

IL-19 在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉患者组织中的表达及其临床意义

苏 飞, 汪银凤, 潘春晨

摘要 目的 探索白细胞介素-19(IL-19)在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(CRSwNP)患者组织中的表达及其临床意义。方法 选取42例CRSwNP患者作为研究对象,其中嗜酸性粒细胞慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(ECRS)患者20例,非嗜酸性粒细胞慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(non-ECRS)患者22例,术中收集鼻息肉组织;另取对照组患者20例,术中收集钩突黏膜组织。通过苏木精-伊红染色测量组织中嗜酸性粒细胞数并进行百分比计数,通过qRT-PCR、免疫组织化学染色测定样本中IL-19的表达情况。结果 IL-19主要表达在ECRS患者息肉的上皮和黏膜下腺体中。ECRS组中IL-19的mRNA转录及蛋白表达水平显著高于non-ECRS及对照组($P < 0.05$, $P < 0.05$)。在ECRS组中IL-19的mRNA转录水平与ECRS患者的CT评分、鼻内镜评分及组织中嗜酸性粒细胞百分比呈正相关($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$),与VAS评分间无明显相关性($P > 0.05$)。结论 与non-ECRS及正常鼻黏膜相比,IL-19在ECRS中的表达水平增高,且与临床严重程度呈正相关。IL-19可能通过促进组织嗜酸性粒细胞的聚集而加重临床症状。

关键词 慢性鼻-鼻窦炎;鼻息肉;白细胞介素-19;嗜酸性粒细胞鼻膜炎;EOS;临床严重程度

中图分类号 R 765.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1416-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.019

慢性鼻-鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是一种异质性的鼻腔鼻窦慢性炎症性疾病,主要表现为鼻塞、脓涕或鼻涕倒流、头痛、面部胀痛和嗅觉减退。中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018)^[1]根据是否合并鼻息肉将CRS分为:慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP)和慢性鼻-鼻窦炎不伴鼻息肉(CRSsNP)。CRSwNP主要以Th2炎症反应及嗜酸粒细胞浸润为

主,而CRSsNP则以Th1炎症反应及非嗜酸性粒细胞浸润为主^[2]。有学者^[3]提出了CRSwNP的内分型,其中应用最广泛的是根据鼻息肉组织中嗜酸性粒细胞的百分比将CRSwNP分为嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(eosinophilic CRSwNP, ECRS)和非嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉(non-ECRS)。白细胞介素(interleukin, IL)-19的产生依赖于LPS或粒-巨噬细胞集落刺激因子作用于激活的单核细胞^[4],主要作用为诱导Th2细胞因子表达,是Th2免疫反应中最重要的调节因子之一,与哮喘^[5]、银屑病^[6]、类风湿性关节炎^[7]及食管癌^[8]等都有密切的关系。研究^[5]表明IL-19对哮喘中的炎症反应具有促进作用,哮喘主要的炎性细胞同样为嗜酸性粒细胞。然而,目前有关IL-19与CRS炎症反应关系的临床研究较少。该研究探索了不同类型CRSwNP组织中IL-19的表达水平及其与临床症状的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2019年1月~2019年6月于安徽医科大学附属省立医院耳鼻喉科接受鼻内镜手术的患者共62例,根据术中所见及术后病理,分为:

① ECRS组:CRSwNP患者,其息肉组织中嗜酸性粒细胞计数大于总炎性细胞数的10%^[9],共20例;② non-ECRS组:CRSwNP患者,但其息肉组织中嗜酸性粒细胞计数小于总炎性细胞数的10%,共22例;③ 对照组:排除因鼻部炎症性疾病接受鼻内镜手术的患者,主要对象为单纯性鼻中隔偏曲或单纯鼻窦囊肿、外伤患者,共20例。排除标准:①术前1月内全身或局部使用糖皮质激素;②单纯后鼻孔息肉;③真菌性鼻-鼻窦炎;④囊性纤维化;⑤有上呼吸道感染及合并其他全身疾患。慢性鼻-鼻窦炎的诊断均符合中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018)^[1]。ECRS组、non-ECRS组均于术中留取息肉标本,对照组术中收集正常钩突黏膜。所有标本均分为2份,一部分用甲醛溶液固定后,用石蜡包埋

