

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0030-05

慢性炎症性声带疾病核转录因子 kappa B 信号通路的表达变化*

曾新宇, 曲亚明, 利显民, 王富森

(广东省深圳市宝安区人民医院耳鼻咽喉科, 广东 深圳 518101)

摘要: 目的 探讨炎症性声带疾病患者核转录因子 kappa B (NF- κ B) 信号通路的表达变化。**方法** 选取 2015 年 6 月-2017 年 1 月在深圳市宝安区人民医院耳鼻咽喉头颈外科就诊的喉部慢性炎症患者 (接受手术的声带息肉及小结患者) 50 例为疾病组, 并选取 50 例正常声带组织 (喉癌术中切取) 标本作为对照组。HE 染色观察手术患者声带病变组织是否发生炎症; ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量; 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 Western blot 检测 toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 及蛋白的表达变化; Western blot 检测 NF- κ B p65 磷酸化水平。**结果** HE 染色示手术患者声带病变组织内发生炎症反应; ELISA 结果显示: 疾病组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 疾病组均升高; 疾病组 TLR4 mRNA 及蛋白的表达水平, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 疾病组均升高; 疾病组 NF- κ B p65 磷酸化水平, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 疾病组升高。**结论** TLR4/NF- κ B 信号通路的活化在炎症性声带疾病中发挥作用。

关键词: 炎症性声带疾病; TLR4/NF- κ B 信号通路; 磷酸化

中图分类号: R767.4

文献标识码: A

Expression changes of NF- κ B signal pathway in patients with chronic inflammatory vocal diseases*

Xin-yu Zeng, Ya-ming Qu, Xian-min Li, Fu-sen Wang

(Department of Otorhinolaryngology, People's Hospital of Bao'an District, Shenzhen, Guangdong 518101, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of TLR4/NF- κ B signal pathway in patients with inflammatory vocal diseases. **Methods** Fifty patients with chronic inflammation of the larynx who underwent vocal cord polyp and nodule surgery in our hospital from June 2015 to January 2017 were chosen into the disease group and 50 cases of healthy vocal cord tissue (laryngeal carcinoma intraoperative removal) were selected as control group. HE staining was used to observe whether the vocal cord lesion of the surgery patients had inflammation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the two groups. Quantitative real-time fluorescent PCR and Western blot were used to detect the expression changes of TLR4 mRNA and protein. Western blot was used to detect the phosphorylation level of NF- κ B p65 in the two groups. **Results** HE staining showed inflammation in the vocal cord lesion of the surgery patients. ELISA results showed that the content of TNF- α , IL-6 and IL-1 β of the disease group increased significantly, the differences were statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). The expression levels of TLR4 mRNA and protein of the disease group increased significantly, the differences were statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$).

收稿日期: 2017-05-22

* 基金项目: 深圳市科技计划项目 (No.: JCYJ20140414111512394)

[通信作者] 王富森, E-mail: 1047071151@qq.com; Tel: 13827283864

The phosphorylation level of NF- κ B p65 in the disease group increased significantly, the difference was statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The activation of TLR4/NF- κ B signal pathway plays a role in inflammatory vocal cord diseases.

Keywords: inflammatory vocal cord diseases; TLR4/NF- κ B signal pathway; phosphorylation

