

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201701014

· 短篇论著 ·

白细胞介素-25 与白细胞介素-13 及血管内皮生长因子在鼻息肉组织中的表达

曹珊珊¹, 刘领波², 李红英²

(1. 承德医学院研究生学院, 河北 承德 067000; 2. 保定市第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 保定 071000)

摘要: **目的** 通过观察慢性鼻-鼻窦炎伴有鼻息肉(CRSw NP)患者鼻息肉组织中白细胞介素-25(interleukin-25, IL-25)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达及分布,来探讨其在鼻息肉发病中的作用及三者的相关性。**方法** 选取30例在鼻内镜下行手术治疗的慢性鼻-鼻窦炎伴有鼻息肉患者鼻息肉组织作为实验组,同期选取30例因鼻中隔偏曲而行下鼻甲部分切除患者的下鼻甲黏膜组织作为对照组。应用免疫组织化学SP法来检测两组鼻黏膜组织中IL-25、IL-13及VEGF的表达情况,并采用直线相关分析和 χ^2 检验进行统计学分析。**结果** 免疫组化结果显示,IL-25、IL-13及VEGF在鼻息肉组织中的阳性细胞计数分别为(21.0 ± 12.08 、 23.94 ± 18.23 、 19.13 ± 9.85),均高于对照组(4.19 ± 2.54 、 7.67 ± 2.02 、 3.44 ± 1.52),两两比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$);3个因子在鼻息肉组织中的表达两两均呈正相关性($P < 0.01$)。**结论** IL-25、IL-13及VEGF在鼻息肉组织中的表达均升高,在鼻息肉的发病中可能起重要作用;鼻息肉组织中IL-25、IL-13及VEGF的表达两两均呈正相关,提示细胞因子之间的相互作用对鼻息肉发生起促进作用;以细胞因子及其受体为靶点,可能对开拓治疗鼻息肉的新方法提供理论依据。

关键词: 白细胞介素-25;白细胞介素-13;血管内皮生长因子;鼻息肉;免疫组织化学
中图分类号: R765.25 **文献标识码:** A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(1):63-66,70]

Expressions of Interleukin-25, Interleukin-13 and vascular endothelial growth factor in nasal polyp tissues

CAO Shan-shan¹, LIU Ling-bo², LI Hong-ying²

(1. Graduate School of Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Baoding Fist Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract: **Objective** To explore the roles and correlations of interleukin-25 (IL-25), interleukin-13 (IL-13) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in nasal polyps by observing their expressions and distributions in nasal polyps of patients suffering from chronic rhinitis sinusitis with nasal polyps (CRSw NP). **Methods** 30 cases suffering from CRSw NP and received endoscopic surgical treatment were chosen as experimental group while 30 cases received partial inferior turbinectomy due to nasal septum deviation as control. Specimens of nasal polyp and mucosa of inferior turbinate were obtained from the experimental group and the control group respectively. Immunohistochemical SP method was adopted to detect their expressions in all the specimens. Linear correlation analysis and χ^2 test were used for statistical analysis. **Results** Immunohistochemistry showed that the positive cells of IL-25, IL-13 and VEGF in the experiment group were 21.0 ± 12.08 , 23.94 ± 18.23 and 19.13 ± 9.85 respectively, which were higher than those of the control group (4.19 ± 2.54 , 7.67 ± 2.02 and 3.44 ± 1.52). Pairwise comparisons revealed statistically significant differences (all $P < 0.05$). The expressions of the three factors in nasal polyps were positively correlated with each other (all $P < 0.01$). **Conclusions** The expressions of IL-25, IL-13 and VEGF in nasal polyps are enhanced, which may play important roles in the pathogenesis of nasal polyps. The positive correlations between the expression of the three factors with each other in nasal polyps suggest that cytokines interaction may promote the occurrence of nasal polyps. Targeting cytokines and their receptors as potential therapeutic strategy may provide theoretical bases for developing new ways for the treatment of nasal polyps.

作者简介:曹珊珊,女,在读硕士研究生。
通信作者:刘领波,Email:liulbmm@sohu.com

Key words: Interleukin-25; Interleukin-13; Vascular endothelial growth factor; Nasal polyps; Immunohistochemistry

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(1): 63-66, 70]

鼻息肉由于其病因的多元性和明显的术后复发倾向故而在鼻科疾病中占据重要地位,据文献报道,鼻息肉的发病率为1%~4%^[1]。近年来细胞因子在鼻息肉的发生、发展中的作用越来越被引起重视,无论是鼻息肉组织固有层中炎性细胞的浸润、纤维组织的增生,还是血管的增生、扩张,局限性或弥漫性的组织水肿以及上皮细胞的增生等都与细胞因子有或多或少的关联^[2]。本文通过免疫组化SP法检测白细胞介素-25(interleukin-25, IL-25)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在鼻息肉组织下鼻甲黏膜组织中的表达,并分析三者表达的相关性,进而为探讨鼻息肉发病机制和更有效的治疗鼻息肉以及防止鼻息肉复发提供理论和实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