2020-06-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH294)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院耳鼻喉科,合肥 230001

作者简介:苏 飞,男,硕士研究生;

汪银凤,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wyinfeng@126.com

固定切片进行苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色;另一部分存储在-80℃用于检测 IL-19 的表达水平。研究经安徽省立医院伦理委员会批准,每位受试者术前签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 视觉模拟量表(visual analog scale, VAS) 症状评分 包含了鼻窦炎的5个主要症状:鼻塞、流涕或鼻涕倒流、头痛或头昏、面部胀痛以及嗅觉减退或消失。根据患者自身症状的严重程度在0~10分之间评分,每个症状0~2分,总分值越高症状越重。用以主观表示疾病的严重程度。

1.2.2 鼻内镜 Lund-Kennedy 主观评分 根据鼻内镜表现,从息肉、水肿、鼻漏、瘢痕、结痂对患者进行评分。每个指标0~2分,两侧分别计数,总分20分。用于反映疾病的严重程度。

1.2.3 鼻窦 CT 的 Lund-Mackay 评分 术前行鼻窦轴位+冠状位高分辨 CT 平扫,分别对双侧额窦、前筛、后筛、上颌窦、蝶窦和窦口鼻道复合体(ostio-omeatal complex, OMC)进行评分:0分,窦腔无软组织影;1分,窦腔部分软组织影;2分,窦腔布满软组织影或 OMC 阴影,总分24分。两侧评分之和表示影像学严重程度。

1.2.4 qRT-PCR 组织剪碎、液氮研磨后用 TRIzol 匀浆和氯仿进行 RNA 提取。用 Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(novoprotein, No. E096-01B) 试剂逆转录成 cDNA。使用设计引物和 RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Scientific, No. K1622) 依据试剂说明书进行40个循环定量聚合酶链反应,以检测 IL-19 mRNA 的转录水平。本次实验所使用的分析方法为:Relative Quantification Study,计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。β-Actin 广泛分布于细胞质内,表达量非常丰富且在各组织和细胞中的表达相对恒定。故选择 β-Actin 作为本次 PCR 实验的内参,引物序列见表1。

表1 IL-19 mRNA 扩增所需的引物序列

基因	引物序列
β-actin	F: CCCTGGAGAAGAGCTACGAG
	R: GGAAGGAAGGCTGGAAGACT
IL-19	F: TACCTGGACAGGGTGTTCAG
	R: GCCTCTGTCTGACATTGC

1.2.5 免疫组织化学染色 通过 S-P 二步法进行染色。术中组织经10%甲醛溶液固定、石蜡包埋固定后连续4 μm 切片。常规脱蜡复水,阻断内源性

过氧化物酶活性。PBS 冲洗3次 5 min/次;加一抗(兔抗人 IL-19 抗体 1:200)37℃ 孵育 60 min, PBS 冲洗3次 5 min/次;加二抗(羊抗兔抗体 1:100)37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗3次 5 min/次;DAB 显色,显微镜下观察染色至适度时终止。显微镜下按切片染色强度评分。从每个切片随机选择5个高倍镜视野使用 Image J 软件(美国马里兰州 Bethesda 公司)计算染色切片的吸光度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件和 Graph-Pad Prism 8.2.1 进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间计量资料比较用 *t* 检验,3组间计量资料比较采用单因素方差分析(本研究中的各项计量资料均符合正态分布),计数资料采用 χ^2 检验,2组变量之间的相关性采用 Spearman 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征统计 对照组、non-ECRS 组及 ECRS 组在性别、年龄特征方面差异无统计学意义。3组实验对象的 VAS 评分差异无统计学意义($F = 0.616, P > 0.05$);对照组、non-ECRS 组及 ECRS 组鼻内镜评分差异有统计学意义($F = 17.26, P < 0.05$);对照组、non-ECRS 组及 ECRS 组 CT 评分差异有统计学意义($F = 19.24, P < 0.05$) (表2)。

