

乳过氧化物酶在鼻息肉组织中的表达特征及金黄色葡萄球菌定植对其表达的调控作用

韩苗苗^{1▲} 李睿哲^{2▲} 曹清³ 娄鸿飞¹ 何睿² 李华斌^{1△}

¹复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻喉科 上海 200031; ²复旦大学基础医学院免疫学系 上海 200032;

³苏北人民医院耳鼻喉科 扬州 225001)

【摘要】 目的 探究鼻息肉组织中乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)的细胞来源及其在不同类型鼻息肉组织中的表达差异,并初步分析金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)定植对LPO表达的调控作用。方法 利用已发表的美国及中国人群鼻息肉及非息肉对照鼻黏膜组织的单细胞转录组测序数据,分析LPO的细胞来源及其在不同类型鼻息肉组织中的表达差异。利用RT-qPCR和免疫组化技术检测临床样本LPO的基因及蛋白表达水平。构建小鼠鼻腔感染模型,检测*S. aureus*定植对LPO表达的调控作用。结果 LPO主要由上皮腺体细胞产生,在美国及中国人群鼻息肉组织中表达均显著低于非息肉鼻黏膜组织,且在嗜酸性粒细胞性鼻息肉(non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, non-ECRSwNP)组织中的表达最低。鼻息肉(尤其non-ECRSwNP)黏膜下腺体细胞比例显著减少,与LPO表达水平呈强正相关。RT-qPCR和免疫组化染色证实鼻息肉组织LPO mRNA及蛋白表达均下调。小鼠模型证实*S. aureus*定植能够抑制鼻黏膜LPO的表达。结论 LPO主要来源于鼻黏膜下腺体细胞,在慢性鼻窦炎伴息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP)尤其non-ECRSwNP中的表达显著低于非息肉鼻黏膜,并与黏膜下腺体减少直接相关。*S. aureus*定植能够下调小鼠鼻黏膜LPO的表达,提示LPO低表达可能参与CRSwNP黏膜屏障功能的受损。

【关键词】 慢性鼻窦炎伴息肉(CRSwNP); 乳过氧化物酶(LPO); 单细胞RNA测序; 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*); 定植; 小鼠

【中图分类号】 R763 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2026.02.003

Expression characteristics of lactoperoxidase in nasal polyps and its regulation by *Staphylococcus aureus* colonization

HAN Miao-miao^{1▲}, LI Rui-zhe^{2▲}, CAO Qing³, LOU Hong-fei¹, HE Rui², LI Hua-bin^{1△}

¹Department of Otorhinolaryngology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China; ²Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³Department of Otorhinolaryngology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China)

【Abstract】 Objective To investigate the origin and expression of lactoperoxidase (LPO) in distinct nasal polyp subtypes and the impact of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection on its expression. **Methods** Published single-cell RNA sequencing data of nasal polyp tissues and control nasal mucosa tissues from both American and Chinese cohorts were analyzed to identify the cellular origin of LPO and its differential expression across chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) subtypes. Clinical samples were collected to validate LPO expression at the mRNA (RT-qPCR) and protein

国家自然科学基金(82371827, 82271138, 82271139); 国家重点研发计划(2022YFC2504100)

▲HAN Miao-miao and LI Rui-zhe contributed equally to this work

△Corresponding author E-mail: alleryli@163.com

网络首发时间:2026-03-06 13:48:30 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260305.1916.004

(immunohistochemistry, IHC) levels. A mouse *S. aureus* nasal infection model was established to detect the effect of bacterial colonization on LPO expression. **Results** LPO was primarily produced by submucosal glandular cells. Its expression was significantly lower in nasal polyp tissues compared to control nasal mucosa in both cohorts, with the lowest expression observed in non-ECRSwNP. The proportion of glandular cells was markedly reduced in nasal polyps, particularly in non-ECRSwNP, which was positively correlated with LPO expression levels. RT-qPCR and IHC confirmed LPO expression was decreased in polyp tissues. The murine model demonstrated that *S. aureus* colonization significantly suppressed LPO expression. **Conclusion** LPO is predominantly produced by nasal submucosal glandular cells; its expression is significantly lower in CRSwNP-especially in non-ECRSwNP- than in non-polyp nasal mucosa, and is directly associated with submucosal glandular loss. *S. aureus* colonization downregulates LPO expression in the mouse nasal mucosa, suggesting that reduced LPO expression may contribute to mucosal barrier dysfunction in CRSwNP.

