

网络出版时间: 2019-7-15 18:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.019.html>

Bach2 在嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎 伴鼻息肉组织中表达及临床意义

吴君 汪银凤 潘春晨

摘要 目的 探究 BTB 与 CNC 同源基因 2 (Bach2) 在不同类型慢性鼻-鼻窦炎 (CRS) 中的表达及临床意义。方法 43 例慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉 (CRSwNP) 患者中,嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉 (ECRS) 19 例,非嗜酸粒细胞性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉 (non-ECRS) 24 例,另有 20 例对照受试者,分别收集鼻息肉和筛窦黏膜。通过定量逆转录-聚合酶链反应、免疫组织化学染色和蛋白质印迹法测定收集的组织样品中 Bach2 的表达情况;通过苏木精-伊红染色,测定组织中嗜酸粒细胞数。疾病的严重程度通过计算机断层扫描 (CT)、鼻内窥镜检查 and 受试者症状来评估。结果 Bach2 主要表达在鼻上皮细胞层中。Bach2 的 mRNA 和蛋白表达在 ECRS 中显著低于 non-ECRS,但高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Bach2 的 mRNA 表达水平与所有 ECRS 患者的 CT 扫描结果、鼻内镜评分及组织中每高倍镜视野中的嗜酸粒细胞数之间呈一定的相关性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) 而与 VAS 评分间无明显相关性 ($P > 0.05$)。结论 Bach2 在 ECRS 中表达与 non-ECRS 相比较低,致 ECRS 中嗜酸性炎症,并且与其疾病严重程度有关。

关键词 慢性鼻-鼻窦炎;鼻息肉;Bach2;嗜酸粒细胞;疾病严重程度

中图分类号 R 765.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1263-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.019

慢性鼻-鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis, CRS) 是耳鼻喉科常见的涉及鼻窦和鼻黏膜的慢性炎症性疾病,具有异质性和复杂发病机制,目前分为两种类型: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 (chronic rhinosinusitis without nasal polyps, CRSsNP) [1]。CRSwNP 主要是以组织 Th2 炎症及嗜

酸粒细胞浸润为主,而区别于 CRSsNP 以 Th1 炎症为主 [2]。CRSwNP 依据是否伴有嗜酸粒细胞浸润,可以进一步分为两种亚型: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-eosinophilic CRSwNP, non-ECRS) [3]。ECRS 相较 non-ECRS 而言,有更高的临床疾病严重程度体验和术后更易复发的风险 [4]。BTB 与 CNC 同源基因 2 (BTB and CNC homology2, Bach2) 定位在人的 6 号染色体的长臂 (6q15),其转录的蛋白能够与小 Maf 蛋白 (包括 MafF、MafG 和 MafK) 结合形成异源二聚体,并在 DNA 上结合特异性序列上 Maf 识别元件,从而抑制细胞转录并参与其转录调节过程 [5]。Bach2 参与 T 细胞介导的免疫反应, Treg 介导的免疫稳态,并调节 Th2 细胞分化和 Th2 型免疫反应,而 Bach2 缺陷型小鼠易患致命性肺部和小肠感染 [6-7]。而对于 Bach2 是否在慢性鼻-鼻窦炎中表达仍未有研究报道,该研究首次探究 Bach2 在不同表型的鼻息肉组织中的分布情况及与疾病严重程度的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 43 例 CRSwNP 患者分为嗜酸性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉组 (ECRS 组) 19 例、非嗜酸性慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉组 (non-ECRS 组) 24 例,受试者对照组 (Control 组) 20 例。所有研究对象均来自安徽省立医院耳鼻咽喉头颈外科。慢性鼻-鼻窦炎的诊断均符合国内 2012 年的慢性鼻-鼻窦炎诊疗指南 [1]。排除标准:①患者在手术前 1 个月内使用局部或全身性类固醇激素;②既往有鼻窦手术史,术前患有真菌性鼻窦炎、后鼻孔息肉、原发性纤毛运动障碍、变应性鼻炎、哮喘、肺结核等感染性疾病和过敏性疾病的病患。CRSwNP 进一步分为 ECRS 和 non-ECRS 两种亚型,根据先前的研究,当选取的 10 个高倍镜视野 (high-power fields, HPF) 平均组织嗜酸粒细胞的百分比超过浸润细胞总数的 10% 时,CRSwNP 即被归类为 ECRS,反之则为 non-

