

· 论 著 ·

HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在慢性鼻-鼻窦炎中的表达水平与其相关性

贺旭东¹, 李振国²

(1. 辽宁中医药大学附属医院检验科, 沈阳 110032; 2. 大连医科大学附属二院检验科, 辽宁大连 116027)

摘要: 目的 探讨缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在慢性鼻-鼻窦炎(CRS)中的表达水平及其相关性。方法 选取 2014 年 5 月至 2015 年 5 月于辽宁中医药大学附属医院进行治疗的 80 例伴鼻息肉 CRS 患者、80 例不伴鼻息肉 CRS 患者以及 80 例无 CRS 健康者(对照组)。收集并处理 3 组鼻窦黏膜,采用半定量反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 的表达,并分析其相关性。结果 在伴或不伴鼻息肉 CRS 患者中, HIF-1 α 、MUC5AC、MUC5B mRNA 的相对表达量分别为: 1.35 ± 0.85 、 1.35 ± 0.91 、 0.80 ± 0.55 、 0.79 ± 0.49 、 1.18 ± 1.01 、 1.21 ± 1.02 ,而在对照组中,它们的相对表达量分别为: 0.42 ± 0.33 、 0.43 ± 0.36 、 0.47 ± 0.43 ,CRS 组与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。伴或不伴鼻息肉 CRS 患者 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 均呈正相关($r = 0.476, P = 0.023$; $r = 0.476, P = 0.026$; $r = 0.478, P = 0.035$; $r = 0.508, P = 0.021$)。受试者工作特征曲线分析结果显示曲线下面积 = 0.956 4。结论 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在 CRS 中的表达水平明显升高,且 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 存在密切联系。

关键词: 慢性鼻-鼻窦炎; HIF-1 α ; MUC5AC; MUC5B**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.022**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2017)07-0927-03

Expression levels of HIF-1 α and mRNA and MUC5AC, MUC5B mRNA in chronic rhinosinusitis and their correlation

HE Xudong¹, LI Zhenguo²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116027, China)

Abstract: Objective To explore the expression levels of HIF-1 α and MUC5AC, MUC5B mRNA in chronic rhinosinusitis (CRS) and their correlation. **Methods** Eighty cases of CRS with nasal polyps(CRSwNP) treated in our hospital from May 2014 to May 2015, 80 cases of CRS without NP(CRSsNP) and 80 healthy people without CRS(control group) were chosen. Nasal sinus mucosa in 3 groups were collected and treated. The expressions of HIF-1 α , MUC5AC and MUC5B mRNA were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), and their correlations were analyzed. **Results** The relative expression levels of HIF-1 α , MUC5AC and MUC5B mRNA in the CRSwNP group or CRSsNP group were 1.35 ± 0.85 , 1.35 ± 0.91 ; 0.80 ± 0.55 , 0.79 ± 0.49 and 1.18 ± 1.01 , 1.21 ± 1.02 respectively, while which in the control group were 0.42 ± 0.33 , 0.43 ± 0.36 and 0.47 ± 0.43 respectively, the difference between the CRS groups and control group was statistically significant($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α in the CRSwNP group and CRSsNP group was positively correlated with MUC5AC, MUC5B mRNA($r = 0.476, P = 0.023$, $r = 0.476, P = 0.026$, $r = 0.478, P = 0.035$, $r = 0.508, P = 0.021$). The ROC analysis results showed AUC=0.956 4. **Conclusion** The expression levels of HIF-1 α and MUC5AC, MUC5B mRNA in chronic rhinosinusitis are significantly upregulated, moreover HIF-1 α is closely related with MUC5AC and MUC5B mRNA.

