DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201502015

· 短篇论著 ·

支原体感染与鼻息肉糖皮质激素治疗抵抗的关系及其机制研究

彭福森,杜友红,张艳红

(娄底市中心医院 耳鼻咽喉科,湖南 娄底 417000)

摘 要: **目的** 观察支原体感染与鼻息肉患者糖皮质激素治疗敏感性的关系并探讨其机制。**方法** 100 例鼻息肉患者中筛选出激素治疗敏感组 24 例和激素治疗不敏感组 18 例,并以单纯性鼻塞患者 80 例为对照组,采用 PCR 法分别检测其支原体的感染率及 GRα 和 GRβ 的表达水平。**结果** 激素治疗敏感组、激素治疗不敏感组及对照组中支原体感染率分别为 33.3%、88.9%、20%,敏感组和不敏感组比较支原体感染率差异具有统计学意义($P<0.05$),且敏感组和不敏感组支原体感染率与对照组比较差异均具有统计学意义($P<0.05$);支原体阳性鼻息肉患者 GRβ/GRα 比值显著高于对照组;支原体阳性、糖皮质激素不敏感鼻息肉患者 GRβ 表达水平显著高于支原体阴性鼻息肉患者,而 GRα 表达水平无显著差异。**结论** 支原体感染可能是鼻息肉发病的重要因素之一,可能通过上调 GRβ 的表达水平导致鼻息肉患者糖皮质激素治疗抵抗。

关 键 词: 支原体;糖皮质激素;鼻息肉

中图分类号: Q939.34;R765.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2015)02-0140-03

Relationship and the mechanism between mycoplasma infection and resistance of glucocorticoid therapy in nasal polyp patients

PENG Fu-sen, DU You-hong, ZHANG Yan-hong

(*Department of Otolaryngology, Central Hospital of Loudi City, Loudi* 417000, *China*)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship and the mechanism between mycoplasma infection and resistance of glucocorticoid (GC) therapy in nasal polyp patients. **Methods** 42 cases were screened out from 100 patients with nasal polyp. Of them, 24 cases were GC sensitive and 18 were GC insensitive. 80 cases with simple snuffle were chosen as control. Polymerase chain reaction technique was used for detecting the presence of mycoplasma and examining the expression of GRα/β in specimens of nasal polyp and normal nasal mucosa. **Results** The positive rates of mycoplasma infection in GC-sensitive, GC-insensitive and control group were 33.3%, 88.9% and 20% respectively. The differences of mycoplasma infection rate among the 3 groups were all statistically significant (all $P<0.05$). Ratio of GRα/β in patients with mycoplasma infection was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). Level of GRβ in GC-insensitive group accompanied with mycoplasma infection was significantly higher than that without mycoplasma infection ($P<0.05$). **Conclusions** Mycoplasma infection may be an important factor in the pathogenesis of nasal polyp. Up-regulated expression of GRβ may result in resistance of GC therapy in nasal polyp patients with mycoplasma infection.

Key words: Mycoplasma; Glucocorticoid; Nasal polyp

鼻息肉是发生于鼻腔及鼻窦黏膜的慢性炎症性疾病,其病情反复发作,严重影响患者的生活质量。除手术治疗外,糖皮质激素(glucocorticoid,GC)也是最有效的药物之一。它不但可使鼻息肉体积缩小,鼻塞改善,术后应用还可防止或延缓鼻息肉复发,然而临床上部分鼻息肉患者接受 GC 治疗效果并不满意。国内外研究表明,支原体感染在慢性鼻-鼻窦炎、鼻息肉的发生发展过程中可能起着重要作用[1-2]。本研究采用分子生物学方法对鼻息肉标本中支原体的感染情况进行检测,从而进一步验证支原体感染是否与鼻息肉的发病有关;同时比较对糖皮质激素敏感

作者简介:彭福森,男,硕士研究生,主治医师。
通信作者:彭福森,Email:pengsenxh@163.com

和不敏感鼻息肉患者中支原体感染率是否存在差异;最后,检测支原体感染和非感染鼻息肉标本中糖皮质激素受体α(glucocorticoid receptor alpha,GRα)与β(glucocorticoid receptor beta,GRβ)的表达水平情况,探讨鼻息肉糖皮质激素抵抗的可能机制。