2019-02-28 接收

基金项目:安徽省自然科学基金 (编号:1808085MH294)

作者单位:安徽医科大学附属安徽省立医院耳鼻咽喉科,合肥 230001

作者简介:吴君,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

ECRS^[8], 见图 1。20 例无慢性鼻-鼻窦炎的对照受试者, 因脑脊液鼻漏、外伤及肿瘤(包括筛窦骨瘤、神经鞘瘤、腺样囊性癌)而进行手术, 在手术过程中收集其筛窦黏膜。所有活组织标本均分为两部分: 一部分用多聚甲醛固定后, 用石蜡包埋固定切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色; 另一部分存储在-80℃用于检测 Bach2 蛋白和基因表达水平。本研究所有受试者的基本人口特征见表 1。本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。

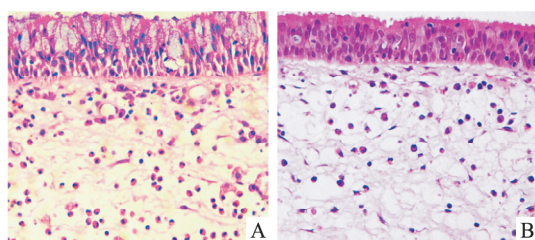


图 1 两组鼻息肉组织中嗜酸粒细胞的表达 ×400
A: 嗜酸性鼻息肉组织; B: 非嗜酸性鼻息肉组织

表 1 人口特征表($\bar{x} \pm s$)

项目	Control 组	ECRS 组	non-ECRS 组	χ^2/F 值	P 值
例数(n)	20	19	24	-	-
性别(男/女)	11/9	12/7	15/9	0.348	0.649
年龄(岁)	43.8 ± 9.4	40.7 ± 17.4	38.4 ± 11.0	0.971	0.384
VAS 评分	4.6 ± 3.6	18.9 ± 8.7	15.7 ± 4.7	31.834	0.000
Endoscopy 评分	0.9 ± 1.1	6.3 ± 1.9	4.4 ± 1.7	56.682	0.000
CT 评分	1.2 ± 2.5	13.1 ± 5.8	15.7 ± 6.7	44.074	0.000

1.2 方法

1.2.1 受试者的临床资料收集 收集受试者的病史、术前临床检查(包括鼻内镜检查和鼻窦 CT 检查), 用 Lund-Kennedy 鼻内镜评分(Endoscopy 评分)、Lund-Mackay 鼻窦 CT 评分(CT 评分)及视觉量表评分(visual analogue scale, VAS 评分)来评估受试者的疾病严重程度^[1]。

1.2.2 免疫组化染色 组织标本用石蜡包埋固定后, 制成 3 μ m 厚石蜡组织切片, 行 HE 染色和 IHC 染色, 检测平均嗜酸粒细胞数和 Bach2 的表达情况。采用免疫组化 SP 法, 切片脱蜡水化、抗原修复及封闭内源性过氧化氢酶后, 用抗人 Bach2 第一抗体(1:100, 美国 Affinity 公司)在 4℃ 条件下孵育过夜。切片第 2 天用 HRP 羊抗兔 Bach2 第二抗体(1:200, 美国 Affinity 公司)孵育, 然后用 DAB 溶液显色, 复染、脱水、透明和封片。最后, 由两名研究者

盲法观察每个切片的 IHC 染色。从每个切片随机选择 5 个高倍镜视野(HPF)使用 Image J 软件(美国马里兰州 Bethesda 公司)计算染色切片的光密度值(integrated optical density, IOD)。

1.2.3 定量逆转录-聚合酶链反应 用 TRIzol 试剂和氯仿试剂从活检组织中提取总 RNA, 然后用 Prime ScriptTM RT Master Mix(中国大连 Takara 公司, No. RR036A)试剂逆转录成 cDNA。使用设计引物和 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II(大连 Takara 公司, No. RR820A)依据试剂说明书进行 40 个循环定量聚合酶链反应, 以检测 Bach2 的表达。设计的引物序列如表 2。目标基因表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

表 2 Bach2 mRNA 扩增所需的引物序列

基因	引物序列(5'-3')
Bach2	F: AAATGATTTGCTGCTCAGCTTG R: CGGATGTTTTCTCTGCTGAGTA
GAPDH	F: GTATCGTGGAAGGACTCATGAC R: ACCACCTTCTTGATGTCATCAT

