆抗体,工作浓度为 1: 160。TLR2、TLR4 多克隆抗体,SABC 检验试剂盒均购自武汉博士德生物有限公司。按试剂盒说明行免疫组织化学染色,以细胞膜和胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色。免疫组化切片每张任选 10 个高倍视野($\times 400$)相机拍照后输入计算机存储,以 IPP6.0 图像分析软件进行图像分析处理,计算累计光密度值。

1.3 统计方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间的差异用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR2、TLR4 免疫反应

TLR2、TLR4 免疫反应阳性的表达为细胞的细胞浆和细胞膜呈黄褐色。其主要表达在鼻腔黏膜上皮细胞、固有层炎性细胞及黏膜下层腺体的胞浆和胞膜上,见图 1,2。

2.2 TLR2 在各组的表达

如表 1,图 3,4 所示,各组鼻腔黏膜组织中均有 TLR2 的表达。各型各期均较对照组高,并且随着分型的升高其表达也随之增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);但 I 型和 II 型各期之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 TLR2 在各组中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	累计光密度	P_a	P_b
对照组	5	15.76 \pm 3.12		
I 型	18	23.49 \pm 1.83	0.022	<0.01 $^{\Delta}$
1 期	5	23.94 \pm 1.67	>0.05 $^{\Delta}$	
2 期	9	23.58 \pm 1.95	>0.05 $^{\Delta\Delta}$	
3 期	4	22.73 \pm 1.98	>0.05 $^{\Delta\Delta\Delta}$	
II 型	30	32.29 \pm 3.22	<0.01	0.018 $^{\Delta\Delta}$
1 期	4	31.88 \pm 4.63	>0.05 $^{\Delta}$	
2 期	11	32.13 \pm 1.89	>0.05 $^{\Delta\Delta}$	
3 期	15	32.51 \pm 3.77	>0.05 $^{\Delta\Delta\Delta}$	
III 型	14	36.95 \pm 4.63	<0.01	<0.01 $^{\Delta\Delta\Delta}$

注:方差分析: P_a 为各型各期同对照组比较; P_b 为各分型各分期之间比较, $^{\Delta}$ 为 I 型同 II 型比较, $^{\Delta\Delta}$ 为 II 型同 III 型比较, $^{\Delta\Delta\Delta}$ 为 III 型同 I 型比较; $^{\Delta}$ 为 1 期同 2 期比较, $^{\Delta\Delta}$ 为 2 期同 3 期比较, $^{\Delta\Delta\Delta}$ 为 3 期同 1 期比较。下表同。

2.3 TLR4 在各组中的表达结果

表 2,图 5,6 所示,各组鼻腔黏膜组织中均有 TLR4 的表达。各型各期均较对照组高,并且随着分型的升高其表达也随之增加,差异具

有统计学意义($P < 0.01$);但慢性鼻-鼻窦炎 (CRS) I 型和 II 型各期比较 (除 I 型 1 期与 3 期之间) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