Key words: chronic rhinosinusitis; HIF-1 α ; MUC5AC; MUC5B

慢性鼻-鼻窦炎(CRS)是一种临床常见病和多发的慢性炎症性疾病,发病于鼻腔及鼻窦黏膜处,发病率占总人群的 1% ~ 4%^[1-2]。根据有无鼻息肉,CRS 可以分为伴有鼻息肉(CRSwNP)和不伴有鼻息肉(CRSsNP)两大类^[3]。CRS 主要临床特征为:鼻塞、面部胀满感、流黏(脓)性鼻涕、嗅觉减退等。CRS 反复发作,不仅严重影响了患者工作、学习及日常生活,还加重了社会的经济负担^[4]。目前,对 CRS 的发病机制仍缺乏系统深入的认识。CRS 患者发病时,其鼻窦黏膜上的 MUC5AC 和 MUC5B 表达明显增多^[5]。HIF-1 α 是内皮生长因子受体信号通路中一个重要的转录因子,能够促进 MUC5AC 的产生^[6]。目前,国内外 HIF-1 α 在 CRS 发病中的作用机制研究甚少,且 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 的表达水平的关系也少有研究^[6]。因此,本研究选取 80 例伴

鼻息肉 CRS 患者、80 例不伴鼻息肉 CRS 患者以及 80 例无 CRS 健康者,探讨 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在 CRS 中的表达水平及其相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月至 2015 年 5 月于辽宁中医药大学附属医院进行治疗的 80 例 CRSwNP 患者、80 例 CRSsNP 患者,均符合 2012 年中国慢性鼻窦炎诊疗标准^[7]。此外,再选择 80 例无 CRS 健康者作为对照组。CRSwNP 组中男 51 例,女 49 例,年龄 21~49 岁,平均(36.1 ± 8.5)岁,病程 3~5 年,平均(4.05 ± 2.12)年;CRSsNP 组中男 52 例,女 48 例,年龄 20~48 岁,平均(37.8 ± 7.9)岁,病程 3.5~5.0 年,平均(4.04 ± 2.18)年;对照组中男 50 例,女 50 例,年龄 19~45 岁,平均(36.4 ± 8.2)岁。3 组患者在性别、年龄等方面进行比较,差

差异无统计学意义($P>0.05$)，具有可比性。

1.2 实验方法 半定量反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)：MUC5AC 引物长度 438 bp, 上游引物 5'-CCC CTY GTY CTG TGA CIT rcTAC-3', 下游引物 5'-CTG ATG ATG GTG CCG TTG-3'; MUC5B 引物长度 446 bp, 上游引物 5'-TTC CAC CCG TCA CTG TCT TC-3', 下游引物 5'-CAG GTC TGG TTG GCG TAT TT-3'; HIF-1 α 引物长度 299 bp, 上游引物 5'-GTT CAC CTG AGC CTA ATA-3', 下游引物 5'-GTC TTC CAT ACG GTC TTT-3'。Trizol 提取 3 组总 RNA, 分别检测 3 组总 RNA 浓度和纯度。3 组分别取 10 μ L RNA 样本, 作为 cDNA 第一链合成的模板, 在 Oligo(DT) 为引物的条件下发生 RT 反应。反应体积: 25 μ L, 反应温度: 37 $^{\circ}$ C, 反应时间: 1 h。反应结束后行 PCR 扩增: 模板为 cDNA, 共循环 38 个周期。退火温度: MUC5AC 为 57 $^{\circ}$ C, MUC5B 为 58 $^{\circ}$ C, HIF-1 α 为 50 $^{\circ}$ C; 循环条件, 三者均一致: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 各退火温度 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min。3 组分别取 5 μ L PCR 扩增产物进行鉴定。鉴定方法: 1% 琼脂糖凝胶电泳。紫外灯下观测特异扩增条带, 测算电泳带的光密度值。

1.3 统计学处理 本文研究数据均采取 SPSS19.0 统计学软件进行分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 检验采用 t 检验; 计数资料检验采用 χ^2 检验, $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HIF-1 α 、MUC5AC、MUC5B mRNA 在 3 组中的表达 在 CRSwNP 组与 CRSsNP 组中, HIF-1 α 、MUC5AC、MUC5B mRNA 的相对表达量比较, 差异不具有统计学意义($P>0.05$), 但均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 详见表 1 和图 1。

