

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201401015

· 基础报道 ·

SOCS3 和 Eotaxin 蛋白及其 mRNA 在变应性 鼻炎鼻黏膜组织中的表达

吴兴宇, 余文胜

(鄂州市中心医院 耳鼻咽喉科, 湖北 鄂州 436000)

摘要: **目的** 观察细胞因子信号转导抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS3)、嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin) 在变应性鼻炎鼻黏膜组织中的表达。**方法** 采用 RT-PCR 检测 24 例变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 患者鼻黏膜组织 (AR 组) 和 22 例单纯鼻中隔偏曲患者黏膜组织 (对照组) 中 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 的表达水平, 采用免疫组织化学方法检测两组患者鼻黏膜组织中 SOCS3、Eotaxin 蛋白的表达情况, 分析 SOCS3、Eotaxin 蛋白及 mRNA 表达的相关性。**结果** AR 组鼻黏膜组织中 SOCS3、Eotaxin 蛋白及 mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 且 AR 鼻黏膜组织中 SOCS3 蛋白及 mRNA 的表达水平与 Eotaxin 蛋白及 mRNA 的表达呈正相关。**结论** SOCS3 与 Eotaxin 蛋白及其 mRNA 的表达可能在变应性鼻炎的发生过程中起到了一定的作用。

关键词: 细胞因子信号转导抑制因子 3; 嗜酸性粒细胞; 嗜酸性粒细胞趋化因子; 变应性鼻炎

中图分类号: R765.21 **文献标识码:** B **文章编号:** 1007-1520(2014)01-0059-04

变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR) 是一种发病率较高的变态反应性疾病, 其病理特征主要是鼻黏膜组织中嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin) 的表达水平过高, 在 AR 发病过程中占有重要地位^[1-2]。有相关研究证实^[3], Eotaxin 蛋白主要表达于 AR 鼻黏膜组织的多种细胞, Eotaxin 蛋白阳性表达细胞数量与嗜酸性粒细胞 (EOS) 数量呈正相关。细胞因子信号转导抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling-3, SOCS3) 则是最近才发现的负向调节蛋白分子, 可抑制多种细胞因子的信号转导通路, 主要表达在 Th2 细胞中并起到抑制 Th1 型免疫反应的生理学作用^[4-5]。本研究拟观察 SOCS3、Eotaxin 蛋白在 AR 鼻黏膜组织中的表达, 并探讨其作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

我院 2008 年 9 月 ~ 2013 年 2 月期间门诊或住院治疗 24 例 AR 患者, 均符合诊断标准^[6], 其中男 15 例, 女 9 例; 年龄 28 ~ 45 岁,

平均年龄 (37.8 ± 6.7) 岁。同期选择 22 例鼻中隔偏曲矫正术患者的下鼻甲黏膜组织作为对照组, 其中男 12 例, 女 10 例; 平均年龄 (38.5 ± 8.2) 岁。经医院伦理委员会批准, 术前患者知情同意并签字。排除有过敏史、鼻息肉家族史、支气管哮喘史和阿司匹林治疗耐受不佳等。

1.2 实验试剂及材料

兔抗人 SOCS3 抗体购自 Gen Script 公司, 兔抗人 Eotaxin 蛋白抗体购自 Santa Cruz 公司, 二抗和 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司, SOCS3、Eotaxin 上下游引物由上海生物技术有限公司合成, DNA marker 购自北京鼎国生物技术有限公司, 无水酒精、盐酸、多聚甲醛和二甲苯购自武汉回盛生物科技有限公司。

1.3 免疫组化法检测 SOCS3 及 Eotaxin 蛋白表达

两组鼻黏膜组织完全浸泡在 4% 浓度多聚甲醛溶液中处理 24 h, 组织包埋和切片, 组织标本切片后常规脱蜡, 加热去除标本中的内源性过氧化物酶, 正常羊血清 (1:10) 封闭处理后加入一抗 (兔抗人 SOCS3 抗体, 效价 1:100; 兔抗人 Eotaxin 蛋白抗体, 效价 1:100), 37℃ 温度条件下作用 30 min, 0.01 mol/L 浓度 PBS 溶液洗片后加入二抗 (羊抗兔 IgG, 效价 1:100),

