

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.02.010

论著·临床研究

CysLTR-1 和 CysLTR-2 在腺样体肥大 儿童腺样体组织中的表达

朱美华¹ 梁敏¹ 王志坚¹ 沈雁² 温红艳¹ 翟锦明³ 杨晓彬³

(1. 广州医科大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510260; 2. 广州市红十字会医院, 广东 广州 510220;
3. 广州医科大学附属第二医院耳鼻喉科, 广东 广州 510260)

[摘要] **目的** 检测腺样体肥大 (adenoid hypertrophy, AH) 患儿腺样体组织中半胱氨酸白三烯受体 1 (CysLTR-1) 和半胱氨酸白三烯受体 2 (CysLTR-2) 的表达, 探讨白三烯在 AH 发病中的作用。**方法** 将 60 例行腺样体/扁桃体切除的 AH 患儿分为单纯 AH 组与伴变态反应性鼻炎 AH 组 (每组 30 例), 以反复化脓性扁桃体炎行扁桃体切除的 20 例患儿作为对照组。通过免疫荧光组织化学标记法及累积光密度 (IOD) 测量方法观察各组患儿术后扁桃体/腺样体组织中 CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达。**结果** 在两个 AH 组的腺样体组织和扁桃体组织中, CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达强度均明显高于对照组 ($P<0.01$), 其中伴变态反应性鼻炎 AH 组的表达高于单纯 AH 组 ($P<0.01$)。**结论** AH 儿童腺样体组织中存在 CysLTR-1 和 CysLTR-2 的高表达, 显示炎症介质白三烯参与了 AH 的发病。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(2): 159-163]

[关键词] 腺样体肥大; 白三烯受体; 儿童

Expression of CysLTR-1 and CysLTR-2 in adenoid tissues from children with adenoid hypertrophy

ZHU Mei-Hua, LIANG Min, WANG Zhi-Jian, SHEN Yan, WEN Hong-Yan, ZHAI Jin-Ming, YANG Xiao-Bin. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China (Email: zmh1962cn@163.com)

Abstract: Objective To examine the expression of cysteinyl leukotriene receptor-1 (CysLTR-1) and cysteinyl leukotriene receptor-2 (CysLTR-2) in the adenoid tissues from children with adenoid hypertrophy (AH) and to explore the role of leukotrienes in the pathogenesis of AH. **Methods** Sixty children with AH who were treated by adenoidectomy and/or tonsillectomy were classified into two groups: simple AH and AH plus allergic rhinitis ($n=30$ each). Twenty children who underwent tonsillectomy due to recurrent purulent tonsillitis were selected as the control group. The expression of CysLTR-1 and CysLTR-2 in the excised tonsil and/or adenoid tissues was determined by immunofluorescence histochemical labeling and integrated optical density measurement. **Results** The expression of CysLTR-1 and CysLTR-2 in the adenoid and tonsil tissues increased significantly in both the simple AH group and AH plus allergic rhinitis group compared with the control group ($P<0.01$). The expression of CysLTR-1 and CysLTR-2 in the AH plus allergic rhinitis group increased more significantly compared with the simple AH group ($P<0.01$). **Conclusions** CysLTR-1 and CysLTR-2 are highly expressed in the adenoid tissues from children with AH, suggesting that leukotrienes are involved in the pathogenesis of AH.
[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(2): 159-163]

Key words: Adenoid hypertrophy; Leukotriene receptor; Child

腺样体肥大 (adenoid hypertrophy, AH) 常引起张口呼吸、鼻塞、打鼾以及慢性副鼻窦炎、复发性中耳炎、慢性咳嗽等, 更为严重的可引起阻

塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSAS), 影响氧供, 导致神经行为异常和心血管系统受累症状^[1], 严重影响小儿健康和生

[收稿日期] 2014-10-14; **[接受日期]** 2014-12-30

[基金项目] 2011 年广东省第六批科学事业计划项目 (2011B061800001)。

[作者简介] 朱美华, 女, 本科, 教授。

长发育。目前 AH 的发病机制尚不完全清楚, 治疗手段亦非常有限, 手术切除仍是当前国内外儿童 AH 的最主要治疗手段。白三烯与呼吸道炎症的关系密切^[2-3]。已有临床治疗经验发现, 使用白三烯受体拮抗剂治疗 AH 有效, 可使临床症状改善, 腺样体体积缩小^[4-5]。国外有研究证实 AH 合并 OSAS 患儿的扁桃体和腺样体组织存在白三烯受体表达上调^[6]; 亦有学者测得 OSAS 儿童的尿、呼出气体冷凝物、腺样体扁桃体组织的半胱氨酸白三烯 (cysteinyl leukotriene, CysLT) 浓度增加^[7], 提示白三烯参与炎症过程。国内尚未见相关研究报道。本研究探讨了 AH 患儿的腺样体组织中半胱氨酸白三烯受体 (cysteinyl leukotriene receptor, CysLTR) 的表达及其临床意义, 为临床用药提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组