表 1 HIF-1 α 、MUC5AC、MUC5B mRNA 在 3 组中的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	MUC5AC	MUC5B
对照组	0.42±0.12	0.43±0.16	0.47±0.13
CRSwNP 组	1.35±0.25	0.80±0.15	1.18±0.31
CRSsNP 组	1.35±0.21	0.79±0.19	1.21±0.32
t1	18.369*	9.240*	11.569*
t2	21.060*	7.938*	11.735*
t3	0.000#	0.226#	0.369#

注: t1 为对照组与 CRSwNP 组比较, t2 为对照组与 CRSsNP 组比较, t3 为 CRSwNP 组与 CRSsNP 组比较; * $P<0.05$, # $P>0.05$ 。

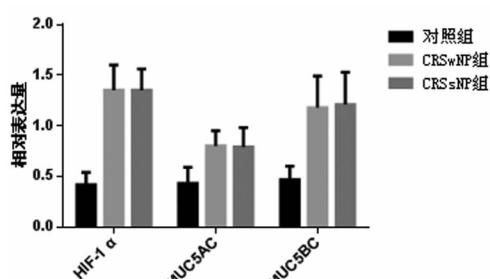


图 1 HIF-1 α 、MUC5AC、MUC5B mRNA 在 3 组中的表达

2.2 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在 CRSwNP 组的相关性 CRSwNP 组患者 HIF-1 α mRNA 的表达水平与 MUC5AC($r=0.476, P=0.023$)、MUC5B mRNA($r=0.476, P=0.026$)的表达水平, 见图 2、3。

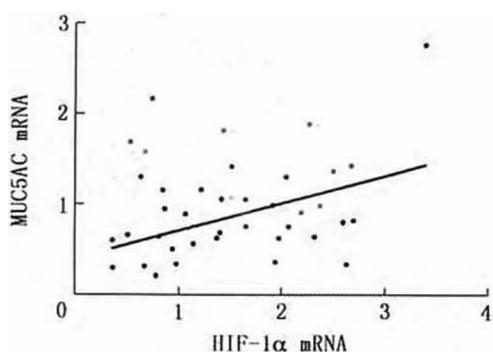


图 2 HIF-1 α mRNA 与 MUC5AC mRNA 表达的相关性

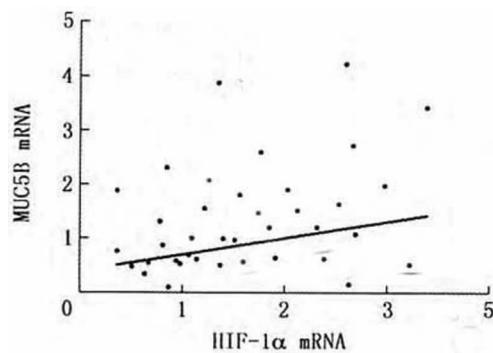


图 3 HIF-1 α mRNA 与 MUC5B mRNA 表达的相关性

2.3 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在 CRSsNP 组的相关性 CRSsNP 组患者 HIF-1 α mRNA 的表达水平与 MUC5AC($r=0.478, P=0.035$)、MUC5B mRNA($r=0.508, P=0.021$)的表达水平呈正相关, 图 4、5。

