

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.24.009

文章编号: 1005-8982(2016)24-0043-04

临床论著

鼻息肉组织核因子- κ B 和白细胞介素 4 的表达及意义

万贝贝, 胡乐农, 徐红伟

(浙江省丽水市中心医院, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 探讨核因子- κ B(NF- κ B)和白细胞介素 4(IL-4)mRNA 在鼻息肉组织中的表达及意义。**方法** 选取 90 例术后病检确诊为鼻息肉患者鼻腔新生物(不分侧别)作实验组,同期取 80 例因单纯鼻中隔偏曲而行下鼻甲部分切除的患者的下鼻甲组织(不分侧别)作为对照组。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)结合半定量分析方法检测,比较两组 NF- κ B、IL-4 的表达水平。**结果** NF- κ B 和 IL-4 在实验组表达水平高于对照组($P < 0.05$)。**结论** NF- κ B 和 IL-4 mRNA 表达水平与炎症相关,可能与鼻息肉的发病机制相关。

关键词: 核因子- κ B; 白细胞介素 4; 鼻息肉

中图分类号: R765

文献标识码: A

Expression and significance of NF- κ B/IL-4 gene in nasal polyp

Bei-bei Wan, Le-nong Hu, Hong-wei Xu

(Lishui Central Hospital, Lishui, Zhejiang 323000, China)

Abstract: Objective To investigate the different expression of nuclear factor - κ b and Interleukin 4 (IL-4) gene in tissue of the nasal polyp. **Methods** A number of 90 cases of nasal polyp were collected as experimental group and 80 cases inferior turbinate tissues as normal group. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the different expression of NF- κ B and IL-4 gene, and relative analysis was used to analyzed the results. **Results** Compared with normal group, the expression of NF- κ B and IL-4 gene in expermental group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** The expressions of NF- κ B and IL-4 are increased in experimental group, which may relate with the occurrence and development of nasal ployp.

Keywords: NF- κ B; IL-4; nasal polyp

鼻息肉作为耳鼻喉科的常见病、多发病,会严重影响患者的鼻腔通气功能,致使患者生活质量严重下降。然而时至今日,国内外对于鼻息肉的确切发病机制仍不明确,多数观点认为其是多因素、多种基因、多信号途径参与的共同结果。鼻息肉组织的病理切片中以炎症改变为主,表现为上皮增生、细胞间质的高度水肿以及毛细血管增生等形态特征。核因子- κ B(nuclear factor - κ b, NF- κ B)是一个近年来新发现的炎症信号诱导的核转录调控因子,国外最新研究发现鼻息肉上皮细胞中 NF- κ B 的活性表达

明显升高,而同时国内多位学者采用免疫组织化学方法研究也证实鼻息肉中 NF- κ B 在鼻息肉组织的炎症细胞、上皮细胞、部分腺体及血管内皮细胞的细胞核及细胞浆内均表现为高表达,表明 NF- κ B 在鼻息肉组织中过度活化,细胞因子转录增强,可能导致大量细胞因子的生成^[1],在鼻息肉的发生、发展中发挥着重要作用。白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4)作为 Th2 的自分泌细胞因子,是免疫系统中作用最强、范围最广的细胞因子,既能调节细胞免疫,又能调节体液免疫。它对 Th2 细胞的生长发育分化

收稿日期:2016-04-08

起着关键性作用,可使 Th0 直接转变为 Th2,增强细胞免疫作用,在免疫细胞之间发挥多重免疫调节作用。有国内学者用免疫组织化学方法发现鼻息肉中 IL-4 的表达明显增高,同时亦有研究发现鼻息肉中 IL-4 的表达不稳定,在鼻息肉组织和正常鼻腔黏膜组织中表达差异无统计学意义^[2]。而 SOYKA^[3]研究发现,IL-4 会导致正常鼻腔黏膜上皮屏障的缺陷,可能与鼻息肉的发病有关联。本次研究希望通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术进一步探讨 NF- κ B 和 IL-4 mRNA 在鼻息肉组织中的表达及其对于未来鼻息肉临床治疗中可能发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 实验标本 选取 2015 年 9 月-2016 年 1 月在丽水市中心医院行鼻息肉摘除术的 90 例鼻息肉患者的鼻息肉组织(术后病检为鼻息肉)作研究对象(实验组)。其中,男性 51 例,女性 39 例;年龄 30~50 岁。同期取 80 例患者因单纯鼻中隔偏曲需切除鼻甲组织作为对照组。其中,男性 42 例,女性 38 例;年龄 33~54 岁。所有患者术前至少停止使用抗生素类或激素类药物 4 周以上。

