

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201303003

· 论 著 ·

Nod1 与 Nod2 模式识别受体在鼻息肉发病中的作用

张沈华,申聪香,文 忠,李冠雪,杨柯柯,史 欣
(南方医科大学附属珠江医院 耳鼻咽喉头颈外科,广东 广州 510282)

摘 要: **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide binding oligomerization do main,NOD)模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)Nod1、Nod2 在鼻息肉发病中的作用。**方法** 分别采用免疫组织化学及 Western-blot 检测 Nod1、Nod2 蛋白在 20 例鼻息肉组织中的表达,同时以 19 例正常下鼻甲黏膜作对照;ELISA 检测鼻息肉组织和下鼻甲黏膜组织中白细胞介素 4(IL-4)的含量。**结果** Western-blot 结果提示:鼻息肉组织 Nod1 表达高于对照组,两组 Nod2 无明显差异。免疫组织化学示两种模式受体在两组中均有表达,主要表达于黏膜上皮细胞、腺体上皮、炎性细胞(如嗜酸性粒细胞)中,但 Nod1 在鼻息肉中表达强于对照组($P<0.05$),Nod2 在两组中的表达差异无统计学意义。ELISA 检测示鼻息肉组织匀浆液 IL-4 高于正常下鼻甲黏膜组织, ($P<0.05$)。**结论** 在鼻息肉组织中,Nod1 表达增强,说明 Nod1 有可能参与鼻息肉的发病。

关 键 词: Nods 样模式识别受体;鼻息肉;发病机制

中图分类号: R765. 25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)03-0192-04

Role of Nod1 and Nod2 pattern-recognition receptors

in pathogenesis of nasal polyps

ZHANG Shen-hua , SHEN Cong-xiang , WEN Zhong , et al.
(Department of Otolaryngology-Head and Neck surgery , Zhujiang Hospital of Southern Medical University , Guangzhou 510282 , China)

Abstract : **Objective** To investigate the role of pattern-recognition receptors (PRR) , nucleotide binding oligomerization domain (Nod) like receptors (NLRs) Nod1 , Nod2 in pathogenesis of nasal polyps . **Methods** 20 specimens of nasal polyps were obtained surgically from patients with nasal polyps , and 19 of inferior turbinate mucosa as normal control were obtained from patients undergoing septoplasty due to deviation of nasal septum . Expression of Nod1 , Nod2 proteins in all specimens was detected with Western-blot and immunohistochemistry respectively . And the level of IL-4 in tissue homogenates from the two groups was detected by ELISA . **Results** Western-blot analyses revealed that the Nod1 level of nasal polyps group was higher than that of the control group ($P<0.05$) while the difference of Nod2 level between the two groups was statistically insignificant . Immunohistochemical analyses showed expression of Nod1 and Nod2 in both groups , mainly in the epithelial mucosa , gland mucosa and inflammatory cells , with the same comparison results confirmed by Western-blot analyses . The level of IL-4 in tissue homogenates from the nasal polyps group was higher than that of the control group ($P<0.05$) . **Conclusions** Nod1 may be an etiological factor in the pathogenesis of nasal polyps .

Key words : Nods pattern-recognition receptor ; Nasal polyps ; Pathogenesis

鼻息肉是一种常见病,发病率约 2% ~ 5% ,给人们带来沉重的生活负担,而目前的手术和药物治疗效果不佳,且复发率逐年增高^[1]。其发病机制未完全阐明,可能涉及到感染、变态反应等相关因素。微生物刺激鼻腔黏膜引起机体启动天然免疫,主要通过病原体本身的病原相关分子模式与黏膜细胞模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)来实现。PRR 中研究较多的是 Toll 样受体,分布在细胞

作者简介:张沈华,男,硕士研究生。
通讯作者:文 忠, Email:wenzhong60@163. com.