根据2012年版欧洲鼻窦炎、鼻息肉意见书(EPOS2012)诊疗指南^[3],收集2014年2月~2015年6月在保定市第一医院耳鼻咽喉头颈外科住院行鼻内镜手术治疗的慢性鼻-鼻窦炎伴有鼻息肉患者30例,同期选取因鼻中隔偏曲行下鼻甲部分切除患者30例作为对照组。病例纳入标准:①患者年龄均满18周岁;②所有病例均排除支气管哮喘、变应性鼻炎、阿司匹林耐受不良和其他系统严重疾病;③均否认前期鼻部手术史;④所有患者在手术前1个月内未使用抗生素、抗组胺类药及糖皮质激素等药物,并均经术后病理确诊。

鼻息肉组30例,男16例,女14例;年龄18~65岁,平均年龄43.2岁;术前鼻窦CT及鼻内镜检查结果阳性且术后经病理确诊为息肉者。对照组30例,男16例,女14例;年龄18~62岁,平均年龄41.2岁;鼻中隔偏曲方向的对侧,下鼻甲代偿肥大而行下鼻甲部分切除者。所有标本采集后常规制成蜡块保存。性别及年龄构成经过统计学检验,组间具有可比性。所有患者均被告知相关研究信息并签有知情同意书。

1.2 试剂与来源

以下试剂均购自北京博奥森生物技术有限公司:

兔抗人IL-25单克隆抗体,兔抗人IL-13单克隆抗体,试剂兔抗人VEGF单克隆抗体、DAB显色试剂盒、SP试剂盒(通用型)。

1.3 免疫组织化学技术

标本浸蜡包埋保存。每例标本连续切片3张,分别用来检测IL-25、IL-13、VEGF,切片厚度为4 μm。之后进行展片、捞片、烤片。二甲苯和梯度酒精脱蜡置水,0.3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,0.01 M枸橼酸缓冲液(PH 6.0)进行抗原修复,滴加一抗,4℃过夜。次日滴加二抗,DAB显色。PBS代替一抗为阴性对照。棕黄色或棕褐色表示阳性表达。每张玻片随机选取高倍镜(×400)下背景清晰、阳性细胞数较密集的视野5个,统计阳性细胞数,并计算每个高倍镜视野下阳性细胞所占百分比,取其平均值来计分评价。

1.4 结果判定

显微镜下观察,IL-25、IL-13及VEGF均为胞质着色,用半定量分析:以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分,组织切片中胞质染为淡黄色至棕褐色者视为阳性表达。染色强度以多数细胞呈现的染色特性(染色深浅和背景色对比)计分:无着色计0分,淡黄色计1分,棕黄色计2分,棕褐色计3分。阳性细胞百分比即一类细胞5个高倍视野下(每400倍视野下计数100个该类细胞)的阳性细胞平均数:0~5%计0分,6%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,>75%计4分。每张切片随机取5个400倍视野,每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比综合计分,染色强度与阳性细胞百分比的乘积: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(+++)^[4]。

1.5 统计学方法

应用SPSS 19.00软件对所得数据行统计学分析。两组间的比较采用独立样本 t 检验,组间样本率的比较用 χ^2 检验,Spearman行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者IL-25的表达

IL-25在息肉组织中主要表达在炎性细胞胞质

内。息肉组中呈强阳性表达,阳性率为 83.3%,下鼻甲黏膜中呈弱阳性表达,阳性率为 10.0%。组间比较结果:IL-25 的表达息肉组高于下鼻甲组($\chi^2 = 19.25, v = 2$),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体临床数据见表 1、图 1。

表 1 鼻息肉组及下鼻甲组 IL-25 的表达(例,%)						
组别	例数	IL-25 表达(分)				
		+++	++	+	-	阳性率(%)
鼻息肉组	30	6	15	4	5	83.3
对照组	10	0	0	1	9	10.0
χ^2		19.25				
P		0.000				

2.2 两组患者 IL-13 的表达

IL-13 在鼻息肉组织中主要存在于炎性细胞,定位于包质或胞膜。IL-13 在息肉组中呈强阳性表达,阳性率为 90.0%,下鼻甲黏膜中呈弱阳性表达,阳性率为 10.0%。组间比较结果:IL-13 的表达息肉组高于下鼻甲组($\chi^2 = 26.02, v = 2$),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体临床数据见表 2、图 2。