1.2.4 Western blot 法 Bach2 蛋白的表达用 Western blot 法进行检测。用裂解液(PMSF)和匀浆法从活检组织中提取总蛋白, 检测到蛋白质的浓度后, 加样 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移到 PVDF 膜上; 膜用 TBS 缓冲液浸润, 后用含 5% 脱脂奶粉的缓冲液封闭, 用抗人 Bach2 第一抗体(1:500)在 4℃ 条件下过夜; 之后, 将膜用 HRP 羊抗兔 Bach2 第二抗体(1:3000)在室温下孵育 30 min, 依次用显影剂和定影剂进行显影和定影; 最后将胶片拍照并存档, 使用 Image J 软件(美国马里兰州 Bethesda 公司)处理系统分析靶蛋白的光密度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料比较用 t 检验进行分析, 三组间计量资料比较采用单因素方差分析; 计数资料采用 χ^2 检验; 采用 Spearman 分析两组变量之间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bach2 在 ECRS 中低表达与嗜酸粒细胞数相关 如图 2A~2C 中所示, Bach2 主要表达于鼻腔黏膜上皮层的细胞核中。免疫组化染色光密度值定量分析表明, 与 non-ECRS 组比较, ECRS 组中 Bach2 的表达显著减少($P < 0.01$)。ECRS 患者的 Bach2

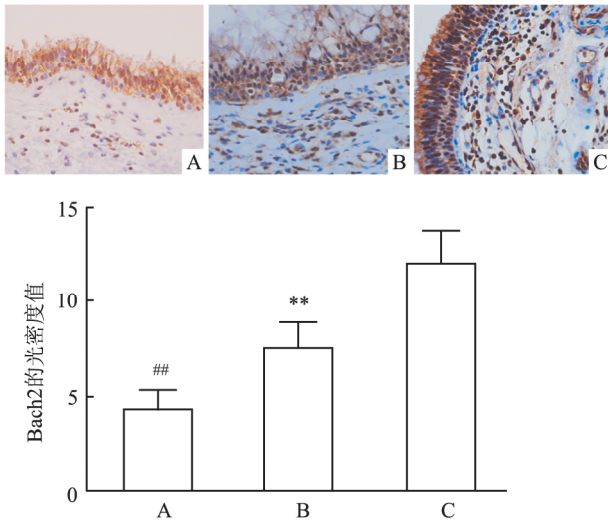


图2 免疫组化染色检测 Bach2 在不同组中的表达 ×400

A: Control 组; B: ECSR 组; C: non-ECSR 组; 与 non-ECSR 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ECSR 组比较: # $P < 0.01$

的表达与对照组比较相对较高 ($P < 0.01$)。Bach2 的 mRNA 和蛋白在 ECSR 组中的表达水平与 non-ECSR 组相比显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 而高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 见图 3、4。Bach2 的 mRNA 相对表达水平与 ECSR 组织中的每高倍镜视野嗜酸粒细胞数 (eosinophils/HPF) 间存在负相关性 ($P < 0.05$) 见图 3。

2.2 Bach2 表达与疾病严重程度的相关性 在 ECSR 组中, CT 评分和 Endoscopy 评分与 Bach2 的表达间有一定的相关性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 而 VAS 评分与 Bach2 表达水平间无显著相关 ($P > 0.05$); 而在 non-ECSR 组中, Endoscopy 评分与 Bach2 的表达间有一定的相关性 ($P < 0.01$); 而 CT 评分及 VAS 评分与 Bach2 表达水平间无显著相关 ($P > 0.05$, $P > 0.05$) 见图 5。