表面和特异性的细胞器,如内吞型溶酶体^[2],主要识别的是胞外微生物,其在识别细胞表面的致敏原进而在过敏反应中发挥重要作用,在这一领域已有较多研究。但一些微生物可以逃避细胞膜 PRR,进入细胞内。如何识别此类病原体及胞内菌,引起研究者的不断探索。后来发现 Nod 样模式受体 (nod like receptors, NLRs) 具有这种功能^[3]。近年来,这种新近发现但“古老”的模式受体在包括过敏反应在内的上呼吸道炎症反应中的作用正受到重视。有关 NLR 受体 Nod1、Nod2 在鼻息肉中作用的文献报道不多,本研究拟深入探讨 NLR 受体 Nod1、Nod2 在鼻息肉发病中的作用,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2011 年 9 月~2012 年 9 月南方医科大学珠江医院住院鼻息肉患者 20 例,其中男 12 例,女 8 例;年龄 27~55 岁,中位年龄 43 岁。采用 EPOS 2007 指南^[1]标准纳入研究组,所有患者入院前 3 周内未行抗炎和抗过敏治疗。同期选取本院行单纯鼻中隔偏曲矫正术时取正常下鼻甲黏膜患者 19 例作为对照组,男 11 例,女 8 例;年龄 22~57 岁,中位年龄 34 岁。本研究得到了南方医科大学珠江医院伦理委员会的批准,且征得所有研究对象知情签字同意。

1.2 标本处理

息肉组织与对照组织分别采用无菌生理盐水漂洗,尽量干燥后,各分 3 份,2 份置于冻存管中,液氮速冻,-80℃ 冻存。余下 1 份置于福尔马林溶液中,包埋成石蜡块。

1.3 实验方法

1.3.1 Western-blot 法 将 100 mg 鼻黏膜组织块置于匀浆器中,剪碎。加蛋白裂解液于匀浆器中,进行匀浆研磨(冰上操作)。将裂解液移至 1.5 ml 离心管中,冰上裂解,离心,取部分上清,加入上样 buffer,煮沸 10 min。缓慢恢复室温后,稍离心,放于 -20℃ 保存。BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白上样量为 20 μg,样品经过 10% SDS-PAGE 胶 100 V 恒压 30 min,120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。湿转法将

SDS-PAGE 胶上蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 后;与鼠抗人 Nod1 抗体 (R&D, 1:500 稀释) 或 Nod2 抗体 (MILLIPORE, 1:800 稀释),NALP3 (R&D, 1:800 稀释) GAPDH (上海康成生物, 1:10,000 稀释) 37℃ 孵育 2 h,含 0.1% Tween-20 的 TBST 洗膜 5 min,3 次后用相应二抗(兔抗鼠 IgG, southern biotech, 1:4000 稀释) 37℃ 孵育 1 h。先后用 TBST 及 TBS 漂洗膜。将杂交膜置于暗匣上, ECL 化学发光检测。结果经灰度扫描后采用 IPWIN 60 软件进行半定量分析。

1.3.2 免疫组织化学 样本脱蜡、水化,柠檬酸盐溶液高温高压,130℃ 煮 5 min,喷气 2 min,行抗原修复,3% H₂O₂ 孵育 5 min,添加鼠抗人 Nod1 单克隆抗体 (R&D),分别稀释成 1:1600,鼠抗人 Nod2 单克隆抗体 (MILLIPORE) 1:100,室温下孵育 60 min,PBS 冲洗,3 min × 3 次;添加通用 HRP 多聚体(珠海泉晖),室温下孵育 20 min,PBS 冲洗,2 min × 3 次;滴加 DAB(二氨基联苯胺)显色液显色 5 min;自来水充分冲洗、苏木精复染、脱水、透明、封片。显微镜下观察并摄片。阴性对照采用 PBS 代替一抗,后用二抗及其余条件相同。阳性标准为染成棕褐色,再依据光密度值计算着色差异。

1.3.3 酶联免疫吸附测定 取 100 mg 鼻黏膜组织块置于液氮冷却的研钵中,液氮下彻底研磨,并加入 1 ml PBS,离心,取上清液,BCA 法测定总蛋白浓度。按 IL-4 ELISA 试剂盒说明书进行操作(购自浙江联科生物技术有限公司),测定在 450 nm 下吸光度(A)。根据 A 值及标准曲线求出 IL-4 浓度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据方差齐性检验,若方差齐则采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐采用 *t* 检验,相关系数采用 Pearson 相关分析。检验水准为 0.05,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western-blot 检测结果

两种 Nods 样蛋白均在两组中表达,但表达量不同。通过灰度值比较发现,Nod1 在鼻息肉

中的表达较对照组增高,差异有统计学意义($t=5.490, P=0.0262$)。Nod2 在两组中的表达无明显差异($t=0.773, P=0.3362$);结果见图 1,2。