表 2 鼻息肉组及下鼻甲组 IL-13 的表达(例,%)						
组别	例数	IL-13 表达(分)				
		+++	++	+	-	阳性率
鼻息肉组	30	5	16	6	3	90.0
对照组	10	0	0	1	9	10.0
χ^2		26.02				
P		0.000				

2.3 两组患者 VEGF 的表达

VEGF 的阳性表达部位主要在胞质。VEGF 在息肉组中呈强阳性表达,阳性率为 86.7%,下鼻甲黏膜中呈弱阳性表达,阳性率为 20.0%。组间比较结果:VEGF 的表达息肉组高于下鼻甲组($\chi^2 = 17.23, v = 2$),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。具体临床数据见表 3、图 3。

表 3 鼻息肉组及下鼻甲组 VEGF 的表达(例,%)						
组别	例数	VEGF 表达(分)				
		+++	++	+	-	阳性率
鼻息肉组	30	10	10	6	4	86.7
对照组	10	0	0	2	8	20.0
χ^2		17.23				
P		0.000				

2.4 IL-25、IL-13 与 VEGF 在鼻息肉组织中表达的相关性分析

应用 Spearman 对所得数据行相关性分析可得:息肉组织中 IL-25 与 IL-13 的表达呈正相关($0 < r = 0.400 < 1, P < 0.05$),IL-13 与 VEGF 的表达呈正相关($0 < r = 0.632 < 1, P < 0.05$),IL-25 与 VEGF 的表达呈正相关($0 < r = 0.738 < 1, P < 0.05$)。

表 4 鼻息肉组织中 IL-25、IL-13 和 VEGF 的表达及相关性(个/LP, $\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	IL-25	IL-13	VEGF
鼻息肉组	30	21.10 $\pm$ 12.08	23.94 $\pm$ 18.23	19.13 $\pm$ 9.85
对照组	30	4.19 $\pm$ 2.54	7.67 $\pm$ 2.02	3.44 $\pm$ 1.52

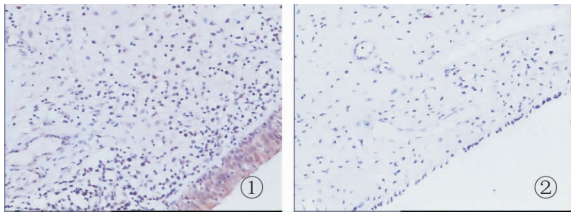


图 1 IL-25 主要表达在 EOS 和中性粒细胞胞质内,少数在腺泡内和上皮细胞亦可表达 (SP $\times$ 100) ①鼻息肉组;②对照组

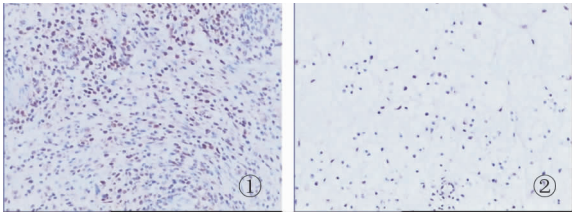


图 2 IL-13 在皮下组织中的炎性细胞内有阳性表达,定位于胞质或胞膜,典型染色呈棕黄色或棕褐色 (SP $\times$ 100) ①鼻息肉组;②对照组

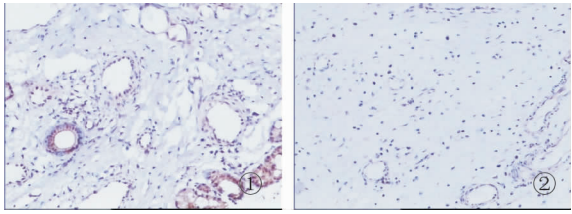


图 3 VEGF 在血管内皮细胞、腺体及间质浸润炎症细胞胞质中表达显著,少数位于细胞核中 (SP $\times$ 100) ①鼻息肉组;②对照组

3 讨论

鼻息肉是鼻部常见病,也和某些全身疾病有关。鼻息肉的病因和发病机制学说甚多,息肉的形成与发展是多种因素单独或交叉作用的结果,目前多数学者趋向于变态反应^[5]和慢性炎症^[6]。早期有关鼻息肉的报道中认为鼻息肉的发生与Ⅰ型和Ⅲ型变态反应有关^[7],并通过鼻息肉匀浆上清免疫学指标测定和息肉的透射电镜观察发现鼻息肉匀浆上清液中免疫复合物及IgE含量均增高^[8]。另外,鼻息肉黏膜组织中存在以EOS浸润为主的大量的炎性细胞,长期的慢性炎症或鼻窦脓性分泌物的刺激致使鼻黏膜充血肿胀、静脉淤血、渗出增加,加之细菌毒素、炎性介质的作用也促使小血管渗出增加以及黏膜水肿的加重,久而久之黏膜发生息肉样变^[9-10]。