作者简介: 吴兴宇, 男, 副主任医师。
通信作者: 余文胜, Email: wuxinyuwx@126.com

37℃ 温度条件下作用 30 min, 洗片后加入 SP 复合物, 37℃ 温度条件下作用 30 min。洗片后加入 DAB 溶液室温条件下显色反应 5 min, 脱水和透明处理后予以中性树胶封片。用已知阳性组织切片为阳性对照, 以 PBS 溶液代替一抗作为阴性对照。每张切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野, 将图像输入 Image-pro Plus 6.0 专业图像分析软件, 经过光密度校正、阳性区域选定和滤波处理后, 计算各组鼻黏膜组织中阳性区域的平均光密度值。

1.4 RT-PCR 法检测 SOCS3 mRNA 及 Eotaxin mRNA 表达

采用 RT-PCR 法检测两组患者鼻黏膜组织中 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 的表达。采用 Trizol 抽提组织中的 RNA^[7], 取 5 μg 总 RNA 经逆转录方法合成 cDNA, 根据 GeneBank 设计 SOCS3 和 Eotaxin 的上下游引物序列。SOCS3 上游引物: 5'-CAGCTCCAAGAGCGAGTAC-3', 下游引物: 5'-GTTCTTGCTCCCAGA CT-3', 扩增产物长度为 225 bp; Eotaxin 上游引物 5'-CAT-GAAGGTCTCCGCAG CACTTCT-3', 下游引物 5'-CCAGATACTTCATGGAATCCTGC-3', 扩增产物长度为 266 bp; GAPDH 上游引物: 5'-ATCATGTTT-GAGACCTTTCAACA-3', 下游引物: 5'-CATCTCT-TGCTCGAAGTCCA-3', 扩增产物长度为 318 bp。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性处理 10 min, 94℃

变性处理 40 s, 56℃ (GAPDH) 或 54℃ (SOCS3, Eotaxin 蛋白) 条件下退火处理, 72℃ 作用 40 s, 共 30 个循环过程, 最后 72℃ 温度条件下延伸处理 10 min。

1.5 统计学处理方法

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计和分析, 两组 SOCS3、Eotaxin 蛋白及 mRNA 表达水平比较采用 *t* 检验, 相关性关系采用 Pearson 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组鼻黏膜组织中 SOCS3 及 Eotaxin 蛋白表达水平比较

SOCS3、Eotaxin 蛋白在鼻黏膜上皮细胞、腺体细胞、血管内皮细胞均有表达, 主要表达在单核细胞。SOCS3 和 Eotaxin 蛋白均在细胞浆着色, 呈棕黄色或棕褐色颗粒。AR 组鼻黏膜组织中 SOCS3、Eotaxin 蛋白的表达水平明显高于对照组 ($t_1 = 8.027, t_2 = 8.185, P < 0.01$), 见表 1 及图 1~4。

表 1 两组 SOCS3 及 Eotaxin 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOCS3	Eotaxin 蛋白
AR 组	24	0.27 ± 0.05 *	0.24 ± 0.04 *
对照组	22	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.03

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

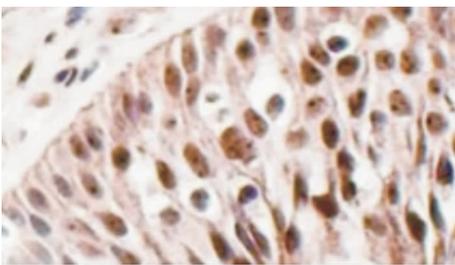


图 1 AR 组 Eotaxin 蛋白表达 (苏木精 × 400)

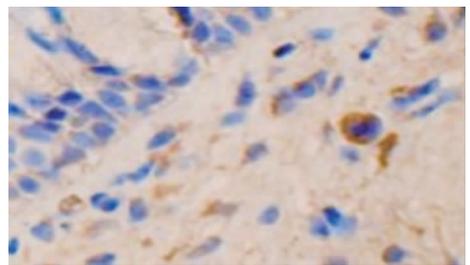


图 2 对照组 Eotaxin 蛋白表达 (苏木精 × 400)

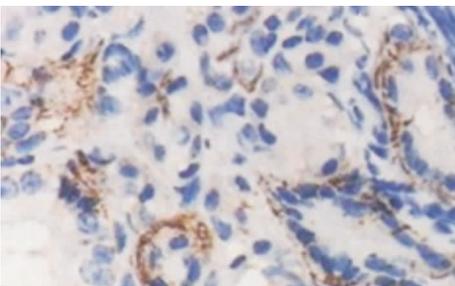


图 3 AR 组 SOCS3 表达 (苏木精 × 400)