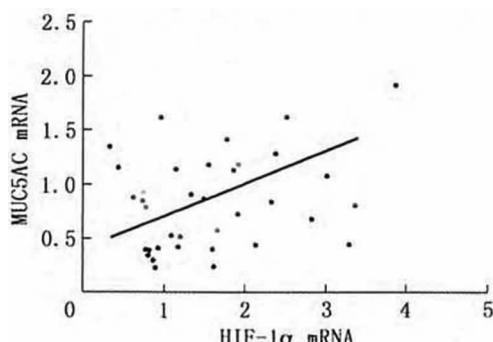


图 4 HIF-1 α mRNA 与 MUC5AC mRNA 表达的相关性

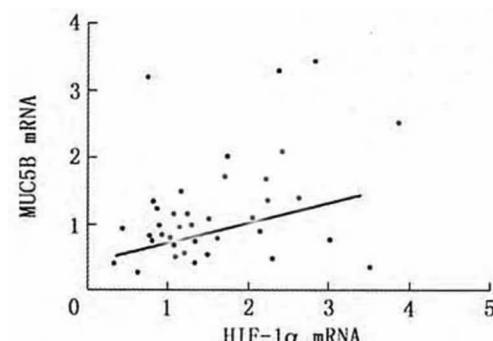


图 5 HIF-1 α mRNA 与 MUC5B mRNA 表达的相关性

2.4 受试者工作特征曲线(ROC 曲线) ROC 曲线分析 ROC 曲线分析结果显示, 曲线下面积为 0.956 4, 见图 6。

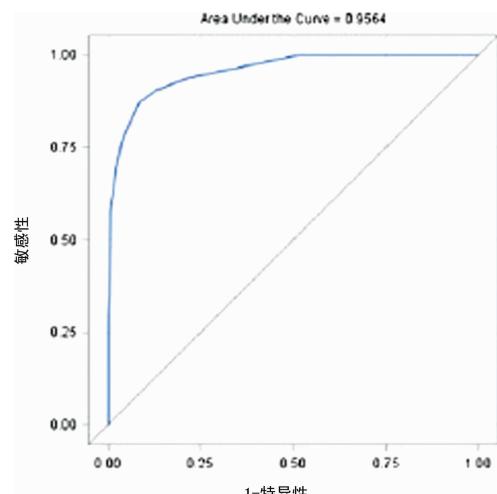


图 6 ROC 曲线分析图

3 讨 论

CRS 是耳鼻咽喉科常见病、多发病,临床主要症状为流涕、头痛、嗅觉减退、鼻面部胀痛等^[8]。近 20 年来,鼻内镜微创技术的广泛应用为 CRS 患者带来了福音,CRS 临床疗效得到了显著提升^[9]。但 CRS 发病机制仍不十分清楚,CRS 最重要的特征显示:腔鼻窦黏膜持续和扩大的炎性反应。病理检查发现:炎性反应下分泌细胞和黏液分泌显著增加。有研究推测可能的机理是杯状细胞能够生成黏液,此外,同时鼻黏膜腺体细胞发生增生,两者作用下黏蛋白基因的表达被迫增加^[10]。对 CRS 发病机制的认识不深一定程度上阻碍了临床治疗的进展,因此,发病机制研究仍是任重道远。

目前,黏蛋白调控表达在气道慢性炎性反应中的研究越来越受到专家们的重视^[6]。CRS 患者发病时,产生大量黏液,黏液中黏蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 表达显著提高。MUC5AC 主要表达于气道上皮的杯状细胞上,MUC5B 主要表达于黏膜下腺体内。气道黏液的主要组成被认为是 MUC5AC 和 MUC5B,但两者的生理功能以及潜在的作用仍不是十分清楚^[11]。本研究采用 RT-PCR 检测,结果发现在伴或不伴鼻息肉 CRS 患者中, MUC5AC、MUC5B mRNA 的相对表达量均显著高于对照组。mRNA 是携带遗传信息的能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。mRNA 表达增高,同时其知道合成的蛋白质也相应增高,也即 CRS 患者发病时,黏液中的 MUC5AC 和 MUC5B 表达明显提高。因此,本研究可以推断黏蛋白 MUC5AC 和 MUC5B 表达显著提高是导致 CRS 的一个主要因素,一定程度也可以佐证杯状细胞和腺体细胞增生导致 MUC5AC 和 MUC5B 表达提高,引起黏液增多。