2.2 免疫组织化学结果

结果如图 3,采用 DAB (二氨基联苯胺)显色,苏木精复染,棕褐色染色为阳性结果。两种 Nods 样受体在两组中均有表达,主要表达在上皮细胞胞质中,腺体细胞及部分炎症细胞胞质也有表达。通过 Image pro plus 6.0 软件比较光密度,Nod1 在鼻息肉组中表达强于对照组, ($t=5.392, P=0.0060$)。Nod2 在两组中的表达差异无统计学意义。采用 Pearson 对两种受体进行相关分析 Nod1 与 Nod2 在两组组织中的表达呈正相关,相关系数 $r=0.426, P=$

0.003。

2.3 ELISA 结果

鼻息肉组织匀浆液 IL-4 (28.60 ± 14.96) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 高于正常下鼻甲黏膜组 (13.01 ± 4.59) $\mu\text{g}/\text{mg}$,两组 IL-4 含量比较,差异具有统计学意义($t=7.790, P=0.001$)。

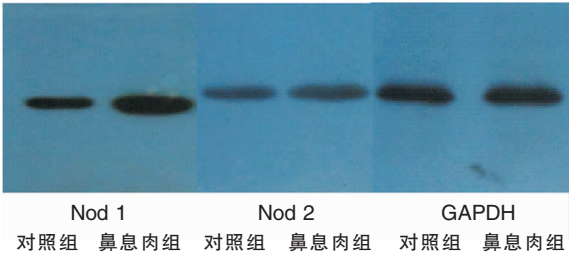


图 1 Western-blot 电泳图

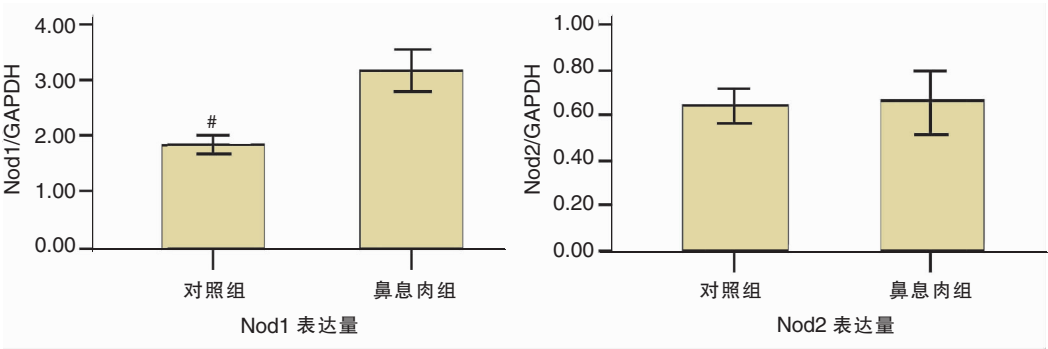


图 2 两组组织中 Nod1 与 Nod2 的相对表达量

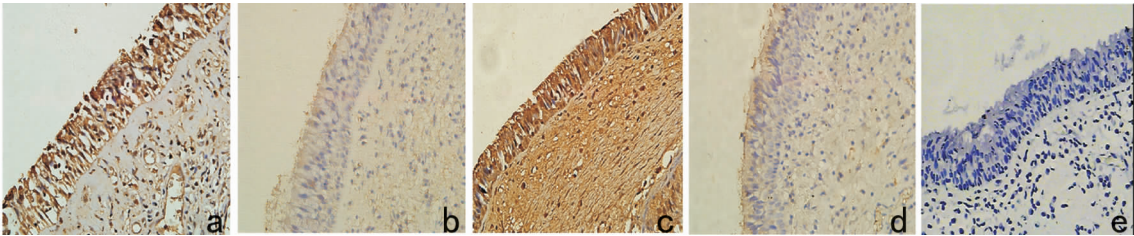


图 3 Nods 样受体免疫组织化学染色 a、b: 对照组 Nod1、Nod2 (DAB $\times 400$); c、d: 鼻息肉组 Nod1、Nod2 (DAB $\times 400$); e: 阴性对照 (DAB $\times 200$)

3 讨论

鼻息肉作为临床鼻科学常见病,发病机制至今未完全阐明,但其与感染之间的关系一直是研究的热点。国内学者的研究表明,中国人鼻息肉的发病主要以中性粒细胞为主,而不同于国外鼻息肉以嗜酸性细胞为主^[4],据 Sun 等^[5]报道,国内 68.4% 鼻息肉含有细菌生物膜,生物膜为微生物慢性感染提供了机会,从