【Key words】 chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP); lactoperoxidase (LPO); single-cell RNA sequencing; *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*); colonization; mouse

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82371827, 82271138, 82271139) and the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2504100).

慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)是鼻窦及鼻腔黏膜的一种高度异质性慢性炎症性疾病,在全球的患病率为5%~13%,其发病会降低患者生活质量并对社会经济造成沉重负担^[1-2]。根据是否伴有息肉,可将 CRS 分为慢性鼻窦炎伴息肉(CRS with nasal polyps, CRSwNP)及慢性鼻窦炎不伴息肉(CRS without nasal polyps, CRSsNP)两种类型,前者症状更加严重,更易复发,且对治疗的应答也更差。目前有关难治性 CRSwNP 的病理生理机制还有待进一步阐明。

CRSwNP 可以进一步分为嗜酸粒细胞性 CRSwNP (eosinophilic CRSwNP, ECRSwNP) 及非嗜酸粒细胞性 CRSwNP (non-eosinophilic CRSwNP, non-ECRSwNP)^[3]。鼻上皮屏障缺陷、病原菌、颗粒物暴露以及宿主免疫系统失调,都在 CRSwNP 发病机制中发挥重要作用^[4-5]。研究发现 *S. aureus* 等细菌在鼻腔的定植以及外毒素等细菌产物与 CRS 的发病密切相关^[6]。在 CRSwNP 患者鼻息肉组织中常被检测出 *S. aureus*、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、链球菌 (*Streptococcus*) 等致病菌^[6-11]。鼻黏膜上皮不仅形成物理屏障保护宿主免受病原体和颗粒物的侵害,黏膜上皮细胞及其腺体能够分泌免疫球蛋白、溶菌酶、抗菌肽以及其他对先天性宿主防御至关重要的因子。鼻黏膜上皮屏障的丧失,黏膜上皮通透性增加和重要抗菌物质表达的减

少,是多种 CRS 的共同特征^[12-13]。有研究发现,与健康对照组相比,CRSwNP 患者上皮细胞表达的溶菌酶、S100A7、S100A8/9、 β -防御素等抗菌蛋白水平降低^[14-16]。

乳过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)是一种血红素过氧化物酶,其利用 H_2O_2 催化阴离子 SCN^- 氧化为具有抗菌作用的 OSCN^{-[17]}。LPO 介导的抗菌机制已知适用于葡萄球菌、链球菌、大肠埃希菌和假单胞菌等多种呼吸道病原菌^[17-18]。尽管 LPO 在呼吸道防御中发挥重要作用,但其在 CRSwNP 中的研究较少。目前已有文献^[19]报道 LPO 在鼻息肉组织中的表达低于正常下鼻甲组织,但 LPO 在鼻息肉组织中的细胞来源、在不同类型息肉组织中的表达差异及其表达是否受 *S. aureus* 的调控尚未见报道。

本研究旨在整合并分析多个单细胞转录组测序数据,结合临床样本组织学分析,明确 LPO 在不同类型鼻息肉中的细胞来源及表达差异;并进一步通过构建小鼠鼻腔感染模型,探讨 *S. aureus* 定植对宿主鼻黏膜 LPO 表达的调控作用,以为不同类型鼻息肉的精准治疗提供新的理论依据与潜在靶点。

材料和方法

研究对象 公共单细胞 RNA 测序数据来源: Ordovas-Montañes 等^[21]报道的 CRS 患者鼻息肉及非息肉对照组的单细胞 RNA 测序数据(来源于论

文补充材料);Wang等^[20]报道的健康对照、CRSsNP鼻黏膜及ECRSwNP/non-ECRSwNP鼻息肉组织单细胞转录组测序数据(下载自国家生物信息中心 Genome Sequence Archive, GSA; 登录号 HRA000772)。