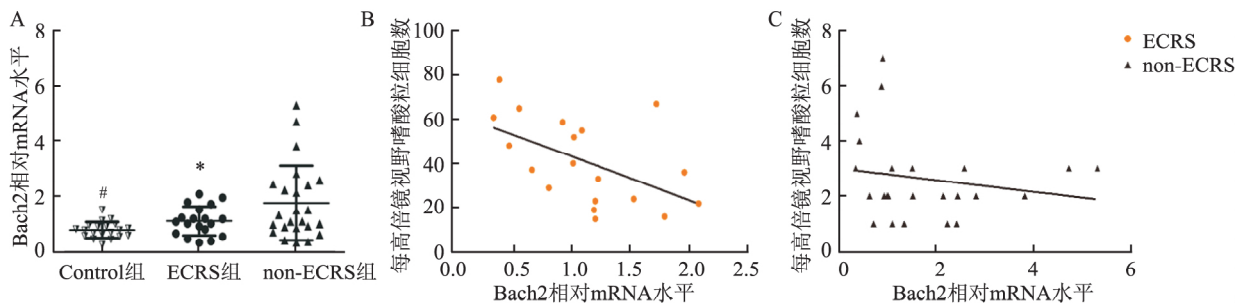


图3 Bach2 在不同组中 mRNA 的相对表达水平及与组织中嗜酸粒细胞数的相关性

A: 三组中 Bach2 mRNA 的相对表达水平; B: Bach2 mRNA 的相对表达水平与 ECSR 组中每高倍镜视野嗜酸粒细胞数的相关性; C: Bach2 mRNA 的相对表达水平与 non-ECSR 组中每高倍镜视野嗜酸粒细胞数的相关性; 与 non-ECSR 组比较: * $P < 0.05$; 与 ECSR 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

CRS 是耳鼻喉科常见的易复发、影响生活质量的炎症性疾病, 由于其病理生理机制不清及异质性, 已成为临床研究的热点。T 细胞在 CRS 的众多病理生理机制中起着至关重要的作用^[2]。其中, CRSsNP 主要以 Th1 炎症为主, Th2 炎症与嗜酸粒细胞浸润在 CRSwNP 发病机制中起着关键作用。对于不同类型 CRS 中炎症细胞的调节机制、分化和增殖的研究, 一直是不同类型 CRS 的分子机制的研究方向。Bach2 基因是 Bach2 家族成员之一, 主要表达在 T 细胞、B 细胞和神经细胞中, 并调控这些细胞。最近的研究^[7]表明, Bach2 参与维持 T 细胞免疫稳态, 调节效应 T 细胞、记忆 T 细胞及 Treg 细胞的产生和功能维持。此外, Bach2 缺乏能促进 Th2 型免疫应答反应^[9]。然而, Bach2 是否参与 CRS 的发病机制及慢性鼻-鼻窦炎中 Th2 免疫反应的调节尚待阐明。

本研究中, 分别用定量逆转录-聚合酶链反应、免疫组化染色和蛋白质印迹法测定 Bach2 在慢性鼻窦炎不同表型中的表达分布情况。实验结果表明, Bach2 主要表达在鼻黏膜上皮层, 且在 ECSR 组息肉上皮层中表达显著低于 non-ECSR 组。因此, 猜想 Bach2 参与 ECSR 的发病机制与上皮的功能障碍有关, 而进一步的结果显示, ECSR 组织中的 eosinophils/HPF 与 Bach2 的表达呈负相关性, 更加验证了这一猜想, 表明 Bach2 基因存在负向调节 ECSR 中嗜酸性炎症机制。气道上皮细胞在接触到病原体或过敏原后能够产生众多炎症介质, 因此在黏膜炎症的发生中起着重要的作用; 而上皮功能障碍是鼻窦炎的发病机制之一^[2]。上皮细胞构成鼻腔和

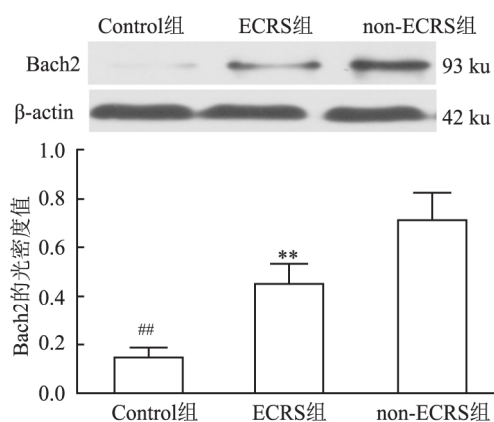


图4 Western blot 检测 Bach2 与内参蛋白 β -actin 在不同组中的表达
与 non-ECRS 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ECRS 组比较: ## $P < 0.01$