研究对象为 2011 年 1 月至 2013 年 12 月在我院耳鼻喉科住院行腺样体 / 扁桃体切除的 AH 患儿 60 例。入选病例具有不同程度的鼻塞、打鼾、睡眠张口呼吸或上气道咳嗽综合征等症状, 经鼻咽纤维镜确诊为 AH。根据内镜检查显示腺样体阻塞鼻孔的程度将 AH 分为 4 度^[8]: <25% 为 I 度, 25%~50% 为 II 度, 50%~75% 为 III 度, >75% 为 IV 度, 其中 III 度为腺样体中度肥大, IV 度为腺样体重度肥大。

将 60 例 AH 患儿分为单纯 AH 组与伴变态反应性鼻炎 AH 组 (每组 30 例): 单纯 AH 组为单纯腺样体肥大; 变态反应性鼻炎组 (简称过敏组) 为 AH 并变态反应性鼻炎^[9]。以反复化脓性扁桃体炎行扁桃体切除的 20 例患儿作为对照组。两个 AH 组间腺样体肥大程度比较差异无统计学意义; 3 组间性别、年龄分布差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 3 组患儿一般资料

组别	n	男 / 女 (例)	中位年龄 (范围, 岁)	腺样体肥大程度 (例)	
				中度	重度
对照组	20	12/8	8.9(5.2~12.1)	0	0
单纯组	30	21/9	10.4(3~14)	9	21
过敏组	30	24/6	9.2(3.6~13.1)	13	17

1.2 标本收集

由耳鼻喉科医生手术摘除扁桃体 / 腺样体后, 将样本放入 10% 中性甲醛固定液中固定 48 h 后转至 75% 乙醇中保存至石蜡包埋。30 例单纯 AH 组和 30 例过敏组均取腺样体组织标本, 并于同时伴扁桃体肿大的 AH 患儿中各取 10 例患儿的扁桃体组织。对照组 20 例取术后扁桃体组织。

1.3 主要试剂

主要试剂包括: CysLTR1 (K172) pAb (BS2711, Bioworld Technology, Inc. 美国), CysLTR2 (K324) pAb (BS2772, Bioworld Technology, Inc. 美国), 羊抗兔 Alexa Flour 488 荧光探针 (48468A Invitrogen, 美国), 羊抗兔 DyLight 594 荧光探针 (E032320, EarthOx 美国), 0.01 M 磷酸缓冲液, DAPI, 石蜡 (Paraplast High Melt, Leica, 德国)。

1.4 腺样体 / 扁桃体组织 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达的检测

采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察组织结构。通过免疫荧光组织化学标记法及累积光密度 (IOD) 测量方法检测腺样体 / 扁桃体组织 CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达。标本石蜡包埋切片, 厚度 4 μ m, 经过脱蜡入水、微波抗原修复, 山羊血清直接封闭, 分别加一抗 CysLTR1 和 CysLTR2, 对照用 PBS 代替一抗, 4℃过夜, 次日 37℃复温 30 min, 0.01 M PBS 洗片 5 min, 重复 3 次; 加间接荧光抗体作为二抗 1 h, 其中用 Alexa Flour 488 (绿色) 羊抗兔标记 CysLTR1, 用 DyLight 594 (红色) 羊抗兔标记 CysLTR2, 室温 1 h, 0.01 M PBS 洗片 5 min, 重复 3 次, DAPI 90% 甘油 (PBS 配制) 封片, 荧光显微镜读片拍照。荧光显微镜采集图像, 每份标本 5 张, 根据 IPP (Image-pro plus) 图像分析软件分析荧光光密度 (IOD)。

1.5 统计学分析

运用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理与分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均值比较采用单因素方差分析, 组间两两两两比较采用 LSD 检验; 组间计数资料的比较采用卡方检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CysLTR-1 和 CysLTR-2 在扁桃体和腺样体组织的表达定位

扁桃体和腺样体组织的细胞以淋巴细胞为主。

CysLTR-1 表达定位在两种组织的淋巴细胞膜上，但扁桃体组织比腺样体组织有更强的荧光表达，见图 1。CysLTR-2 表达亦定位在两种组织的淋巴细胞膜上，但腺样体组织比扁桃体组织有更强的荧光表达，见图 2。