临床样本与伦理 RT-qPCR及免疫组化样本来源于复旦大学附属眼耳鼻喉科医院行鼻内镜手术患者;22例CRSwNP患者、5例CRSsNP患者及10例鼻中隔矫正手术、鼻颅底手术的非CRS患者作为正常对照组。CRSsNP和CRSwNP诊断标准参照中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南,诊断依据症状、鼻内镜及

鼻窦CT检查。所有患者术前1个月内均未使用过激素或其他相关免疫治疗药物。有阿司匹林加重性呼吸系统疾病、伴有急性上呼吸道感染、囊性纤维化及原发性纤毛障碍、伴有自身免疫性疾病等疾病的患者被排除。本研究获得复旦大学附属眼耳鼻喉科医院伦理委员会批准(批准号:2023伦审字第2022152-1号),并取得患者书面知情同意。

ECRSwNP与non-ECRSwNP的判定基于高倍视野下嗜酸性粒细胞占总炎性细胞的比例: $\geq 10\%$ 定义为ECRSwNP; $< 10\%$ 为non-ECRSwNP。患者信息见表1。

表1 患者信息

Tab 1 Patient information

Information	Control	CRSsNP	ECRSwNP	non-ECRSwNP
Sample size	10	5	10	12
Age (y)	18-63	18-60	19-68	19-68
Gender (Male/Female)	4/6	3/2	6/4	7/5
Combined allergic rhinitis	1	0	2	1
Combined asthma	0	0	2	0

样本处理 采集样本后用无菌生理盐水清洗掉组织表面的血液/脓液,部分组织置于4%多聚甲醛中固定保存,后续进行免疫组化染色;将部分组织剪碎后置于Trizol[爱必信(上海)生物科技有限公司]中,储存于 -80°C 冰箱,后续用于RT-qPCR。

实时荧光定量PCR(RT-qPCR)及引物 将保存于Trizol中的组织样本提取RNA。利用HyperScript

III SuperMix for Qpcr with gDNA Remover 逆转录试剂盒[新贝(上海)生物科技有限公司]将RNA逆转成cDNA。采用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)配制反应体系,在LightCycler 4800II荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)上进行RT-qPCR检测。引物序列见表2。

表2 RT-qPCR引物序列

Tab 2 RT-qPCR primer sequences

Primer name	Primer sequences (5'→3')
Human GAPDH-forward	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
Human GAPDH-reverse	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
Human LPO-forward	CTCTTTCTCCGCGAGCATAAC
Human LPO-reverse	AATGGGTAGGTAGTCCCTAAAGG
Mouse- β -actin-forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
Mouse- β -actin-reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Mouse-LPO-forward	GCCAGCGATGATCCAACCTG
Mouse-LPO-reverse	CGGGTGCTATGTATCTTGGTTGT

免疫组化染色 免疫组化参照文献[22]中的方法并略作优化。将组织用石蜡包埋后切成 $4\ \mu\text{m}$ 薄片,制备石蜡切片。切片经 62°C 烤片1h、常规脱蜡水化处理后,置于Tris-EDTA缓冲液中进行抗原修复。切片以5%BSA封闭后,滴加LPO一抗(1:100,美国赛默飞世尔科技公司), 4°C 孵育过夜。PBS洗涤后,滴加HRP标记的二抗, 37°C 孵育

30 min。再次PBS洗涤后以DAB显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,最后经常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明化处理并用中性树胶封片。

单细胞RNA测序数据分析方法 两套单细胞转录组测序数据(美国人群:6例CRSsNP与6例CRSwNP;中国人群:5例健康对照组、5例CRSsNP、5例non-CRSwNP、6例ECRSwNP)分别