鼻窦的先天免疫,通过分泌 S100A8/A9、claudin-1、occludin 等蛋白,抵抗细菌的侵袭,清除潜在的病原体^[2]。与 CRSsNP 和对照组相比,这些蛋白在 CRSwNP 中的表达减少,可能增加病原体入侵的风险,从而导致炎症^[10-11]。然而,本研究中尚无明确证据表明 Bach2 参与到这种上皮功能受损的分子机制,因此可能需要更多的研究来探索这种调节机制是否存在。Kuwahara et al^[12]观察到 Bach2 敲除小鼠肺中 Th2 细胞因子 IL-5 和 IL-13 的表达增加,并且与对照小鼠相比,支气管肺泡灌洗液中炎性细胞浸润增多。同时,Bach2 敲除小鼠的胸腺中 Foxp3⁺ CD4 T 细胞数量为对照小鼠的一半,并且自发形成了特定的 Th2 型过敏性气道炎症。由于鼻黏膜细胞

的上皮形态和表达方式与支气管细胞相同,即说明气道上皮的连续性和气道上皮炎症的类似分子机制^[13]。这一实验的结果也说明了 Bach2 对于气道炎症方面的抑制作用。

Bach2 可限制包括 Th1、Th2 和 Th17 细胞在内的多个 Th 效应细胞群的完全分化,直接调控与 Th 极化和分化相关的基因,如 Irf4、Gata3 和 Ahr 等^[7]。最近的研究显示,Bach2 可以通过几种不同的途径调节 Th2 免疫反应和 Th2 细胞分化。其中关键一种途径为,Bach2 结合碱性亮氨酸拉链 ATF 样转录因子 Batf 结合 Th2 细胞因子调控位点,阻断 Th2 细胞因子的产生和(或) Th2 细胞分化^[12]。此外,Bach2 敲除的小鼠体内,Batf 的缺失也促进了自发性 2 型气道炎症的发展^[14]。虽然有大量证据表明 Bach2 在调节 Th2 免疫反应和维持免疫稳态方面具有关键作用,但具体的分子机制仍然尚未完全明确。

本研究的相关性分析结果表明,Bach2 基因表达水平与疾病的严重程度及组织中嗜酸粒细胞数之间有一定的相关性;初步建立了 Bach2 与鼻窦黏膜上皮中 Th2 介导的嗜酸粒细胞炎症及 ECRS 疾病严重程度之间的联系。这说明在 ECRS 的发病机制和不同 CRS 亚表型的形成中,Bach2 发挥了重要作用。因此,可以进一步猜测通过检测 Bach2 的表达,来评估 2 型免疫反应主导的嗜酸性炎症程度和病变损害程度,为疾病的诊治提供新的理论依据。然而,仍需要更多的临床数据分析来验证这一设想,以便提供更多的证据来预测 CRS 的严重程度和预后。

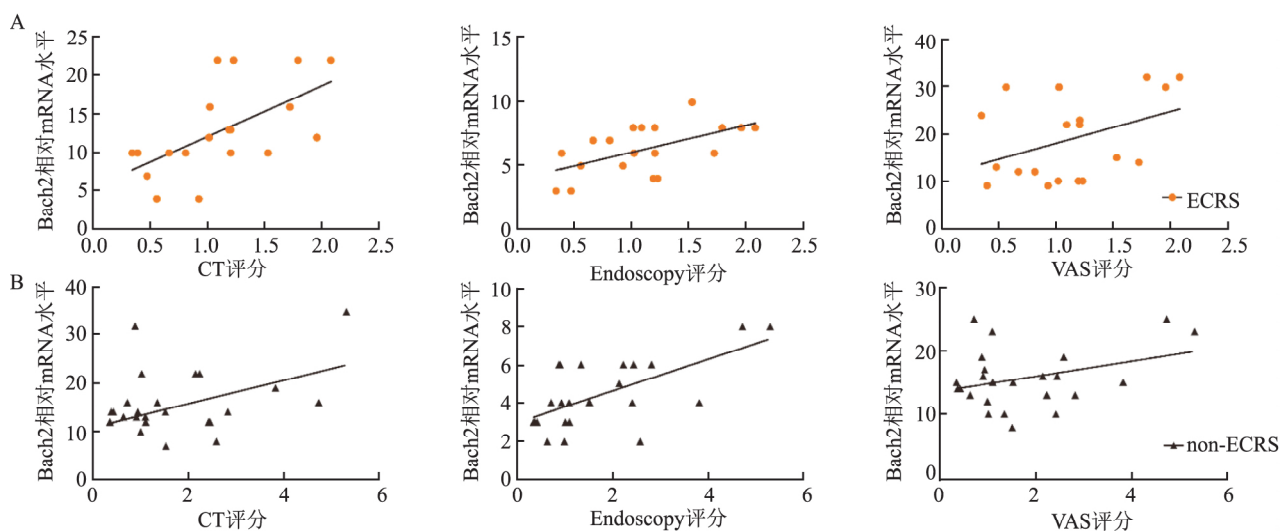


图5 Bach2 的相对 mRNA 的表达量与临床的相关性

A: Bach2 mRNA 的相对表达水平与 ECRS 组中 CT 评分、Endoscopy 评分及 VAS 评分之间的相关性; B: Bach2 mRNA 的相对表达水平与 non-ECRS 组中 CT 评分、Endoscopy 评分及 VAS 评分之间的相关性