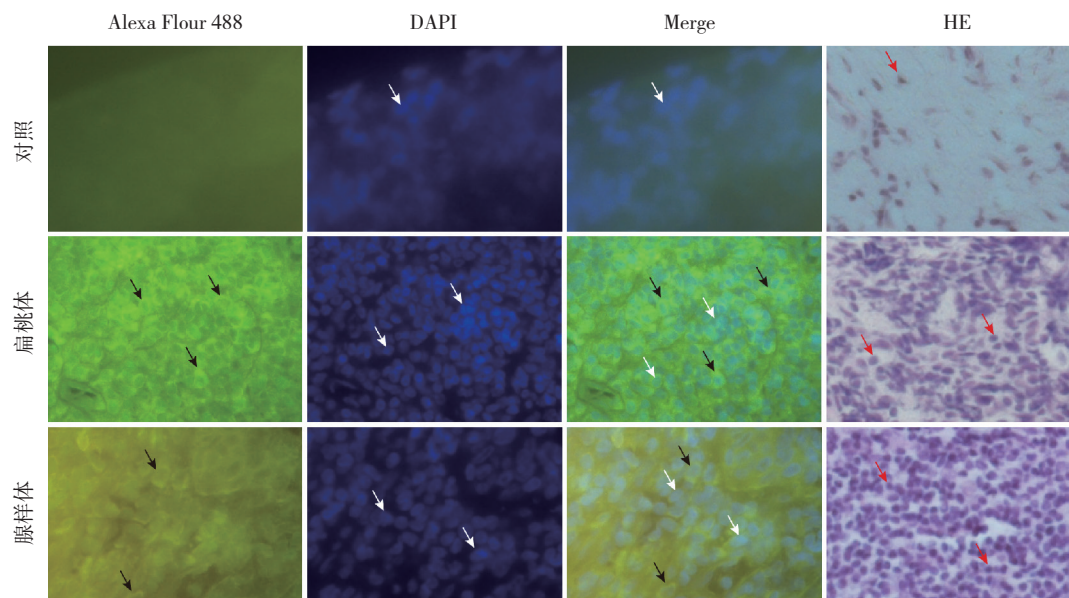


图 1 CysLTR-1 在扁桃体和腺样体组织中的表达 (×200) 免疫荧光 Alexa Flour 488 (绿色) 标记 AH 患儿术后的扁桃体和腺样体组织 CysLTR-1 的表达，DAPI 标记细胞核，Merge 为 Alexa Flour 与 DAPI 的组合图，对照不加一抗；HE 免疫组化染色显示组织中的淋巴细胞。图中黑色箭头表示细胞膜有环状的荧光表达，白色箭头表示细胞核 DAPI 染色阳性，红色箭头表示 HE 染色的组织中淋巴细胞位置。与对照比较，显示了腺样体和扁桃体淋巴细胞膜上均有 CysLTR-1 的表达，但扁桃体中 CysLTR-1 的表达更强。