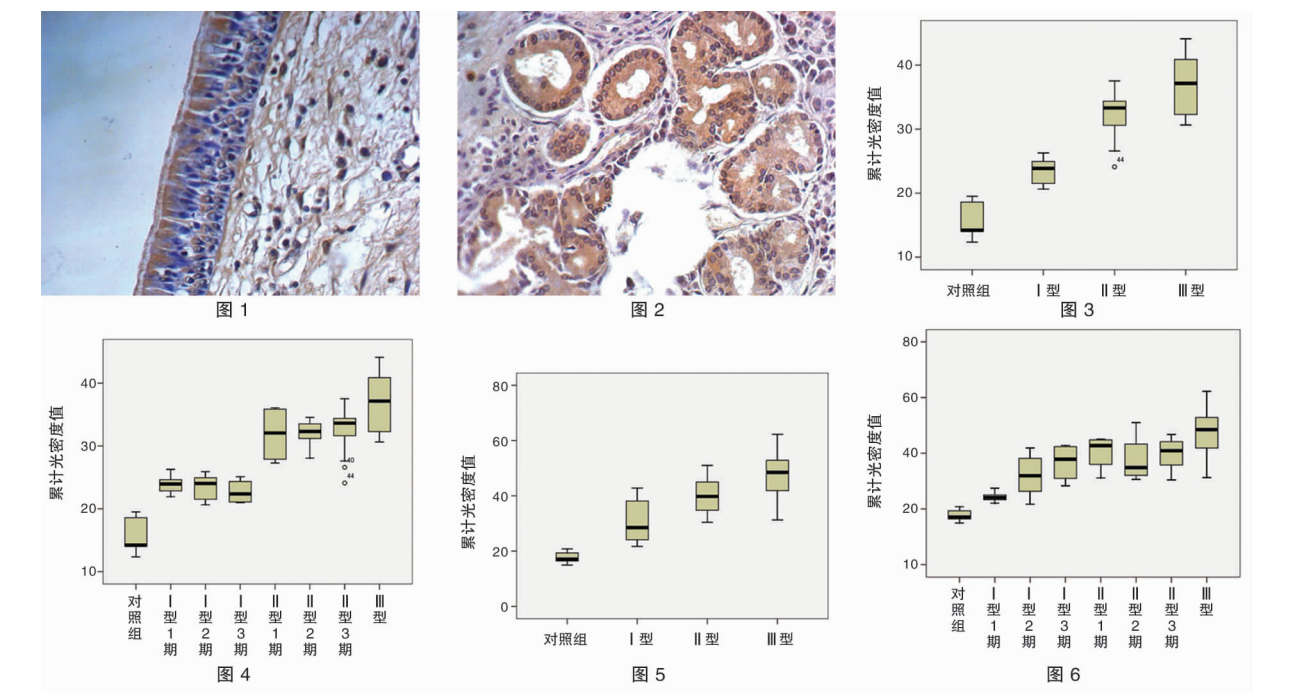


图 1 鼻腔黏膜上皮细胞中 TLR4 呈阳性染色 (SABC × 400) 图 2 鼻腔黏膜下层腺体细胞中 TLR2 呈阳性染色 (SABC × 400) 图 3 海口标准分型中 TLR2 的表达 图 4 CRS 海口标准分型分期中 TLR2 的表达 图 5 海口标准分型中 TLR4 的表达 图 6 CRS 海口标准分型分期中 TLR4 的表达

表 2 TLR4 在各组中的表达 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	累计光密度	P_a	P_b
对照组	5	17.72 ± 2.32		
I 型	18	30.71 ± 7.28	<0.01	<0.01 [△]
1 期	5	24.38 ± 2.04		=0.05 [▲]
2 期	9	31.57 ± 6.97		>0.05 ^{▲▲}
3 期	4	36.69 ± 6.94		<0.01 ^{▲▲▲}
II 型	30	39.18 ± 5.96	<0.01	<0.01 ^{△△}
1 期	4	40.41 ± 6.45		>0.05 [▲]
2 期	11	36.46 ± 7.16		>0.05 ^{▲▲}
3 期	15	39.89 ± 5.06		>0.05 ^{▲▲▲}
III 型	14	47.27 ± 8.26	<0.01	<0.01 ^{△△△}

3 讨论

鼻炎、鼻窦炎及鼻息肉是耳鼻咽喉科常见疾病,其发病机理复杂,过去认为三者是相对独立的疾病。但随着研究的深入,炎症反应作为其共同的

病因得到越来越多的认同。尽管目前还没有广泛的证据表明鼻炎、鼻窦炎、鼻息肉之间有渐进性的演变,但三者的密切关系是客观存在的。

已有研究显示鼻窦炎、鼻息肉患者均同时患有鼻炎^[6];同时对部分长时间未得到有效治疗的鼻窦炎患者反复进行鼻内镜检查时发现,随着病程的延长,某些患者窦口鼻道复合体处出现了息肉样变;鼻窦炎患者行内镜手术时也常常发现息肉的存在;而对鼻息肉患者进行相关影像学检查时发现其均有鼻窦炎的伴随现象;在术后复发的鼻窦炎患者中也表现出息肉与鼻窦炎症共存的现象。

近年来,随着研究的深入,越来越多的实验证实了 TLR 在炎症反应中的重要作用,其中 TLR 与下呼吸道炎症反应密切相关,但其在上呼吸道炎症及鼻炎中的作用研究较少^[7]。

TLR 是存在于细胞膜上的 I 型跨膜蛋白,其结构分为胞外片段、跨膜片段及胞内片段

3 部分^[8]。胞外片段是由富含亮氨酸的重复片段间断组成,胞内片段含有 IL-1/TLR 家族的同源序列,称为 Toll 同系区域,它是向下游进行信号传导的核心元件,可能与 IL-1 受体的胞内信号传递过程相似^[9]。