本研究显示, Bach2 在 ECRS 组中显著低表达, 而致鼻息肉上皮嗜酸性炎症, 并与临床疾病严重程度相关。然而, 还需要进一步的研究来探究 Bach2 在上皮炎症发展过程中调节炎症细胞的具体机制, 以及是否能通过其表达水平来诊疗和预测 ECRS 的预后。

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. 慢性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南(2012年, 昆明) [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志 2013 48(2): 92-4.
- [2] Hsu J, Peters A T. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyp [J]. *Am J Rhinol Allergy* 2011 25(5): 285-90.
- [3] Chin D, Harvey R J. Nasal polyposis: an inflammatory condition requiring effective anti-inflammatory treatment [J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2013 21(1): 23-30.
- [4] Soler Z M, Sauer D, Mace J, et al. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010 142(1): 64-71.
- [5] Kjeldsen M K, Dybkaer K, Liu J, et al. BACH2 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2) [J]. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2010 14(10): 930-3.
- [6] Kim E H, Gasper D J, Lee S H, et al. Bach2 regulates homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells and protects against fatal lung disease in mice [J]. *J Immunol* 2014 192(3): 985-95.
- [7] Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, et al. BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis [J]. *Nature* 2013 498(7455): 506-10.
- [8] Cao P P, Li H B, Wang B F, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2009 124(3): 478-84. e2.
- [9] Tsukumo S, Unno M, Muto A, et al. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes [J]. *Pnas* 2013 110(26): 10735-40.
- [10] Soyka M B, Wawrzyniak P, Eiwegger T, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4 [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2012 130(5): 1087-96. e10.
- [11] Richer S, Truong-Tran A D, Carter R, et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps [J]. *Am J Rhinol* 2008 22(3): 228-34.
- [12] Kuwahara M, Ise W, Ochi M, et al. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop [J]. *Nat Commun* 2016 7: 12596.
- [13] Pitrez P M C, Brennan S, Turner S, et al. Nasal wash as an alternative to bronchoalveolar lavage in detecting early pulmonary inflammation in children with cystic fibrosis [J]. *Respirology* 2005 10(2): 177-82.
- [14] Yamashita M, Kuwahara M. The critical role of Bach2 in regulating type-2 chronic airway inflammation [J]. *Int Immunol* 2018 30(9): 397-402.

Expression and clinical significance of Bach2 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Wu Jun, 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 BTB and CNC homology 2 (Bach2) in different types of chronic rhinosinusitis (CRS). **Methods** In this study, nasal polyps and ethmoid sinus mucosa were enrolled from 43 CRS with nasal polyps (CRSwNP) patients [eosinophil CRSwNP (ECRS): $n = 19$; non-ECRS: $n = 24$] and 20 control subjects, respectively. The expression of Bach2 in sinonasal mucosal samples was detected by quantitative reverse transcript-polymerase chain reaction, immunohistochemistry and Western blot, and the number of eosinophils in sinonasal mucosal samples was assessed by hematoxylin-eosin staining. The severity of disease was scored by computed tomography (CT) scan, nasal endoscopy scan, and symptoms. **Results** The Bach2 was mainly located in the nasal mucosa epithelium. The mRNA and protein expression of Bach2 was significantly lower in ECRS than in non-ECRS, but higher than in control ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was a correlation between the mRNA expression level of Bach2 and the CT scan results, nasal endoscopy scores, and eosinophil counts per high power field in all ECRS patients ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was not significant correlation with the VAS score ($P > 0.05$). **Conclusion** Bach2 is lower expressed in ECRS patients compared with non-ECRS, it contributes to eosinophilic inflammation in ECRS, and is related to the disease severity.

Key words chronic rhinosinusitis; nasal polyps; Bach2; eosinophil; disease severity