其中由Fort等^[11]最先报道的IL-25被认为是IL-17家族中的成员之一,是由活化的记忆性T细胞、骨髓源性肥大细胞等产生的一种前炎性细胞因子,与其他IL-17家族成员不同,IL-25具有多效性,主要通过诱导IL-5募集嗜酸性粒细胞(EOS),激活T细胞核因子c1和JunB的转录因子,促进Th2细胞分化,同时负调节单核细胞前炎症细胞因子应答,从而促进前炎反应^[12]。另有张永梅等^[13]的研究表示,哮喘患儿急性发作期血清中IL-25的表达增强,说明IL-25与哮喘的发作关系密切,提示IL-25可参与变态反应的炎症过程。人IL-13主要是由活化的T细胞分泌的多效能细胞因子,通过与其受体结合而参与多种免疫调节和促炎活化,对哮喘及过敏性鼻炎起着诱导、增强及调控的作用,许多研究也证实IL-13与支气管哮喘关系密切^[14]。研究提示,变态反应性气道疾病的发生过程中,IL-13在EOS和T细胞间的相互作用中起关键作用,如EOS可以促进Th2细胞产生IL-13而发挥其生物学功能。血管内皮生长因子(VEGF)具有高度特异性,其受体表达于血管内皮细胞表面,能促进新血管的生成及增强原有血管的通透性而造成局部组织水肿,其生物学功能符合鼻息肉组织黏膜高度水肿的病理改变^[15]。

本实验研究显示,在30例鼻息肉组织中,IL-25、IL-13及VEGF的阳性表达率(83.3%、90.0%、86.7%),均显著高于对照组的阳性表达率(10.0%、10.0%、20.0%),两者差异具有统计学意义($P < 0.01$)。表明三者鼻息肉的发生中起重要作用。IL-25可使许多组织表达IL-4和IL-13,致使

Th2优势应答^[16],表现出血清中IgE、IgG1、IgA的生成和组织中EOS数量增加,从而引起组织的病理性损伤和促进炎症前反应。Kumar等^[17]也证明IL-13能够刺激成纤维细胞活化、增殖而参与气道重塑^[18],同时IL-13也可诱导支气管平滑肌细胞分泌VEGF^[19]。实验结果显示鼻息肉组中VEGF的表达明显高于对照组,表明鼻息肉中新生血管与鼻息肉的发生明显相关,鼻息肉中对微血管的研究有可能为治疗鼻息肉提供新思路,如果能针对性的抑制或破坏这些新生血管就有可能阻止鼻息肉的生长和复发^[20]。IL-25、IL-13及VEGF在息肉组织中的表达两两均呈正相关性,提示在鼻息肉的发生过程中3个因子的效应是相互辅助的,即其中一种因子的表达可能会对其他两种因子的表达起正反馈作用,3个因子协同参与鼻息肉的炎症反应过程。也验证了息肉的形成与发展是多种细胞、多种因子单独或交叉作用的结果^[21]。

参考文献:

- [1] Yoo Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Hu-man IL-17: a novel cytokine derived from T cells[J]. J Immunol, 1995, 155(12): 5483 - 5486.
- [2] 徐春英, 郑明秀, 王东海. 鼻息肉与细胞因子的相关性研究[J]. 国外医学耳鼻咽喉科学分册, 2005, 29(2): 78 - 81.
- [3] Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists[J]. Rhinology, 2012, 50(1): 1 - 12.
- [4] Van de putte DA, Troost D, Leemstra S, et al. Expression and distribution of id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors[J]. Glia, 2002(38): 329 - 338.
- [5] 赵长青, 安云芳, 陈同辛. 慢性鼻窦炎发病中值得关注的免疫遗传因素[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(1): 1 - 3.
- [6] 王鸿, 张罗, 周兵, 等. 慢性鼻窦炎鼻息肉与变应性因素相关性的探讨[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2005, 40(3): 168 - 171.
- [7] 马小娟, 薛黎, 丁剑冰. 白细胞介素与哮喘[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(10): 1117 - 1119.
- [8] 黄选兆, 汪吉宝, 孔维佳. 实用耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 226 - 229.
- [9] 李燕萍, 薛刚, 刘延彬, 等. 慢性鼻 - 鼻窦炎上颌窦黏膜固有层病理学改变与预后之间的关系[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2016, 22(1): 66 - 68.
- [10] Eliashar R, Levi-Schaffer F. The role of the eosinophil in nasal diseases[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 13(3): 171 - 175.
- [11] Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo[J]. Immunity, 2001, 15(6): 985 - 995.

(下转第70页)