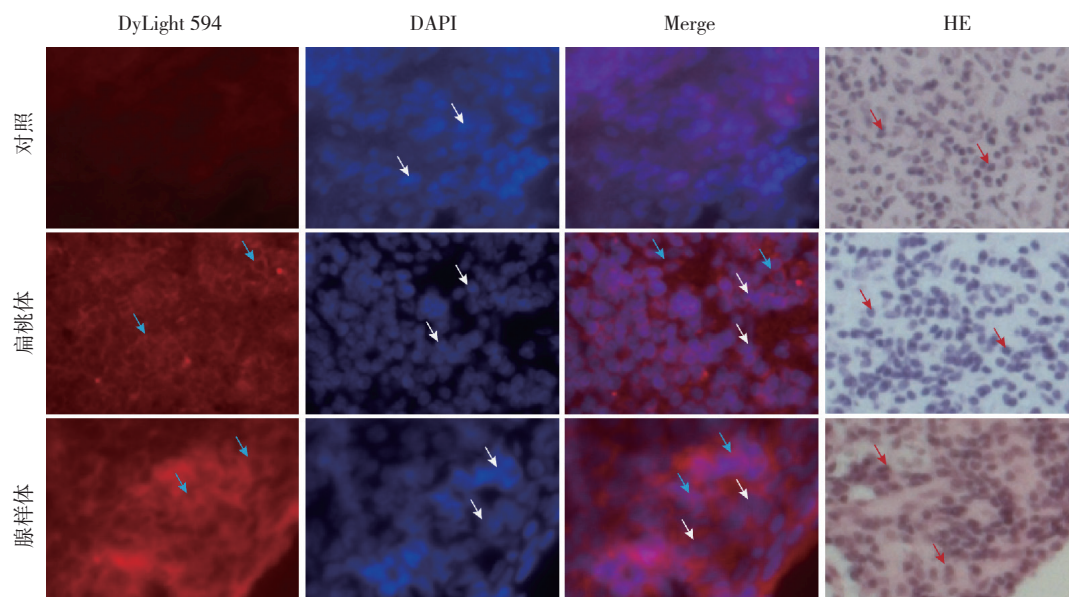


图 2 CysLTR-2 在扁桃体和腺样体组织中的表达 (×200) 免疫荧光 DyLight 594 (红色) 标记 AH 患儿术后的扁桃体和腺样体组织 CysLTR-2 的表达，DAPI 标记细胞核，Merge 为 DyLight 与 DAPI 的组合图，对照不加一抗；HE 免疫组化染色显示组织中的淋巴细胞。图中蓝色箭头表示细胞膜有环状的荧光表达，白色箭头表示细胞核 DAPI 染色阳性，红色箭头表示 HE 染色的组织中淋巴细胞位置。与对照比较，CysLTR-2 表达定位在两种组织的细胞膜上，但腺样体组织比扁桃体组织有更强的荧光表达。

2.2 各组腺样体/扁桃体组织 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达的比较

在两个 AH 组的腺样体组织中, CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达强度均明显高于对照组 ($P<0.01$), 其中过敏组的表达高于单纯组 ($P<0.01$), 见表 2。在两个 AH 组的扁桃体组织中, CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达强度亦均明显高于对照组 ($P<0.01$), 其中过敏组的表达高于单纯组 ($P<0.01$), 见表 3。

表 2 腺样体/扁桃体组织 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达的累积光密度 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CysLTR-1	CysLTR-2
对照组	20	987 $\pm$ 596	1680 $\pm$ 1021
单纯组	30	6250 $\pm$ 1964 ^a	6824 $\pm$ 2351 ^a
过敏组	30	8645 $\pm$ 4562 ^{a,b}	8358 $\pm$ 2146 ^{a,b}
<i>F</i> 值		40.823	38.875
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: 对照组标本为扁桃体组织, 余两组为腺样体组织。
a 示与对照组比较, $P<0.01$; b 示与单纯组比较, $P<0.01$ 。

表 3 3 组扁桃体组织 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达的累积光密度 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CysLTR-1	CysLTR-2
对照组	20	987 $\pm$ 596	1680 $\pm$ 1021
单纯组	10	4285 $\pm$ 2952 ^a	3924 $\pm$ 1865 ^a
过敏组	10	11532 $\pm$ 6374 ^{a,b}	9860 $\pm$ 3687 ^{a,b}
<i>F</i> 值		58.682	47.624
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P<0.01$; b 示与单纯组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

CysLT 作为一类重要的炎症介质不仅直接参与炎症过程的调控, 而且还具有调控细胞增殖、分化等多种功能。这些炎症介质通过两种 G 蛋白偶联受体 CysLTR-1 和 CysLTR-2 发挥其生物学活性^[10]。白三烯在哮喘、变应性鼻炎中研究较多, 目前还发现白三烯可促进包括肿瘤细胞在内的多种细胞增殖^[11]。而在不同的细胞和不同的病理生理过程中, 它们所发挥的作用相差甚远, 这正是由于其受体 (CysLTR) 的表达强度和功能状态存在差异所致。引起儿童 OSAS 主要的发病因素是扁桃体、腺样体肥大。腺样体又称咽扁桃体, 属于

人体免疫器官, 参与咽淋巴内环 (Waldeyer 淋巴环) 的组成, 含有大量处于各发育阶段的 T、B 淋巴细胞、吞噬细胞及浆细胞等, 在各种变应原的刺激下均能产生 T、B 淋巴细胞。人类的扁桃体组织中也以 T 淋巴细胞为主, 这些淋巴组织的过度增生导致上气道阻塞的发病机制尚不明确。国外已有多项研究发现在 AH 合并 OSAS 患儿的扁桃体和腺样体组织中存在白三烯受体表达上调^[6,12]。