随着社会因素和生物因素的不断变化,急慢性咽喉炎、声带息肉和声带小结等炎症性声带疾病的发病率逐年升高,严重影响患者的生活质量,成为耳鼻喉科的常见疾病^[1]。根据文献报道^[2],在心肌缺血再灌注损伤导致的炎症、脓毒症诱导的急性肝损伤中,toll样受体4(toll-like receptor4,TLR4)/核转录因子kappa B(nuclear transcription factor kappa B,NF- κ B)信号通路在炎症反应的调控方面发挥重要作用。TLR4可导致NF- κ B激活并入核,从而启动白细胞介素6(interleukin 6,IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)等炎症因子基因的表达^[3-5]。然而炎症性声带疾病患者的TLR4/NF- κ B信号通路是否发挥作用尚未见报道。本文旨在阐明炎症性声带疾病患者病理组织中TLR4/NF- κ B信号通路的表达变化,为炎症性声带疾病的防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2015年6月-2017年1月在深圳市宝安区人民医院耳鼻咽喉头颈外科就诊断的炎症性声带疾病(经HE染色证实)手术患者的声带病变组织(疾病组)和正常声带组织(对照组)(喉癌手术中切取)各50例。符合本院伦理委员的标准并得到委员会的批准,所有入选者都已签订知情同意书。排除标准:疾病组和对照组中均排除孕妇、合并其他感染性疾病、外伤、肿瘤及严重肝肾功能不全等患者。疾病组男29例,女21例;年龄33~56岁,平均(42.6岁)。对照组男26例,女24例;年龄30~52岁,平均(40.5岁)。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 手术患者声带病变组织 HE 染色 将手术切除的声带病变组织取出后,用生理盐水冲洗,洗净后将组织块放入液氮中,进行冷冻切片,并进行苏木素-

伊红染色(HE染色),显微镜下观察声带病变组织的病理学变化。

1.2.2 ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的含量 按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验:①标准品的加样与稀释(倍比稀释法);②加样:分别设空白孔(空白孔不加样品及酶标试剂,其余各步骤操作相同)和待测样品孔;③37℃温育30 min;④配液液、洗涤5次,1 min/次;⑤加酶标试剂;⑥温育、洗涤5次,1 min/次;⑦加试剂显色;⑧加终止液终止;⑨测定:以空白孔调零,用酶标仪在相应波长下测定光密度(OD)值,通过标准曲线计算样品中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 TLR4 mRNA 的表达 在 Pubmed 数据库中查询 TLR4 并获取其编码序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列见附表。采用离心柱型总 RNA 提取试剂盒,按说明书提取总 RNA;按逆转录试剂盒说明书配制反应体系,将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录的反应条件为:42℃ 60 min,70℃ 5 min;以 cDNA 为模板进行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测,反应体系为:cDNA 2 μ l,正反向引物各 0.8 μ l,ddH₂O 8.9 μ l,荧光 mix 12.5 μ l,共 25 μ l。PCR 反应条件为:95℃ 10 min;95℃ 15 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。以 GAPDH 表达量为参照,进行相对定量分析。

1.2.4 Western blot 检测 TLR4 蛋白的表达水平 采用全蛋白提取试剂盒提取疾病组和对照组组织全蛋白,取 20 μ l 全蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,半干转恒压转膜 15 V 20 min,5% 脱脂奶粉摇床上孵育封闭 2 h,与 anti-TLR4 或 anti-NF- κ B p65 或 NF- κ B p-p65 于 4℃ 摇床上孵育过夜,HRP 标记二抗常温摇床上孵育 2 h,洗膜后于凝胶成像分析仪上成像分析,TLR4 的表达

附表 TLR4 及 GAPDH 进行 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度 /bp
PTEN	正向: 5'-AAGCCGAAAGGTGATTGTTG-3'; 反向: 5'-CTGAGCAGGGTCTTCTTCAC-3'	108
GAPDH	正向: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3'; 反向: 5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	115

量以 β -actin 表达量为参照进行计算, 计算 TLR4 与 β -actin 条带灰度值的比值并进行分析。NF- κ B p65 的磷酸化水平以 NF- κ B p65 和 NF- κ B p-p65 的表达量进行计算。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用两独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术患者声带病变组织病理改变

声带组织表面覆盖无角化鳞状上皮, 间质水肿, 见少量淋巴细胞浸润, 符合声带炎症, 见图 1。

2.2 两组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量比较

疾病组与对照组患者病理组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量比较, 采用 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 5.250$ 、 7.569 和 11.040 , 均 $P = 0.000$), 疾病组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量高于对照组。见图 2。