1.1.2 主要试剂及设备 PCR 反应仪(德国 Biometra 公司),Trizol RNA 试剂(美国 Invitrogen 公司),凝胶成像分析仪(美国 Beckman 公司),逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。引物合成由上海捷瑞生物工程技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 提取总 RNA 法 标本采集后装入无菌冻存管内,标记后将其放入 -80℃ 冰箱冷冻保存。标本统一称量,每 100 mg 鼻息肉组织加入 1 ml RNA 分离液提取标本 RNA,利用紫外分光光度计检测提取的 RNA 纯度。RNA 的纯度可以通过计算测定 260 nm/280 nm 的紫外吸收值来评定。RNA 纯度测定值需在 1.9~2.0,这样的 RNA 可以用来进行后续实验。

1.2.2 逆转录 RT 体系配置及 PCR 反应 逆转录(Real-time RT polymerase chain,RT)反应体系 20 μ l 由标本总 RNA 8 μ l,随机引物 2 μ l,5 \times 逆转录反应缓冲液 4 μ l,逆转录酶 1 μ l,RNA 酶抑制剂 0.5 μ l,0.1 mol/L 二硫苏糖醇溶液 1 μ l,脱氧核糖核苷三磷酸 2 μ l,无 RNA 酶的双蒸水 1.5 μ l 混合配置而成。PCR 反应体系 20 μ l 由正反引物各 1 μ l,Taq PCR mastermix 10 μ l,逆转录产物 cDNA 1.5 μ l,

双蒸水 6.5 μ l 配置而成。本实验中共有 3 对引物序列,NF- κ B 的引物序列正向:5'-CTTTTCGACTAC GCGGTGA-3',反向:5'-GGCAGCTAGGTGCAAAAC A-3',扩增片段长度为 390 bp。IL-4 的引物序列正向:5'-CAGTTCTACAGCCACCATGAGA-3',反向:5'-CATGATCGTCTTTAGCCTTTCC-3',扩增片段长度为 188 bp。 β -actin 看家基因的引物序列正向:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3',反向:5'-TCCCT CTCAGCTGTGGTGGTGAA-3',扩增片段长度为 590 bp。NF- κ B 的 PCR 反应程序设定为 95℃ 预变性 5 min,然后按下列设定程序进行循环:94℃ 加热 15 s,59℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 45 s,34 个循环后于 72℃ 再延伸 10 min。IL-4 的 PCR 反应程序设定为 95℃ 预变性 5 min,然后按下列设定程序进行循环:先 94℃ 进行加热 15 s,然后设定 63℃ 退火 30 s,之后 72℃ 延伸 45 s,反复进行 35 个循环后再于 72℃ 延伸 10 min 后结束反应。

1.2.3 检测方法 采用 RT-PCR 反应将提取的标本 RNA 在一定反应条件下逆转录为 cDNA。RT-PCR 反应按照说明书进行操作。PCR 反应后,取 9 μ l Marker 及 9 μ l 产物在琼脂糖凝胶上持续电泳 30 min,分离 PCR 产物,凝胶成像仪上可清晰看见目的基因及看家基因的 DNA 扩增片段条带。NF- κ B 的扩增片段条带位于 390 bp,IL-4 的扩增片段条带位于 188 bp,看家基因 β -actin 的扩增片段条带位于 590 bp。用仪器自带分析软件以 NF- κ B 扩增条带吸收度值(DNF- κ B)与内对照 β -actin 扩增条带吸收度值(Dact)的比值(DNF- κ B/Dact)为 NF- κ B mRNA 的表达水平,同样以 IL-4/Dact 为 IL-4 的 mRNA 的表达水平。逐个计算标本的光密度比值后,对 NF- κ B、IL-4 的相对表达水平进行半定量数值统计分析。

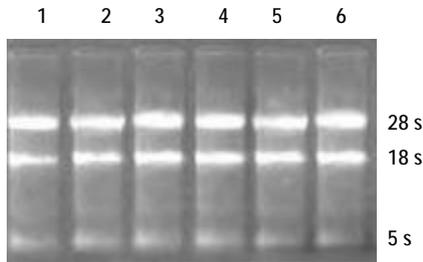
1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料间的均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