表2 患者临床特征统计表($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	non-ECRS 组	ECRS 组	F 值	P 值
例数(n)	20	22	20	-	-
性别(男/女)	10/10	13/9	12/8	0.362	0.611
年龄(岁)	43.4 ± 8.9	37.2 ± 10.3	39.5 ± 16.2	0.733	0.426
VAS 评分	1.3 ± 1.1	2.2 ± 1.8	4.0 ± 1.5	0.616	0.583
鼻内镜评分	0.7 ± 0.9	5.4 ± 1.6	7.6 ± 2.1	17.26	<0.001
CT 评分	2.1 ± 2.4	11.3 ± 4.2	13.5 ± 5.0	19.24	<0.001

2.2 PCR 结果组间差异统计 PCR 结果显示, ECRS 组 IL-19 的 mRNA 水平明显高于 non-ECRS 组和对照组。与对照组相比, non-ECRS 组 IL-19 的 mRNA 水平明显增高($P < 0.05$);与 non-ECRS 组相比, ECRS 组的 mRNA 水平明显增高($P < 0.05$) (图1)。

2.3 免疫组织化学染色 结果显示, IL-19 主要表达在 ECRS 患者息肉的上皮和黏膜下腺体(图2);与对照组相比, non-ECRS 组 IL-19 表达水平明显增高($P < 0.05$);与 non-ECRS 组相比, ECRS 组 IL-19 表达水平明显增高($P < 0.05$) (图3)。

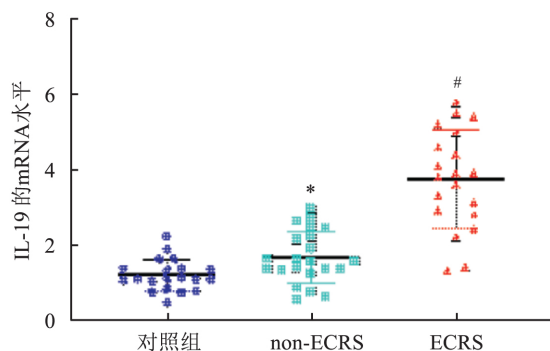


图1 3组间 IL-19 的 mRNA 水平差异
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 non-ECRS 组比较: # $P < 0.05$