HIF-1 α 能够调控黏蛋白的表达,是一种转录因子,其在下呼吸道疾病中有较多报道,此外,HIF-1 α 与杯状细胞的增生有密切联系^[12]。本研究采用 RT-PCR 检测,结果发现在伴或不伴鼻息肉 CRS 患者中 HIF-1 α mRNA 的相对表达量均显著高于对照组。HIF-1 α mRNA 表达提高导致 HIF-1 α ,间接引起黏蛋白表达提高从而引发 CRS。Polosukhin 等^[13]在体外实验中使用 1% 氧气培养支气管上皮细胞,发现 HIF-1 α 得到了特征性活化,结果表明低氧刺激能够引起 HIF-1 α 的活化。CRS 患者临床特征中如鼻塞等都会引起气管内低氧环境,可以一定程度证明低氧环境下,HIF-1 α 得到活化,从而增加黏蛋白的表达,导致黏液增多。

Polosukhin 等^[13]的研究还发现,人上皮细胞的黏液分泌细胞增多,且 MUC5AC 的表达明显提高。本研究结果发现

HIF-1 α mRNA 与 MUC5AC mRNA 在 CRS 患者中的表达呈正相关,与 Polosukhin 等^[13]的研究结果一致。HIF-1 α 与 MUC5AC 的表达也同样呈正相关,原因可能是 HIF-1 α 表达增强导致杯状细胞的增生,从而引起 MUC5AC 表达的增强。相比于 HIF-1 α 与 MUC5AC 的研究,HIF-1 α 与 MUC5B 的研究十分罕见,本研究同样发现 HIF-1 α mRNA 与 MUC5B mRNA 在 CRS 患者中的表达呈正相关,结果表明 HIF-1 α 与 MUC5B、以及腺体细胞增生之间存在密切联系。

综上所述,HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 在慢性鼻-鼻窦炎中的表达水平明显升高,且 HIF-1 α 与 MUC5AC、MUC5B mRNA 存在密切联系。

参考文献

- [1] 戴润芝,李谨,张群,等.长期低剂量克拉霉素联合鼻用激素治疗慢性鼻-鼻窦炎的疗效分析[J].医学研究杂志,2015,44(5):137-140.
- [2] 张雷波,陈始明,王水斌,等.趋化因子 CCL-18 在慢性鼻-鼻窦炎中的表达及意义[J].现代生物医学进展,2015,15(8):1429-1433.
- [3] 修倩,孟粹达,李琳,等.变应性因素对慢性鼻-鼻窦炎病变严重程度及术后疗效的影响[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,29(1):34-44.
- [4] 李斯斯,陈建福,余咏梅,等.规范化药物治疗慢性鼻-鼻窦炎的近期疗效观察[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(2):75-79.
- [5] 黄小燕,冯琨,刘丹,等. pendrin 在慢性鼻-鼻窦炎黏膜中的表达及其与黏蛋白 5AC 表达的相关性[J].中华医学杂志,2015,95(14):1078-1082.
- [6] 罗庆,朱恒涛,冯琨,等.慢性鼻-鼻窦炎中缺氧诱导因子 1 α 的表达及与黏蛋白分泌的关系[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,50(2):138-144.
- [7] 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.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):92-94.
- [8] 李玉瑾,李佩忠,金新,等.鼻内镜鼻窦手术联合低温等离子下鼻甲射频消融术治疗慢性鼻-鼻窦炎的疗效观察[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,29(9):788-791.
- [9] 谢丹,梁建伟,王兰田,等.鼻内镜治疗慢性鼻-鼻窦炎疗效及影响因素分析[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2013,19(4):317-321.
- [10] 冯琨.慢性鼻-鼻窦炎中 HNE-EGFR-FOXM1 信号通路对 MUC5AC 表达作用的研究[D].南昌:南昌大学,2015.
- [11] 白晶,苗北平,夏文彤,等.白细胞介素-17A 对鼻黏膜上皮细胞表达黏蛋白 MUC5AC 的刺激作用及分子机制[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2013,20(3):319-322.
- [12] Jang S, Park JW, Cha HR, et al. Silver nanoparticles modify VEGF signaling pathway and mucus hypersecretion in allergic airway inflammation [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7(13):1329-1343.
- [13] Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, et al. Hypoxia-inducible factor-1 signalling promotes goblet cell hyperplasia in airway epithelium[J]. J Pathol, 2011, 224(2):203-211.