经 Cell Ranger (10×平台)或作者原始脚本转换为基因-细胞计数矩阵。随后在 R 4.4.1 中使用 Seurat 5.2.1 统一处理:剔除“检测基因数<200”或“线粒体转录占比>15%”的低质量细胞,并移除唯一分子标识符(unique molecular identifier, UMI)总数>12 000的潜在双细胞;同时过滤在少于3个细胞中表达的低丰度基因。数据采用 LogNormalize(scale factor=10 000)完成归一化及对数转换,提取约2 000个高变基因;经 ScaleData 缩放后直接进行 PCA 分析(前30个主成分),根据 Elbow Plot 选取前20个主成分构建邻接图并执行 Louvain 聚类,t分布随机邻域嵌入(t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE)和统一流形逼近与投影(uniform manifold approximation and projection, UMAP)用于可视化。细胞类型按文献标记基因手动注释,可视化检查未见样本来源驱动的显著聚类偏移,故未额外执行跨批次整合。

S.aureus 的培养 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) USA300 的培养及制备参考文献[23]的方法进行。将 *S. aureus* 涂布在哥伦比亚血琼脂平板(上海康美微生物技术有限公司),37℃恒温培养箱中孵育过夜,从血琼脂平板上挑取单菌落至 TSB (Tryptic Soy Broth)培养基(美国赛默飞世尔科技公司),于37℃摇床180 r/min 培养过夜。随后将菌液按照1:100的比例重新接种至新鲜 TSB 培养基中,培养至对数生长期。菌液以4 000×g 在4℃离心10 min,用 PBS 洗涤3次,然后在无菌 PBS 中重悬,浓度为 1×10^9 CFU/mL。测量吸光度(D_{600})以估算 CFU 数值,该数值在哥伦比亚血琼脂平板上培养过夜后得到验证。

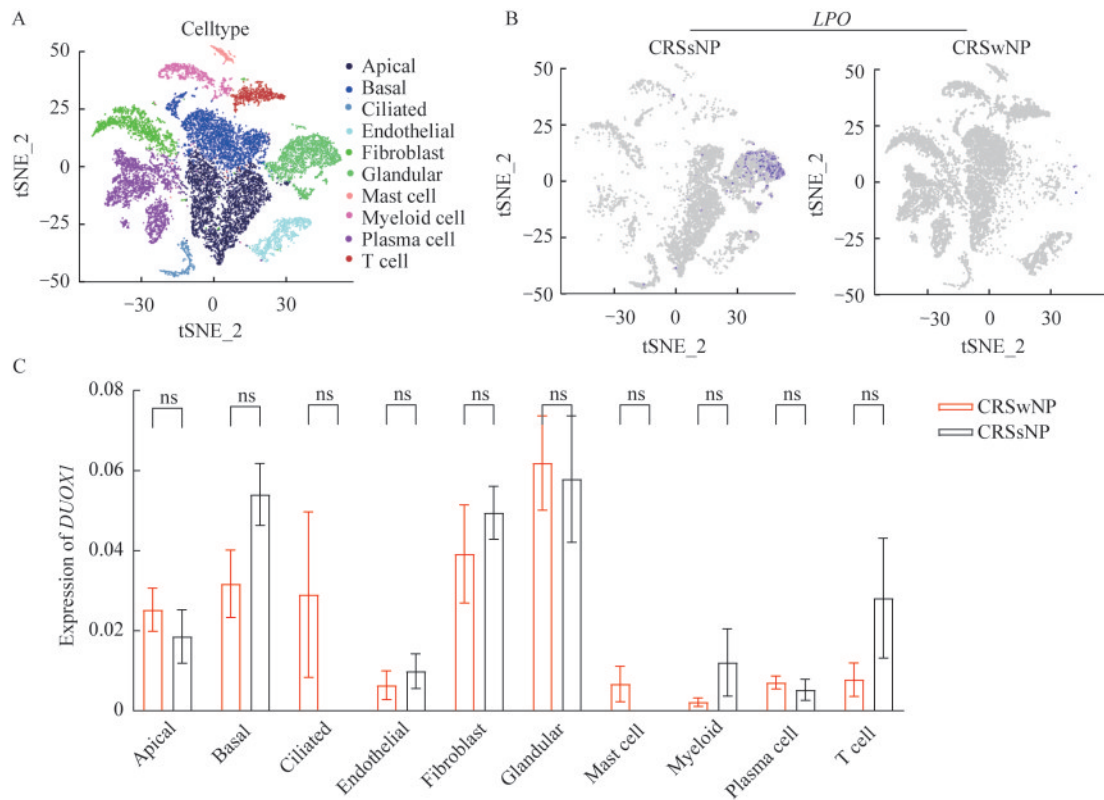
小鼠 S.aureus 鼻腔感染模型 6~8周雌性 C57BL/6 小鼠购于杭州启真实验动物科技有限公司。C57BL/6 小鼠用异氟烷麻醉后,将 1×10^9 CFU/20 μ L USA300 菌株滴入小鼠鼻腔建立感染模型。3天后取小鼠鼻黏膜组织,匀浆后涂布在血琼脂平板。37℃细菌培养箱过夜培养,对 *S. aureus* 菌落进行计数。所有动物实验均按照复旦大学上海医学院实验动物管理委员会批准(批准号:202309009S)的方案进行。