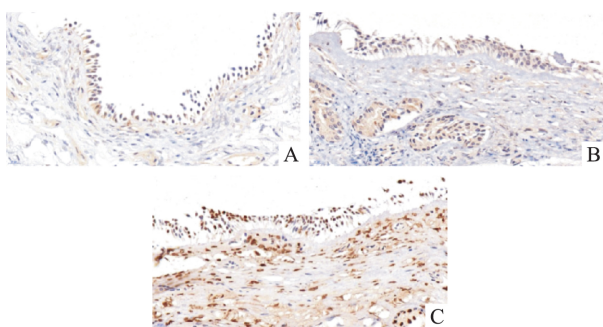


图2 IL-19 在 3 组的表达 $\times 400$
A: 对照组; B: non-ECRS 组; C: ECRS 组

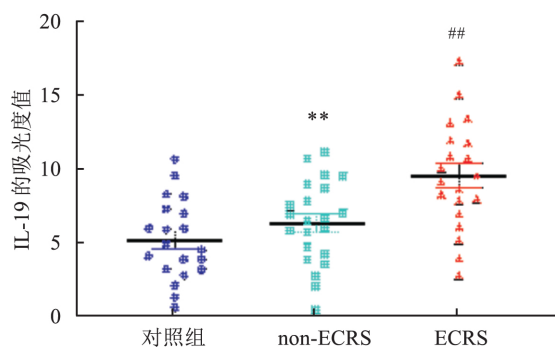


图3 3组间 IL-19 的表达水平差异
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 non-ECRS 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 ECRS 组 IL-19 的 mRNA 水平与组织嗜酸性粒细胞百分比的相关性 在 ECRS 组中, IL-19 的 mRNA 水平与患者息肉组织嗜酸性粒细胞百分比呈正相关, 结果显示差异统计学意义 ($r_s = 0.672$, $P < 0.05$) (图4)。

2.5 ECRS 组 mRNA 水平与临床症状的相关性 在 ECRS 组中, IL-19 的 mRNA 水平与患者 CT 评分呈正相关, 差异有统计学意义 ($r_s = 0.785$, $P < 0.05$)。IL-19 的 mRNA 水平与患者内镜评分呈正

相关, 差异有统计学意义 ($r_s = 0.613$, $P < 0.05$)。IL-19 的 mRNA 水平与患者主观 VAS 评分之间, 差异无统计学意义 ($r_s = 0.353$, $P > 0.05$) (图5)。

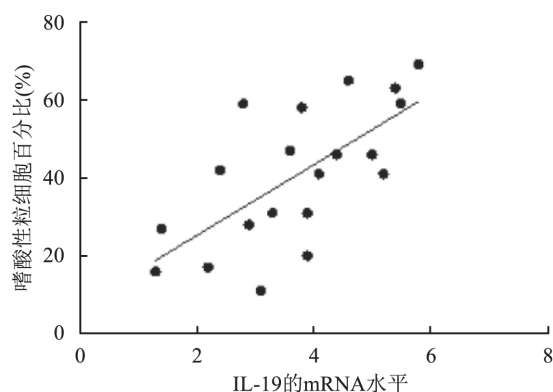


图4 ECRS 组中 IL-19 的 mRNA 水平
与嗜酸性粒细胞百分比的相关性

3 讨论

CRS 作为全球范围性的慢性疾病, 虽然其很少有致命性的疾病结局, 但是其异质性和易复发性, 给生活带来极大影响, 给社会经济带来较重负担。而其中异质性和易复发性特征最明显的 ECRS 作为其中的典型代表, 主要表现为组织的嗜酸性粒细胞浸润, 且嗜酸性粒细胞水平与患者鼻腔组织重塑有明显的相关性。CRS 的分子靶向治疗及详细病理机制是目前的研究热点。

研究人员^[10]通过检测鼻息肉中 IL-19 及其受体水平, 发现中国人 CRSwNP 患者鼻息肉中 IL-19 及其受体与 MMP-9 呈正相关, 推测 IL-19 及其受体可能参与了 CRS 组织重塑的发生发展, 但并未就 IL-19 及其受体的临床意义进行探索。国外学者^[11]证实了在体外条件下, IL-19 通过下调 IL-4 水平在鼻成纤维细胞中发挥抗感染作用, 但由于鼻窦炎的异质性, 体外条件并不能完全模拟 IL-19 在人体发挥作用时的免疫环境, 目前多数研究仍然认为 IL-19 在 CRS 中主要起到促进 Th2 反应的作用。

本实验结果显示, 对照组、non-ECRS 组及 ECRS 组的 CT 评分、鼻内镜评分具有差异, 而主观量表 VAS 评分无差异, 猜测导致这个结果的原因可能是主观量表评分受被试者的文化教育水平、患病病程和疾病耐受程度的影响, 而 CT 评分及鼻内镜评分由医师进行评测, 具有一定的客观性。PCR 及免疫