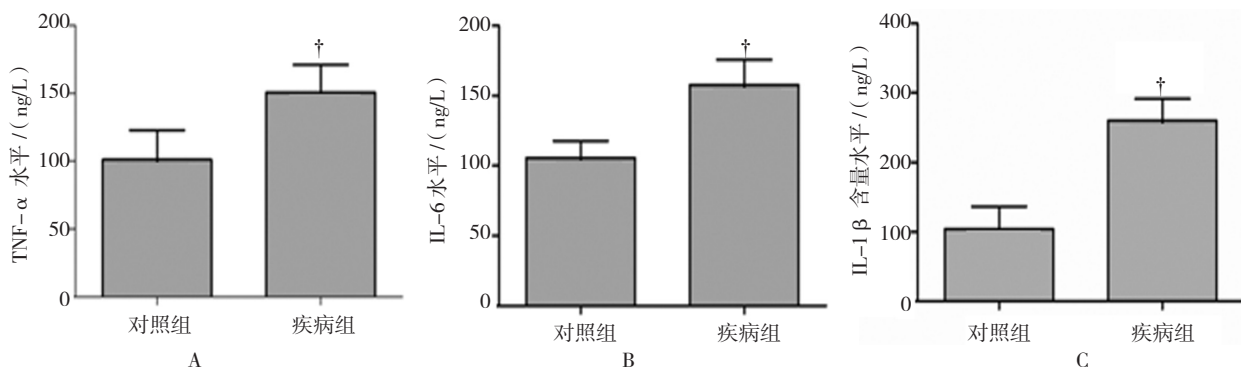


图 2 两组患者病理组织 TNF- α 的含量; B: 两组患者病理组织 IL-6 的含量; C: 两组患者病理组织 IL-1 β 的含量。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 两组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量比较

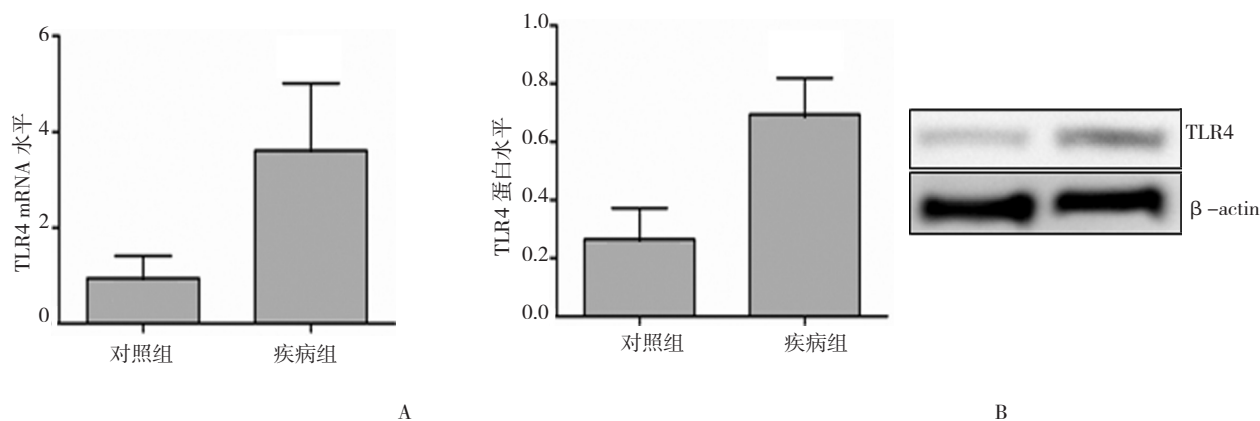


图 3 两组患者病理组织中 TLR4 mRNA 的表达; B: 两组患者病理组织中 TLR4 蛋白的表达。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 两组 TLR4 mRNA 及蛋白的表达