本研究应用免疫荧光技术, 在 60 例 AH 患儿中, 发现其腺样体组织的淋巴细胞膜上均有 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达, 并扁桃体肥大的 AH 患儿的扁桃体组织中同样也发现其淋巴细胞膜上有 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达, 这表明了 CysLTR-1、CysLTR-2 均参与了扁桃体、腺样体肥大的损伤过程。在 AH 患儿中这些 CysLTs 可能从脉管系统迁移而至。CysLTs 可以随后作用于多种炎性细胞, 如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞引起炎症反应, 促进上皮细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞等增殖的作用。已有研究表明, 这些受体表达的增加提示了这些儿童淋巴组织增生和肥大的可能信号通路^[13]。因而, 如果这些过程与腺样体组织增大在病理生理上相关联, 使用白三烯受体阻断剂应该可以消除增生信号, 也因而可以显著减少上气道总体淋巴组织的体积, 从而减轻睡眠呼吸障碍。

本研究发现, 合并变应性鼻炎的 AH 患儿其免疫荧光反应强于未合并变应性鼻炎的单纯 AH 患儿, 提示 CysLTs 对变应性体质患儿发生 AH 的机制具有更重要的影响。有学者提出, OSAS 患儿存在过敏原致敏的患病率较高, 这类患儿外周血 T、B 淋巴细胞能产生变应性炎症特征性的细胞因子 IL-4, 诱导 CysLTR-1 和 CysLTR-2 的表达, 从而使腺样体过度增殖^[12]。也有学者认为, 食物不耐受是造成 AH 的可能因素, 提出对于变应性体质的儿童减少其对变应原的接触, 可能降低此类儿童 AH 的发病率^[14]。

本研究结果还显示, 反复扁桃体炎儿童的扁桃体组织亦存在 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达, 但表达率明显低于并存扁桃体肥大的 AH 患儿, 其机制有待进一步研究。

综上所述, AH 患儿腺样体和扁桃体组织均

存在 CysLTR-1 和 CysLTR-2 的高表达, 且合并变应性鼻炎的特异质 AH 患儿 CysLTR-1 和 CysLTR-2 表达更强, 证实 CysLT 与 AH 的发生密切相关, 为白三烯受体阻滞剂治疗儿童 AH 提供了有力的临床依据。

【参 考 文 献】

- [1] 梅丽, 杨晓英, 王润兰, 等. 应用心肌矢量应变技术检测扁桃体腺样体肥大患儿心脏功能变化 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 11(5): b377-379.
- [2] 张世杰, 欧维琳. 半胱氨酰白三烯受体 1 与支气管哮喘关系研究进展 [J]. 心脑血管病杂志, 2013, 32(2): 236-237.
- [3] Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, et al. Localization and up-regulation of cysteinyl leukotriene-2 receptor in human allergic nasal mucosa[J]. Allergol Int, 2013, 62(2): 223-228.
- [4] 朱美华, 王志坚, 温红艳, 等. 白三烯受体拮抗剂治疗儿童腺样体肥大临床研究 [J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(11): 840-842.
- [5] 李旭, 黄群. 非手术方法治疗儿童腺样体肥大的临床观察 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 27(8): 432-434.
- [6] Tsaoussoglou M, Lianou L, Maragozidis P, et al. Cysteinyl leukotriene receptors in tonsillar B- and T-lymphocytes from children with obstructive sleep apnea [J]. Sleep Med, 2012, 13(7): 879-885.
- [7] Goldbar AD, Krishna J, Li RC, et al. Inflammatory mediators in exhaled breath condensate of children with obstructive sleep apnea syndrome[J]. Chest, 2006, 130(1): 143-148.
- [8] Franco RA Jr, Rosenfeld RM, Rao M. First place-resident clinical science award 1999. Quality of life for children with obstructive sleep apnea[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 123(1Pt): 9-16.
- [9] 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、小儿学组. 儿童变应性鼻炎诊断和治疗指南 (2010 年, 重庆) [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 46(1): 7-8.
- [10] Singh RK, Gupta S, Dastidar S, et al. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics[J]. Pharmacology, 2010, 85(6): 336-349.
- [11] 严能兵, 罗鸿. 白三烯的研究进展与临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 721-723.
- [12] Kaditis AG, Ioannou MG, Chaidas K, et al. Cysteinyl leukotriene receptors are expressed by tonsillar T cells of children with obstructive sleep apnea[J]. Chest, 2008, 134(2): 324-331.
- [13] Kanaoka Y, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses[J]. J Immunol, 2004, 173(3): 1503-1510.
- [14] 李雅琼, 孙婕, 张华. 腺样体肥大与食物不耐受相关性探讨 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 27(12): 636-638.

(本文编辑: 邓芳明)