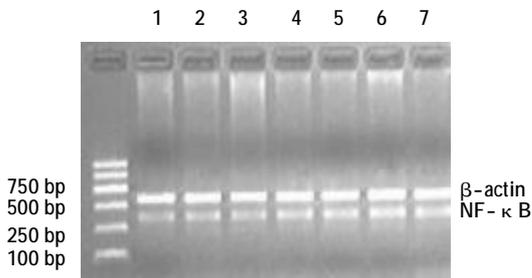
2 结果

RNA 琼脂糖电泳显示,28 s rRNA 和 18 s rRNA 条带明亮清晰,且第 1 条带(28 s)亮度为第 2 条(18 s)亮度的大约 2 倍,显示提取的标本 mRNA 质量较好,可以继续后面的实验(见图 1)。实验组及对照组 NF- κ B、IL-4 的 mRNA 均可见表达,且

其在实验组中的表达量高于其在对照组中的表达 ($P < 0.05$), 见图 2、3 和附表。

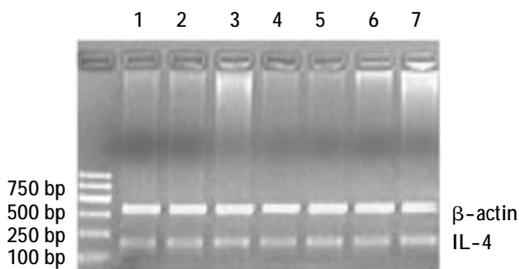


1-3: 实验组; 4-6: 对照组
图 1 总 RNA 电泳鉴定图



1: Marker; 2-4: 对照组; 5-7: 实验组; NF-κB 在两组中可见表达, 条带位于 390 bp

图 2 NF-κB 的 RT-PCR 电泳图



1: Marker; 2-4: 对照组; 5-7: 实验组; IL-4 在两组中均见表达, 条带位于 188 bp

图 3 IL-4 的 RT-PCR 电泳图

附表 实验组与对照组 NF-κB、IL-4 的 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF-κB	IL-4
实验组 (n=90)	1.093 ± 0.263	0.852 ± 0.238
对照组 (n=80)	0.635 ± 0.149	0.546 ± 0.123
t 值	10.027	7.476
P 值	0.007	0.003

3 讨论

本研究采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR 反应) 方法从基因水平来检测 NF-κB 和 IL-4 的表

达, 更加准确地表明, NF-κB 和 IL-4 在实验组中的表达均高于对照组, 其在鼻息肉的病理生理过程中可能发挥着极其重要的作用。

NF-κB 是近年来发现的一组具有多种生物学效应的炎性转录因子, 人类最初发现其可以调控 B 免疫球蛋白的 k 轻链而将其命名为 NF-κB。研究发现, NF-κB 多以同源或异源二聚体 P65 和 P50 的形式与抑制蛋白家族成员形成复合体存在于人体组织细胞中。从近几年的研究来看, NF-κB 在许多领域倍受关注, 其在机体的免疫反应、炎症反应、应激诱导反应、细胞的增殖与凋亡中都发挥着极其重要的作用^[4]。NF-κB 经典途径活化后基因主要编码 MCP-1、IL-8 等趋化因子, IL-4、IL-5、粒细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等炎症细胞因子, 其中众多的炎症细胞因子如 IL-4 和 TNF-α 又可继续活化 NF-κB 信号通路, 诱发更多的炎症细胞因子表达水平上调, 导致最初炎症信号进一步放大, 形成“瀑布效应”, 这是 NF-κB 的正反馈调节, 同时也是 NF-κB 反应灵敏并迅速增加的重要机制^[5]。有最新研究表明, NF-κB mRNA 主要表达分布与鼻息肉组织的嗜酸性粒细胞、上皮细胞、部分腺细胞、浆细胞及血管内皮细胞的细胞核和细胞浆中。提示 NF-κB 与鼻息肉的关系密切, 可以通过抑制 NF-κB 的传导通路来抑制炎症细胞的分泌^[6-7]。