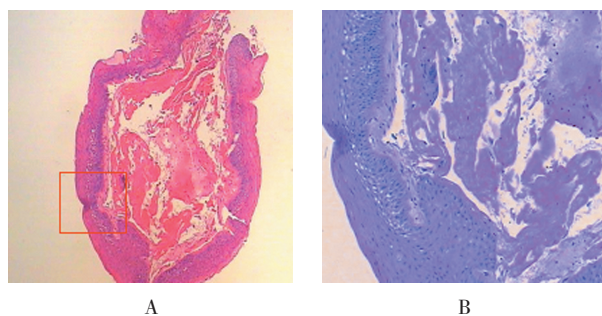


图 1 手术患者声带息肉病理切片 (HE 染色)

2.3 两组 TLR4 mRNA 及蛋白的表达

疾病组 TLR4 mRNA 及蛋白的表达水平降低, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($t = 6.484$ 和 4.533 , $P = 0.000$ 和 0.011), 见图 3。

2.4 两组 NF- κ B p65 磷酸化水平

疾病组与对照组病理组织中 NF- κ B p65 磷酸化水平比较, 采用 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 3.049$, $P = 0.016$), 疾病组 NF- κ B p65 磷酸化水平高于对照组, 见图 4。

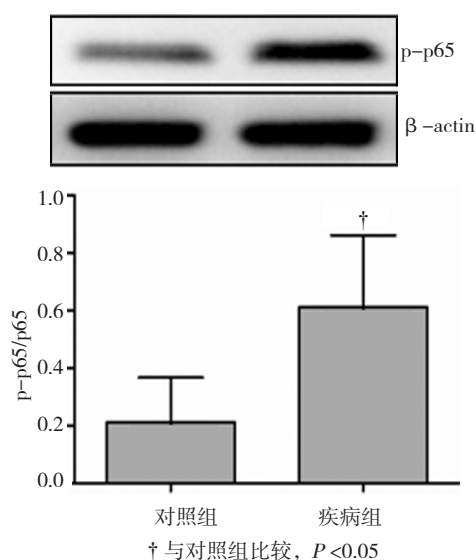


图4 两组 NF- κ B p65 磷酸化水平比较

3 讨论

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 家族的主要成员, 是一种识别高度保守的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 能将细胞外抗原识别信息向细胞内传递并引发炎症反应, 构成抗感染的第一道防线^[6]。TLRs 家族有超过 13 个亚型, 其中 TLR4 是最早被发现的, 它是识别多种 PAMPs 的关键亚型, 尤其是革兰阴性细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)^[7]。最近的研究发现^[8], TLR4 也可结合损伤组织和坏死细胞释放的内源性分子。因此, 无论在感染性和非感性刺激导致的炎症反应中, TLR4 都是一个非常关键的受体。GUEDIA 等^[9]研究表明, 在 LPS 介导的胃肠运动障碍中, HIV 和 TLR4 相互作用促进炎症反应的发生并促进免疫反应激活; YANG 等^[10]研究表明, TLR4 在心肌梗死、缺血再灌注损伤和心力衰竭等非感染性疾病中发挥重要作用。随着社会的进步与发展, 现代人的压力越来越大, 不良的生活习惯、过度用嗓、空气污染及多种新病原体出现等感染或非感染性因素都可成为炎症性声带疾病的病因, 因此, TLR4 可能在炎症性声带疾病的发生发展过程中发挥作用。本次研究结果显示: 疾病组患者病理组织中 TLR4 mRNA 及蛋白的表达水平高于对照组, 提示 TLR4 在炎症性声带疾病中发挥作用。

NF- κ B 被认为是控制炎症反应的核心因子^[11], 其家族主要由 5 个亚单位组成: p50、p52、p65、RelA/B 和 c-Rel, 其中 p65 为 NF- κ B 发挥功能所必需^[12]。