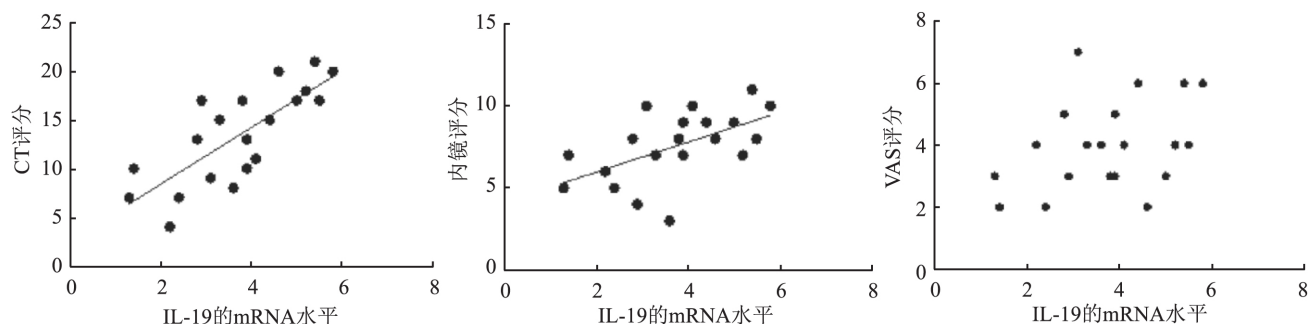


图5 IL-19的mRNA水平与患者临床症状的相关性

组织化学染色结果都表明,IL-19在ECRS组中的表达水平高于non-ECRS组和对照组,且主要表达部位在ECRS患者的息肉上皮层及黏膜下层的腺体中,证明了IL-19在CRS发病过程中对鼻腔黏膜的组织重塑及黏液分泌具有促进作用。另外,IL-19的水平与组织中的嗜酸性粒细胞浸润水平以及CT评分、鼻内镜评分都有一定的相关性,说明IL-19可能通过促进组织嗜酸性粒细胞的聚集而加重临床症状。

CRS的一个主要病理过程就是鼻黏膜的过度分泌及组织重塑。脓涕中的黏液主要由杯状细胞分泌,而黏蛋白MUC5AC作为杯状细胞增生和化生的标志物,主要表达在黏膜上皮和黏膜下的腺体中,这与此次的免疫组化结果—IL-19主要表达在息肉的黏膜上皮和黏膜下腺体是一致的。研究^[12]通过siRNA核转染法敲除IL-19受体,发现IL-19对MUC5AC的促进作用被阻断,同时,通过对原发人鼻上皮细胞用隐丹参酮(STAT3抑制剂)进行预处理,发现IL-19对MUC5AC的促进作用同样可以被终止。而IL-19受体和STAT3信号通路都是IL-19对MUC5AC促进作用的必要组成过程。证明CRS中IL-19可能通过STAT3通路促进MUC5AC的表达进而促进黏液的分泌。另外,有研究^[13]证明STAT3以及STAT3的磷酸化形式主要表达于CRSwNP患者的上皮层,且STAT3的表达与血管内皮生长因子以及嗜酸性粒细胞浸润程度密切相关。在CRSwNP中,IL-19可以通过STAT3信号促进ECRS中MUC5AC的表达和组织中EOS的浸润,诱导CRSwNP向ECRS的转化。而IL-4通过STAT6信号通路进一步上调了IL-19的表达水平,IL-19和IL-4间通过STAT3/STAT6信号通路介导的正反馈调节^[14]激活并增强Th2反应,促进MUC5AC的表

达和EOS的浸润,并且推动疾病的进展,最终加重了ECRS病情。

简言之,本研究证明了IL-19在ECRS中显著高表达,且与组织中嗜酸性粒细胞浸润程度及临床表现的严重程度相关。然而,需进一步的研究来探索CRSwNP中IL-19的具体作用机制,有助于进一步阐明CRS的发病机理,从而帮助认识IL-19在CRS中的作用。