细胞学、病原角度说明了感染因素在国内鼻息肉形成中的重要作用。在以往的自然免疫研究中,往往关注 Toll 样受体。如顾兆伟等^[6]最近研究发现,慢性鼻窦炎鼻息肉中 TLR2、TLR4 的表达,认为与鼻息肉的发病机制有关。本课题研究提示 Nods 样受体在鼻腔黏膜及息肉组织中表达,与国外报道一致。Bogefors 等^[7]通过实验得出,在变应性鼻炎及健康人鼻腔黏膜中均存在 Nod1, Nod2 的表达。Mansson 等^[8]通过比较扁桃体、腺样体和鼻息肉,发现上述组织

均检测到 Nod1、Nod2 mRNA 及蛋白质的表达。说明在天然免疫中,不仅仅是 Toll 样受体,Nods 同样也存在表达,Nods 对鼻息肉形成同样具有一定作用。

Nod1 激活后可以引起 Th2 细胞因子的释放,从而加重或维持鼻息肉炎症。许多文献提供了证据。如 Fritz 等^[9]通过小鼠实验说明,Nod1 对适应性免疫意义巨大,单用 Nod1 的配体就可以使特异性免疫向 Th2 为主的方向分化,引起 IL-4 等的升高。Duan 等^[10]通过哮喘模型实验发现,Nod2 的配体可以阻断呼吸道免疫耐受,即抑制 CD4(+)、FOXP3(+)细胞的产生,促进 Th2 为主的变应性反应,而加重哮喘病情。并认为这是通过增强胸腺间质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)和 IL-25 的产生,促进 TNF 家族 OX40 配体的表达,进而增强抗原递呈和激活 T 淋巴细胞来实现这一结果的。最近,Shin 等^[11]也通过变应性鼻炎动物模型实验证明,Nod1 的配体可以增强变应原特异性 Th2 的应答,并且可以抑制调节性 T 细胞的产生,从而加重变应性鼻炎病情。与既往许多研究提示的那样,鼻息肉中 Th2 细胞因子含量升高。本研究显示鼻息肉组织匀浆中 IL-4 浓度较下鼻甲组织高。IL-4 可以促进 B 细胞增值分化,是诱导 IgE 合成关键的细胞因子之一,可以成为鼻息肉炎症持续的原因之一。这些研究都是建立在动物模型上,由 Nod1 的激活引起 IL-4 等细胞因子增高在人体是否成立,尚需要进一步研究。

本研究探索了 Nod1 在鼻息肉组织形成中的作用,为进一步阐明感染因素在国内鼻息肉患者中作用打下基础。结合 IL-4 检测,说明鼻息肉是含感染和变态反应双重因素的疾病。临床上糖皮质激素药物治疗鼻息肉,部分效果不佳,文卫平等^[12]认为可能是中心粒细胞浸润的结果。本研究为改进临床现有单纯糖皮质激素治疗鼻息肉,也可以提供新的依据。

参考文献:

- [1] Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007 [J]. Rhinol Suppl, 2007, (20): 1-136.
- [2] Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity [J]. Immunity, 2007, 26(4): 445-459.
- [3] Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease [J]. Nat Immunol, 2006, 7(12): 1250-1257.
- [4] Cao PP, Li HB, Wang BF, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(3): 478-484.
- [5] Sun Y, Zhou B, Wang CS, et al. Clinical and histopathologic features of biofilm-associated chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Chinese patients [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(6): 1104-1109.
- [6] 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.
- [7] Bogefors J, Rydberg C, Uddman R, et al. Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? [J]. Allergy, 2010, 65(10): 1222-1226.
- [8] Mansson A, Bogefors J, Cervin A, et al. NOD-like receptors in the human upper airways: a potential role in nasal polyposis [J]. Allergy, 2011, 66(5): 621-628.
- [9] Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity [J]. Immunity, 2007, 26(4): 445-459.
- [10] Duan W, Mehta AK, Magalhaes JG, et al. Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(6): 1284-1293.
- [11] Shin JH, Kim SW, Park YS. Role of NOD1-Mediated Signals in a Mouse Model of Allergic Rhinitis [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 147(6): 1020-1026.
- [12] Wen WP, Liu W, Zhang L, et al. Increased neutrophilia in nasal polyps reduces the response to oral corticosteroid therapy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(6): 1522-1528.

(修回日期:2013-04-25)