TLR4 经过一系列构象变化及细胞内传递作用激活一个非常重要的转录因子, 即 NF- κ B, 使 NF- κ B p65 亚单位上的 S536 磷酸化, 结合到靶向的 DNA, 通过调控多种基因表达进而促进多种炎症介质和细胞因子的表达, 发挥防御和免疫调节作用^[13-14]。本研究结果显示: 疾病组患者病理组织中 NF- κ B p65 磷酸化水平高于对照组, 提示 NF- κ B 的激活是炎症性声带疾病炎症反应的机制之一。TLR4/NF- κ B 信号通路的炎症因子主要有 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ^[14]等, 本研究结果显示: 疾病组患者病理组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量高于对照组, 说明炎症性声带疾病患者病理组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路发生活化。

综上所述, TLR4/NF- κ B 信号通路可能在炎症性声带疾病中发挥作用, 本研究为炎症性声带疾病的治疗提供了干预靶点。

参考文献:

- [1] 於子卫, 庞正. 嗓音疾病患者手术前后的自我评估、声学分析、喉镜检查及其相关性研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(21): 980-983.
- [2] SUN N, WANG H, WANG L. Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF- κ B pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3): 2764-2770.
- [3] GLASER K, FEHRHOLZ M, PAPSDORF M, et al. The new generation synthetic reconstituted surfactant CHF5633 suppresses LPS-induced cytokine responses in human neonatal monocytes[J]. Cytokine, 2016(86): 119-123.
- [4] HE X, QIAN Y, LI Z, et al. TLR4-upregulated IL-1 β and IL-1RI promote alveolar macrophage pyroptosis and lung inflammation through an autocrine mechanism[J]. Sci Rep, 2016(6): 31663.
- [5] XING Y, CAO R, HU H M. TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (DRibbles)[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(8): e2322.
- [6] MOLTENI M, GEMMA S, ROSSETTI C. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation[J]. Mediators Inflamm, 2016, (2016): 6978936.
- [7] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signaling[J]. Nature Reviews Immunology, 2004, 4(7): 1-16.
- [8] YU L, WANG L, CHEN S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(11): 2592-2603.
- [9] GUEDIA J, BRUN P, BHAVE S, et al. HIV-1 Tat exacerbates lipopolysaccharide-induced cytokine release via TLR4 signaling in the enteric nervous system[J]. Sci Rep, 2016, (6): 31203.
- [10] YANG Y, LV J, JIANG S, et al. The emerging role of toll-like receptor 4 in myocardial inflammation[J]. Cell Death Dis, 2016,

- 7(5): e2234.
- [11] ABD-EL-ALEEM S A, FERGUSON M W, APPLETON I, et al. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers[J]. *J Pathol*, 2001, 195(5): 616-623.
- [12] HSU T C, NAIR R, TULSIAN P, et al. Transformation nonresponsive cells owe their resistance to lack of p65/nuclear factor-kappaB activation[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 4160-4168.
- [13] BARTON G M, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways[J]. *Science*, 2003, 300(5625): 1524-1525.
- [14] TERRELL A M, CRISOSTOMO P R, WAIRIUKO G M, et al. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart[J]. *Shock*, 2006, 26(3): 226-234.

(张蕾 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年，是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管，中南大学、中南大学湘雅医院主办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨，密切关注世界医学发展的新趋势，积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果，及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平，成为国内外医学学术交流的重要园地，已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如：中文核心期刊（中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版）、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊（CSTPCD）、俄罗斯文摘（AJ）、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库（CNKI）、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库（CMCC）、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果，以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊，国际标准开本（A4），全刊为彩色印刷，无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸（880×1 230 mm），封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸（635×965 mm）印刷，每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元 / 册，全年 900 元。公开发行，国内统一刊号：CN 43-1225/R；国际标准刊号：ISSN 1005-8982；国内邮发代号：42-143。欢迎新老用户向当地邮局（所）订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址：湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部，邮编：410008

电话：0731-84327938；传真：0731-89753837；E-mail：journal@zgxdyx.com

唯一官网网址：www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部