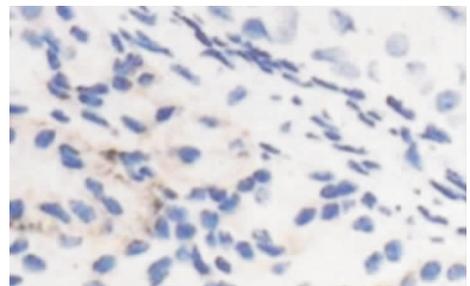


图 4 对照组 SOCS3 表达 (苏木精 × 400)

2.2 AR 组 SOCS3 与 Eotaxin 蛋白表达水平相关性分析

AR 患者鼻黏膜组织中 SOCS3 与 Eotaxin 蛋白表达水平呈正相关 ($r = 0.927, P < 0.01$), 见图 5。

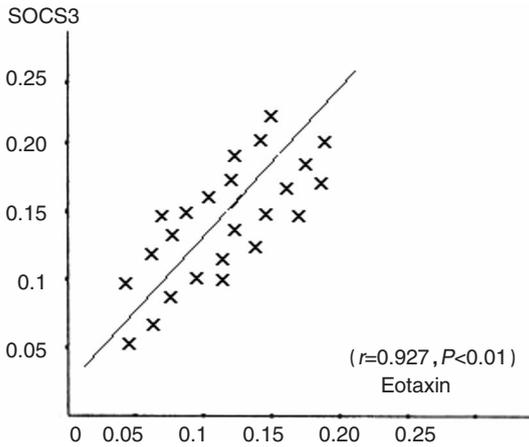


图 5 AR 组 SOCS3、Eotaxin 蛋白表达水平相关性分析

2.3 两组鼻黏膜组织中 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 表达水平比较

AR 组鼻黏膜组织中 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 表达水平明显高于对照组 ($t_1 = 9.245, t_2 = 9.731, P < 0.01$), 见表 2 及图 6。

AR 患者鼻黏膜组织中 SOCS3 mRNA 与 Eotaxin mRNA 的表达水平呈正相关 ($r = 0.854, P < 0.01$), 见图 7。

表 2 两组 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOCS3/GAPDH	Eotaxin/GAPDH
AR 组	24	$0.83 \pm 0.27^*$	$0.71 \pm 0.21^*$
对照组	22	0.32 ± 0.11	0.22 ± 0.08

注:与对照组比较, * $P < 0.01$



图 6 两组 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 表达

3 讨论

AR 是由 EOS、细胞因子、Eotaxin 蛋白共同参与的慢性炎症反应性疾病,其发病机制极为复杂,且目前仍未研究透彻^[6]。有较多研究证

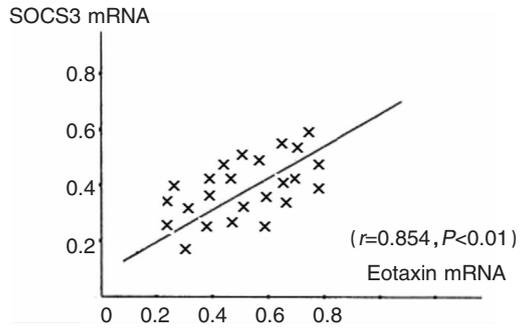


图 7 AR 组 SOCS3 mRNA、Eotaxin mRNA 表达水平相关性分析

实 Eotaxin 蛋白是一种作用强大的 EOS 激活剂,可与 EOS 表面上的趋化因子受体 3 (CCR3) 特异性结合,进而有效募集、趋化和激活 EOS,导致其发生浸润、粘附和聚集等现象^[8-10],在以 EOS 大量聚集为主要特征的过敏性反应中占有重要地位^[11]。Eotaxin 蛋白导致 EOS 聚集和活化的作用机制为^[12]:Eotaxin 蛋白与白介素-5 相互结合后刺激和动员骨髓组织中的 EOS 快速生长;Eotaxin 蛋白显著性增强对血管内皮细胞的粘附作用,促进 EOS 逐渐移行炎症反应局部组织并大量聚集;Eotaxin 蛋白可活化聚集在炎症反应局部组织的 EOS,进而释放 EOS 阳离子蛋白和毒性氧化物,使得组织受到严重损害。AR 患者机体内以 Th2 细胞及其细胞因子占优势地位,而 Th2 细胞主要合成和分泌多种炎症细胞因子,其中 IL-4 可明显增强 SOCS3 在 Th2 细胞上的表达水平,而 SOCS3 蛋白通过抑制 IL-12/STAT4 等信号转导通路,从而阻止 Th1 细胞及其细胞因子的合成和分泌^[13]。由此可知 SOCS3 表达水平过高是导致 AR 患者体内 Th1/Th2 比例明显失衡的重要原因之一^[14]。