1　对象和方法

1.1　患者选择

随机筛选我院接受门诊随访治疗的鼻息肉患者100例,所有研究对象均经过询问病史、鼻内镜检查、鼻腔鼻窦CT扫描确诊,并排除吸烟史、前期慢性鼻窦炎手术史、过敏史及近期急性呼吸道感染史等,亦无糖尿病、高血压、冠心病等全身性疾病。且患者至少2个月未接受GC全身治疗或至少1个月前未接受鼻腔局部GC治疗。所有患者均经过鼻内镜下取出部分鼻息肉标本。所有患者筛选前停止所有经鼻药物(可以始终接受经口抗组胺药物)。给予每次每侧鼻腔内布地奈德鼻喷剂两喷(64 μg),2次/d,并给予正确使用喷剂的指导。鼻腔用药1个月后,参照Jankowski等[3]GC疗效评定方法,0分:症状加重;1分:症状未得到控制;2分:症状轻微缓解;3分:症状基本控制;4分:症状完全控制。评分≥3分的患者纳入激素治疗敏感组,≤1分的患者纳入激素治疗不敏感组。共筛选出42例患者,其中激素治疗敏感组24例,激素治疗不敏感组18例。对照组均取自手术治疗的单纯性鼻塞患者(包括慢性肥厚性鼻炎、鼻中隔偏曲)的中鼻甲黏膜组织80例。经医院伦理委员会批准,术前患者知情同意并签字。

1.2　方法

1.2.1　*PCR法检测组织中支原体*　将获取的手术标本用无菌PBS漂洗后,剪成0.3~0.5 cm^3的碎块,按照大连宝生物公司提供的试剂盒提供的方法提取总DNA。设计支原体16 s rRNA引物:5'-CAATCGCTGATGCCGG ATACGC'-3(上游),5'-GG-TACCGTCAGTCTGCAAT'-3(下游),产物334bp。PCR反应条件:94℃变性10 min,然后94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,共40循环。最后一循环于72℃延伸7 min。取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.2.2　*RT-PCR法检测GRα/GRβ*　采用Trizol法提取总RNA并根据大连宝生物公司试剂盒说明合成cDNA。合成GRα/GRβ特异性引物用于PCR反应:cDNA 2 μl,10×PCR Buffer 5 μl,ddH_2O 34.5 μl,聚合酶0.5 μl,上下游引物各2 μl dNTP 4.0 μl,Tag酶0.5 μl充分混匀反应体系,按以下条件进行PCR扩增:94℃ 5 min后,进入25个循环:94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,最后72℃延伸7 min。应结束后各取6 μL PCR产物进行1.5%的琼脂糖凝胶观察。

1.3　统计学分析

用SPSS 13.0统计软件进行统计,检出率用%表示,不同组间比较采用χ^2检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　激素治疗敏感组、激素治疗不敏感组及对照组患者支原体检出率比较

100例确诊的鼻息肉患者中共46例支原体检测阳性;100例患者中筛选出激素治疗敏感患者24例和激素治疗不敏感患者18例,激素治疗敏感组、激素治疗不敏感组及对照组中支原体感染率分别为33.3%(8/24)、88.9%(16/18)、20%(16/80),激素治疗不敏感组支原体检出率显著高于激素治疗敏感组($P<0.05$),敏感组和不敏感组支原体感染率与对照组比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),且均高于后者。具体结果见表1。

表1　3组患者支原体检出率比较(例)

组别	例数	支原体	
		阳性	阴性
激素治疗敏感组	24	8	16
激素治疗不敏感组	18	16	2
对照组	80	16	64
合计	122	40	82

2.2　支原体感染标本中GRβ/GRα表达情况

46例支原体阳性标本当中GRβ/GRα比值显著高于对照组。此外,16例支原体阳性、糖皮质激素治疗不敏感患者当中,GRβ表达水平显著高于支原体阴性患者。而GRα表达量在两组中保持不变,见图1。

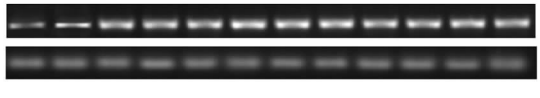

图1　部分支原体阳性、糖皮质激素不敏感患者GRβ和GRα的表达情况　1~2:支原体阴性组;3~12:支原体阳性、糖皮质激素不敏感组

3 讨论

鼻息肉发病原因目前仍然不明,现趋向于病因上多因素,病理上多环节,细胞生物学方面是多信号、多基因参与的结果[4-5]。经典的致病性支原体肺炎支原体对于鼻腔黏膜的感染作用已经得到证实。肺炎支原体感染鼻腔纤毛上皮后可导致上皮细胞迅速出现纤毛活动减弱、上皮细胞溶解、破坏。正常情况下,人类上呼吸道黏膜表面存在的内源性支原体,在局部微生态环境发生改变时,可大量繁殖,使得组织细胞染色体断裂而产生细胞破坏。而鼻腔鼻窦纤毛上皮的破坏、黏液纤毛清除系统功能的紊乱是慢性鼻窦炎、鼻息肉发病的重要病理生理学基础。采用PCR技术Gurr等[1]发现肺炎支原体在慢性鼻-鼻窦炎、鼻息肉标本中的检出率显著高于肥厚性鼻炎,表明支原体感染在慢性鼻-鼻窦炎、鼻息肉的发生发展过程中可能起着重要作用。本研究中100例鼻息肉患者共检出出支原体阳性患者46例,感染率为46%,而80例单纯鼻塞患者仅检出16例,感染率仅为20%,两者比较差异具有统计学意义($P<0.05$),与上述研究相符。