参考文献

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组. 中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018)[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2019, 54(2): 81-100.
- [2] Lou H, Zhang N, Bachert C, et al. Highlights of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps in definition, prognosis, and advancement[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018, 8(11): 1218-25.
- [3] McHugh T, Snidvongs K, Xie M, et al. High tissue eosinophilia as a marker to predict recurrence for eosinophilic chronic rhinosinusitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018, 8(12): 1421-9.
- [4] Gallagher G. Interleukin-19: Multiple roles in immune regulation and disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(5): 345-52.
- [5] Huang F, Wachi S, Thai P, et al. Potentiation of IL-19 expression in airway epithelia by IL-17A and IL-4/IL-13: important implications in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(6): 1415-21.
- [6] Li H H, Lin Y C, Chen P J, et al. Interleukin-19 upregulates keratinocyte growth factor and is associated with psoriasis[J]. Br J Dermatol, 2005, 153(3): 591-5.
- [7] Alanara T, Karstila K, Moilanen T, et al. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints[J]. Scand J Rheumatol, 2010, 39(2): 118-26.
- [8] Hsing C H, Kwok F A, Cheng H C, et al. Inhibiting interleukin-

- 19 activity ameliorates esophageal squamous cell carcinoma progression[J]. *PLoS One* ,2013 8(10): e75254.
- [9] Cao P , Li H , Wang B , et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese [J]. *J Allergy Clin Immunol* ,2009 124(3): 478 – 84.
- [10] 李 霞,常利红,黄子真,等. IL-19 及其受体与慢性鼻 – 鼻窦炎组织重塑的相关性研究[J]. *中国病理生理杂志* ,2017 , 33(5): 919 – 924.
- [11] Higashino M , Takabayashi T , Takahashi N , et al. Interleukin-19 downregulates interleukin-4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts[J]. *Allergol Int* ,2011 60(4): 449 – 457.
- [12] Lai X , Li X , Chang L , et al. IL-19 Up-regulates mucin 5AC production in patients with chronic rhinosinusitis *via* STAT3 pathway [J]. *Front Immuno* ,2019 10: 1682.
- [13] Cao Q , Zhang T , Zhang J. Correlation analysis of STAT3 and VEGF expression and eosinophil infiltration in nasal polyps [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol* ,2015 272(8): 1955 – 60.
- [14] Bao L , Alexander J B , Shi V Y , et al. Interleukin - 4 up - regulation of epidermal interleukin-19 expression in keratinocytes involves the binding of signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6) to the imperfect Stat6 sites[J]. *Immunology* ,2014 143 (4): 601 – 8.

Expression and clinical significance of IL-19 in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Su Fei , Wang Yinfeng , Pan Chunchen

(*Dept of Otolaryngology-Head & Neck Surgery ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001*)

Abstract Objective To explore the expression and clinical significance of interleukin-19(IL-19) in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) . **Methods** 42 CRSwNP patients were selected to collect nasal polyps during the operation: 20 patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps (ECRS) , 22 patients with non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps (non-ECRS) . 20 patients in the control group were selected to collect mucosa of uncinate process during the operation. The percentage of eosinophils in tissues was measured by hematoxylin-eosin staining , and the expression of IL-19 was measured by qRT-PCR and immunohistochemistry staining. **Results** IL-19 was mainly expressed in epithelial and submucosal glands of polyps in ECRS. The mRNA and protein expression of IL-19 was significantly higher in ECRS than in non-ECRS and higher than in control ($P < 0.05$, $P < 0.05$) . In ECRS group , the mRNA level of IL-19 was positively correlated with CT Score , endoscopic score and percentage of eosinophils ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) , but not with VAS score ($P > 0.05$) . **Conclusion** Compared with non-ECRS and normal nasal mucosa , the expression of IL-19 in ECRS is higher , and is positively correlated with clinical severity. IL-19 may aggravate clinical symptoms by promoting the aggregation of eosinophils.

Key words chronic rhinosinusitis; nasal polyps; interleukin-19; eosinophilic rhinosinusitis; EOS; clinical severity