有研究证实,Eotaxin-2 与 Eotaxin-1、Eotaxin-3 同属于趋化因子 CC 亚家族成员,它们均选择性的专一的与其共同的受体 CCR3 结合进而趋化并激活嗜酸性粒细胞。3 种趋化因子的生物学作用相似,与嗜酸性粒细胞表面的受体 CCR3 结合后可促使嗜酸性粒细胞合成白细胞三烯 C4 (LTC4)、产生活性氧簇、脱颗粒释放炎症介质等从而发挥其效应器功能^[15-17]。本研究结果显示,AR 组鼻黏膜组织中 SOCS3、Eotaxin 蛋白及 mRNA 的表达水平明显高于对照组,且 SOCS3 蛋白及 mRNA 的表达水平与 Eotaxin 蛋白及 mRNA 表达呈正相关,与上述研究文献报道相符。

推测原因可能是 SOCS3 增强 Th2 细胞的反应程度,间接性提高 Eotaxin 蛋白的表达水平;也可能是 SOCS3 直接与 Eotaxin 蛋白相互诱导作用所引起。

参考文献:

- [1] 李颖,陈向东. 雷公藤红素对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织中 NF- κ B 和 Eotaxin 蛋白表达的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2012,26(20):943-944.
- [2] Togias A. Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003,111(6):1171-1183.
- [3] 周明辉,董明敏,吴玉瑛,等. Eotaxin 蛋白基因和趋化因子受体 3 在变应性鼻炎大鼠模型鼻腔黏膜和骨髓中的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2006,20(5):227-230.
- [4] Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)-2 mediated allergic responses[J]. Nat Med,2003,9(8):1047-1054.
- [5] Egwuagu CE, Yu CR, Zhml M, et al. Suppressors of cytokine signaling proteins are diferentially expressed in Th1 and cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance[J]. J Immunol,2002,168(7):3181-3187.
- [6] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻喉科分会. 变应性鼻炎的诊治原则和推荐方案[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,12(2):166-167.
- [7] Mannhalter C, Koizar D, Mitterbauer G. Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA[J]. Clin Chem Lab Med, 2000,38(4):171-177.
- [8] Zimmermann N, Daugherty BL, Stark JM, et al. Molecular analysis of CCR-3 events in eosinophilic cells[J]. J Immunol, 2000,164(5):1055-1064.
- [9] Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, et al. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3[J]. J Allergy Clin Immunol,2000,106(2):507-513.
- [10] Dearman RJ, Filby A, Humphreys IR, et al. Interleukins 5 and 13 character ize immune responses to respiratory sensitizing acid anhydrides[J]. J Appl Toxicol, 2002,22(1):317-325.
- [11] 张志明,孙树岩,王寿忱,等. Eotaxin 蛋白基因在真菌诱导的变应性鼻炎鼻黏膜中的表达及其意义[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(2):78-81.
- [12] Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease[J]. Mol Med Today,2000,6(2):20-27.
- [13] Kubo M, Inoue H. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia[J]. Curr Allergy Asthma Rep,2006,6(1):32-39.
- [14] 洪娟,黄建民,林国经. Eotaxin-1 在真菌球型鼻-鼻窦炎合并鼻息肉中的表达与嗜酸性粒细胞浸润的相关性[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(2):135-138.
- [15] 王新龙,赵建东. SOCS3 及 Eotaxin 蛋白在变应性鼻炎中的表达及意义[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2010,24(2):26-29.
- [16] 凌永伟,欧阳贵平,谢洪亮,等. 变应性鼻炎患者鼻腔分泌物中嗜酸性粒细胞的检测[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2012,18(1):58-60.
- [17] 左冬至,耿宛平,刘强和. 变应性鼻炎治疗的进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2010,16(2):157-160.

(修回日期:2013-08-09)