Lyama等[6]于体外实验中发现某些支原体的脂质相关膜蛋白(lipid-associated membrane proteins,LAMPS)可下调哺乳动物细胞对糖皮质激素的敏感性。通过PCR技术本研究发现鼻息肉患者中糖皮质激素治疗不敏感组支原体感染率显著高于激素治疗敏感组,提示支原体感染可降低鼻息肉患者对糖皮质激素治疗的敏感性。大量研究表明,糖皮质激素抑制炎症反应的前提是与黏膜上皮、腺体及血管内皮细胞胞质和胞核上的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)相结合,从而下调炎症细胞因子和介质的转录,最终引起各种生物学效应。激素与GRα结合后,其复合物转移到细胞核内,与DNA上的激素反应元件结合,使激素敏感基因的转录活性增强,从而产生一系列的生理及药理学效应[7]。GRβ无激素结合功能,也不能活化激素靶基因,GRβ有完整的DNA结合域,能与激素以非依赖性方式结合,与GRα形成异二聚体,此异二聚体束缚DNA启动子区,籍此抑制糖皮质激素发挥作用[8-9]。研究表明,机体所有的有核细胞均表达一定数量的GRα,除肠组织外,GRβ在所有的有核细胞也有少量表达[10-11]。在复发性鼻息肉、初发鼻息肉、单纯鼻窦炎及正常鼻黏膜的上皮、腺体和炎症细胞的胞质和胞核中均有GR的表达,且在鼻息肉的发生发展及复发过程中,GC功能性受体GRα无明显变化,但其抑制性受体GRβ表达明显增高,从而削弱GC的炎症抑制作用,因此认为GRβ在慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉糖皮质激素治疗不敏感的机制中可能起着重要作用。本研究中支原体阳性鼻息肉患者GRβ/GRα比值显著高于对照组,支原体阳性、糖皮质激素不敏感鼻息肉患者GRβ表达水平显著高于支原体阴性鼻息肉患者($P<0.05$),表明支原体感染可能通过上调GRβ的表达水平而导致鼻息肉患者对糖皮质激素治疗不敏感。

参考文献:

[1] Gurr PA, Chakraverty A, Callanan V, et al. The detection of mycoplasma pneumoniae in nasal polyps[J]. Clin Otolaryngol Allied Sci, 1996,21(3):269-273.

[2] 张艳红,杜有红,李泉,等. 支原体感染与慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉患者糖皮质激素治疗敏感性的关系探讨[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2009,15(6):423-425.

[3] Jankowski R, Schrewelius C, Bonfils P, et al. Efficacy and tolerability of budesonide aqueous nasal spray treatment in patients with nasal polyps[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 127(4):447-452.

[4] 顾兆伟,曹志伟,王韫秀. Eotaxin-3在鼻息肉中的作用[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2012,18(6):472-474.

[5] 张沈华,申聪香,文忠,等. N0d1与N0d2模式识别受体在鼻息肉发病中的作用[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013,19(3):192-195.

[6] Lyama K, Zhang S, Lo SC. Effects of mycoplasmal LAMPs on receptor res,4onses to steroid hormones in mammalian cells[J]. Curr Microbiol,2001,43(3):163-169.

[7] Wang DS, Liu QS, Lai HC. Effects of budesonide on the expression of the glucocorticoid receptor-α in nasal polyp epithelial cells[J]. Am J Rhinol Allergy, 2013,27(2):123-127.

[8] Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002,83(1):37-48.

[9] Pujols L, Mullol J, Torrego A,et al. Glucocorticoid receptors in human airways[J]. Allergy, 2004,59(10):1042-1052.

[10] Pujols L, Mullol J, RocaFerrer J, et al. Expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human cells and tissues[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2002,283(4):1324-1331.

[11] Shirasaki H, Watanabe K, Kanaizumi E, et al. Expression and localization of steroid receptors in human nasal mucosa[J]. Acta Otolaryngol,2004,124(8):958-963.

(修回日期:2014-06-07)