自 Medzhitov 等^[8]发现 TLR 以来,已发现至少 10 个成员^[10],其中 TLR2 识别的配体范围较广,包括革兰氏阳性菌及其胞壁成分如肽聚糖、磷壁酸,分支菌属的阿拉伯甘露糖脂等^[3]。TLR4 的配体则主要为革兰氏阴性菌的脂多糖^[4]。这一类物质为多种微生物所共有的一类分子结构,称之为病原相关性分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)。至今发现的 TLR 的配体大多数都属于 PAMPs,并且 TLR2、TLR4 的配体已经涵盖了自然界绝大多数对人体致病的微生物类别,二者在人类 TLR 家族中最为重要。

目前,TLR2、TLR4 在鼻窦炎鼻息肉中的表达存在争议,Wang 等^[11]在对鼻息肉上皮细胞研究时发现,TLR2 和 TLR4 在细胞表面和细胞内呈现低表达。Claeys 等^[12]研究结果提示鼻窦炎和正常下鼻甲组织的 TLR2、TLR4 mRNA 表达水平无明显差异。而 Dong^[13]、王成硕等^[14-15]学者均采用原位杂交的方法检测 TLR2 和 TLR4 在鼻窦炎鼻息肉中的表达时发现,在鼻上皮细胞中有 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达,试验组明显高于对照组,并且在感染条件下,其表达均上调。TLR2 和 TLR4 在鼻窦炎鼻息肉中高表达,表明感染性因素仍然是鼻窦炎鼻息肉发生中的重要因素。但并没有研究鼻窦炎鼻息肉分型之间是否存在表达差异。游学俊等^[16]采用反转录聚合酶链式反应和免疫组织化学技术分别检测鼻窦炎鼻息肉中 TLR2 和 TLR4 的表达,发现鼻窦炎中 TLR2 mRNA 及蛋白和 TLR4 mRNA 表达水平高于鼻息肉和下鼻甲组织。鼻息肉组织中 TLR2 和 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平与下鼻甲组织相比差异无统计学意义。

本实验采用免疫组织化学技术检测 TLR2、TLR4 在鼻窦炎鼻息肉中的表达。结果发现 TLR2、TLR4 在鼻窦炎鼻息肉以及正常筛窦黏膜均有表达,这与既往的报道相吻合^[14-18],表明鼻黏膜上皮有 TLR 蛋白行使功能。并且发现其在鼻黏膜上皮和腺体细胞以及炎性细胞胞浆、胞膜上表达,提示一旦病原微生物侵袭鼻黏膜上

皮,TLR 可以直接接触并识别病原相关分子模式,诱发信号传递途径。

笔者首次根据海口分型标准发现 TLR2、TLR4 在慢性鼻窦炎鼻息肉 I ~ III 各型中表达量均较对照组明显升高,并在各型中呈现递增趋势,除了 I 型 1 期与 3 期之间 TLR4 的表达具有差异外(可能由于样本量较少等因素造成的),其它 I 型和 II 型各期别之间差异无统计学意义。

海口分型标准实际上大体反映了炎症反应的严重程度,TLR2、TLR4 表达水平与炎症程度呈正相关。可能提示随着炎症及息肉样变的加重,窦口鼻道复合体阻塞加重,反过来进一步引起炎症的加重,如此恶性循环的后果导致鼻窦炎鼻息肉的渐变过程,鼻炎-鼻窦炎-鼻息肉只是炎症的不同阶段及某些其他因素(如变态反应、解剖结构的异常)的不同表现结果,当然还需进一步的实验证实。

本实验采用免疫组织化学方法检测了鼻窦炎鼻息肉中 TLR2、TLR4 的蛋白表达水平,尚需在转录水平进一步证实 TLR 表达量的变化。关于 TLR 在鼻窦炎鼻息肉发生中的确切调控机制,仍需深入研究证实。这将为阐明鼻窦炎鼻息肉发生发展的分子生物学机制起到重要作用,并为新型免疫制剂的靶向开发提供新思路。

参考文献:

- [1] 马晓峰,康健. 鼻息肉中的细胞因子研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2004, 10(3): 190-192.
- [2] Lennard CM, Mann EA, Sun LL, et al. Interleukin-1 beta, interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in chronic sinusitis: response to systemic corticosteroids[J]. Am J Rhinol, 2000, 14(6): 367-373.
- [3] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675-680.
- [4] Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens[J]. Nature, 1999, 401(6755): 811-815.
- [5] 中华医学会耳鼻咽喉科分会,中华耳鼻咽喉科杂志编辑委员会. 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,海口)[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,1998, 33(2): 134.
- [6] 顾之燕. 鼻-鼻窦炎诊断要点和治疗原则的进展[J]. 中华全科医师杂志,2006, 5(10): 592-595.