IL-4 是由抗原或丝裂原刺激 B 细胞、T 细胞 (Th2) 产生的自分泌细胞因子, 它可活化肥大细胞及各种粒细胞, 与 IL-5 协同可刺激 B 细胞增殖并合成 IgE 及 IgG1, 国外有研究表明, 在鼻息肉组织中的 IgE 水平与 IL-4 水平呈正相关。在正常人体中 Th1 和 Th2 细胞处于相对平衡趋势, 机体存在多种保持 Th1/Th2 平衡的调节机制。其中认为 IL-4、IFN-γ 的相互调节是维持 Th1/Th2 平衡的关键因素^[8]。Th1/Th2 的平衡失调, Th2 细胞因子表达占据主导可能与鼻息肉的发生发展关系密切, 而 IL-4 在 Th2 细胞因子产生和释放中发挥极其重大的作用^[9-10]。NF-κB 是介导细胞内信号传递最重要的核转录因子, NF-κB 与 Th 细胞分化的关系的研究目前尚处于起步阶段。有研究发现, NF-κB 参与 Th1 淋巴细胞免疫反应的调节过程, 但也有学者认为 NF-κB 通过对淋巴细胞中 IL-4 基因转录的调控, 使机体免疫反应向 Th2 淋巴细胞介导的体液免疫发展^[11-12]。

本实验 RT-PCR 结果表明, NF-κB 和 IL-4 在鼻息肉组织中基因表达水平高于正常鼻甲组织, 两者

可能在鼻息肉的发病机制中起着至关重要的作用。当机体受到外界病原微生物的刺激时, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 IL-4 的表达量骤然增加, 导致嗜酸性粒细胞的聚集, 继发加剧机体内 Th2 引发的炎症反应, 由 Th2 诱发的炎症反应在机体内不断加剧, 并不断刺激 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 IL-4 的进一步产生和释放。 Th2 所诱导的炎症反应不仅可双重刺激体内 IL-4 的产生, 与此同时也不断促使大量其他的炎症因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、 IL-5 、 IL-8 、 IL-17 、和 $\text{TNF-}\alpha$ 等, 这些不同的炎症因子与 IL-4 相互协同, 使机体逐步失去了 Th1/Th2 的平衡。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 IL-4 均参与鼻息肉的发病过程, 研究表明, 机体局部微环境的破坏可进一步诱发机体 Th1/Th2 的失衡, 上述两个方面相互作用, 对鼻息肉的发病起着非常重要的作用。继续深入研究 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 IL-4 的表达及其与鼻息肉的发病关联, 可以在今后鼻息肉的临床预防、后期诊断及用药治疗上提供充足的理论依据和参考指标。

参 考 文 献:

- [1] 陈金辉, 杨武, 陶泽璋, 等. $\text{NF-}\kappa\text{Bp65}$ 、 $\text{IKB}\alpha$ 在人鼻息肉组织中的表达[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2006, 12(2): 96-100.
- [2] 任秀敏, 何强, 蒋新霞. 白介素 4、白介素 5 在鼻息肉及鼻息肉肉组织中的表达[J]. 河北医药, 2009, 31(22): 3036-3038.
- [3] SOYKA M B, WAWRZYNIAK P, EIWEGGER T, et al. defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by $\text{ifn-}\gamma$ and IL-4 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 13(5): 1087-1096.
- [4] TERGAONKAR V. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(9): 1647-1653.
- [5] CASTIGLI E, WILSON S A, SCOTT S, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells [J]. J Exp Med, 2015, 20(4): 35-39.
- [6] CHO J S, HAN I H, LEE H R, et al. Prostaglandin E2 induces IL-6 and IL-8 production by the EP receptors/Akt/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathways in nasal polyp-derived fibroblasts [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2014, 6(5): 119-147.
- [7] VALERA F C, UMEZAWA K, BRASSESCO M S, et al. Suppression of inflammatory cytokine secretion by an $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibitor dhmeq in nasal polyps fibroblasts [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(10): 13-22.
- [8] 邹伟, 朱丽敏, 钱迪, 等. 结合分枝杆菌培养滤液蛋白对鼻息肉患者 IL-4 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、GM-CSF 的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(9): 1375-1377.
- [9] RAMANATHAN M J R, LEE W K, SPANNHAK E W, et al. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells [J]. Am J Rhinol, 2008, 22(5): 115-121.
- [10] OZKARA S, KELES E, ILHAN N, et al. The relationship between th1/th2 balance and $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin d}(3)$ in patients with nasal polyposis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 26(12): 2519-2524.
- [11] VANDENBROECK K, ALLOZA I, GADINA M, et al. Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges [J]. J Pharmacol, 2014, 56(2): 145-160.
- [12] LI-WEBER M, GIAISI M, BAUMANN S, et al. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ synergizes with NF-AT and NF-IL-6 in activation of the IL-4 gene in T-cell [J]. Eur J Immunol, 2014, 34(4): 1111-1118.

(张蕾 编辑)