- [7] Ramanathan M Jr, Lane AP. Innate immunity of the sinonasal cavity and its role in chronic rhinosinusitis [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 136(3): 348–356.
- [8] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394–397.
- [9] Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, et al. Toll-like receptor family and signaling pathway [J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28(5): 563–566.
- [10] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 335–376.
- [11] Wang J, Matsukura S, Watanabe S, et al. Involvement of toll-like receptors in the immune response of nasal polyp epithelial cells [J]. *Clin Immunol*, 2007, 124(3): 345–352.
- [12] Claeys S, De Belder T, Holtappels G, et al. Human beta-defensins and toll-like receptors in the upper airway [J]. *Allergy*, 2003, 58(8): 748–753.
- [13] Dong Z, Yang Z, Wang C. Expression of TLR2 and TLR4 messenger RNA in the epithelial cells of the nasal airway [J]. *Am J Rhinol*, 2005, 19(3): 236–239.
- [14] 王成硕,董震. TLR mRNA 在慢性鼻窦炎患者鼻黏膜上皮细胞中的表达 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2003, 38(4): 243–246.
- [15] 王成硕,董震,杨占泉. TLR mRNA 在鼻息肉中的表达及意义 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2004, 11(3): 185–187.
- [16] 游学俊,陆翔,刘洋,等. TLR 在慢性鼻-鼻窦炎和鼻息肉中表达的差异 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 42(5): 345–349.
- [17] Vandermeer J, Sha Q, Lane AP, et al. Innate immunity of the sinonasal cavity: expression of messenger RNA for complement cascade components and toll-like receptors [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004, 130(12): 1374–1380.
- [18] 胡彬雅,赵斯君,任基浩,等. TLR-4、TLR-9 mRNA 在变应性鼻炎儿童扁桃腺组织中的表达 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2011, 17(5): 327–330.
- (修回日期:2012-07-25)

(上接第 42 页)

- [2] Fayter D, Corbett M, Heirs M, et al. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of precancerous shin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technol Assess*, 2010, 14(37): 1–288.
- [3] Leamon CP. Folate-targeted drug strategies for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008, 9(12): 1277–1286.
- [4] 张立娜,李千千,周志祥. 新型光敏剂分子二乙醇胺基竹红菌素光诱导 HeLa 细胞死亡中的氧化应激研究. *生物物理学报*, 2010, 26(11): 1064–1071.
- [5] Li L, Liu J, Diao Z, et al. Evaluation of specific delivery of chimeric phi29 pRNA/siRNA nanoparticles to multiple tumor cells. *Mol Biosyst*, 2009, 5(11): 1361–1368.
- [6] 闫刚,詹文华,折虹. 头颈部肿瘤放疗引起放射性脑病的诊断和治疗分析. *医学信息*, 2011, 9: 4257–4258.
- [7] 程良军,明昊. 鼻咽癌分子靶向治疗研究进展. *中国医学文摘耳鼻咽喉科学*, 2012, 27(1): 44–47.
- [8] 周长波,吕春雷. 头颈部肿瘤综合治疗的新进展 [J]. *实用医药杂志*, 2011, 28(10): 933–936.
- [9] Gorman SA, Brown SB, Griffiths J. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy [J]. *J Environ Pathol Toxicol. Oncol*, 2006, 25(1–2): 79–108.
- [10] Bugaj AM. Targeted photodynamic therapy-a promising strategy of tumor treatment [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2011, 10(7): 1097–1109.
- [11] 路秀英,李晓明,张立坤,等. XIAP 反义寡核苷酸对喉癌 Hep-2 细胞化疗增敏作用的研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2011, 17(3): 167–170, 174.
- [12] Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases [J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1): 120–129.
- (修回日期:2012-09-20)