统计学分析 数据使用 Prism GraphPad10 软件进行统计分析,两组数据均以 Mean \pm SEM 的形式呈现,两组独立样本之间的差异通过非配对的 Student's *t* 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多组数据比较根据实验设计采用 One-way

或 Two-way ANOVA,并使用 Tukey 多重比较检验对组间比较进行校正。单细胞 RNA 测序数据的细胞类型比例比较:采用单细胞关联的混合效应模型(mixed-effects modeling of associations of single cells, MASC)方法,即基于混合效应逻辑回归评估组别对目标细胞群比例的影响,并将样本设为随机截距以控制个体间差异;多重比较的 *P* 值按 Benjamini-Hochberg 方法进行 FDR 校正。对于 LPO 表达量和上皮黏腺体细胞比例的相关性分析,采用普通最小二乘法(ordinary least squares, OLS)简单线性回归模型。首先分别对4个亚型(Control、CRSsNP、ECRSwNP、non-ECRSwNP)的数据拟合回归线,并使用 extra-sum-of-squares *F* 检验比较斜率与截距;结果显示4条回归线无显著差异(*F* 检验 $P > 0.15$),说明各亚型可视为同一总体的子样本。在此前提下,我们使用整体拟合单一直线模型(共同斜率、共同截距)将4组样本合并为一条 OLS 回归线,计算并报告整体斜率 β 、截距 α 、决定系数 R^2 及其 95% CI,从而检验 LPO 表达量与腺体细胞比例的相关性。

结 果

LPO 主要定位于上皮腺体细胞且在鼻息肉中表达下调 基于 Ordovas-Montanes 等^[21]报道的单细胞转录组测序数据,通过 t-SNE 可视化与无监督 Louvain 聚类方法对细胞分群,识别出基底细胞(basal cells, KRT5)、顶端细胞(apical cells, KRT8)、纤毛细胞(ciliated cells, FOXJ1)、腺体细胞(glandular cells, LTF)、内皮细胞(endothelial cells, DARC)、成纤维细胞(fibroblasts, COL1A2)、浆细胞(plasma cells, CD79A)、髓系细胞(myeloid cells, HLA DRA)、T 细胞(T cells, TRBC2)以及肥大细胞(mast cells, TPSAB1)(图 1A)。LPO 主要表达于上皮腺体细胞,在 CRSwNP 鼻息肉中的表达低于 CRSsNP 非息肉对照组织(图 1B)。LPO 利用 H_2O_2 催化 SCN^- 氧化为 $OSCN^-$ 发挥抗菌功能,双氧化酶(DUOX1 和 DUOX2)负责气道上皮 H_2O_2 的产生。进一步分析显示,鼻黏膜上皮主要表达 DUOX1,其在鼻息肉与对照组织之间的表达无显著差异(图 1C)。以上结果显示来源于上皮腺体细胞的 LPO 在鼻息肉中的表达下调,而调控其底物 H_2O_2 生成的 DUOX1 未见改变。



A: The t-SNE graph shows the cell clustering of the nasal mucosa tissues; B: The t-SNE graph shows the expression of *LPO* in nasal polyp tissues and control nasal mucosa; C: The expression of *DUOX1* in different cells. ns: Not significant. (Based on single-cell sequencing data of the American population).

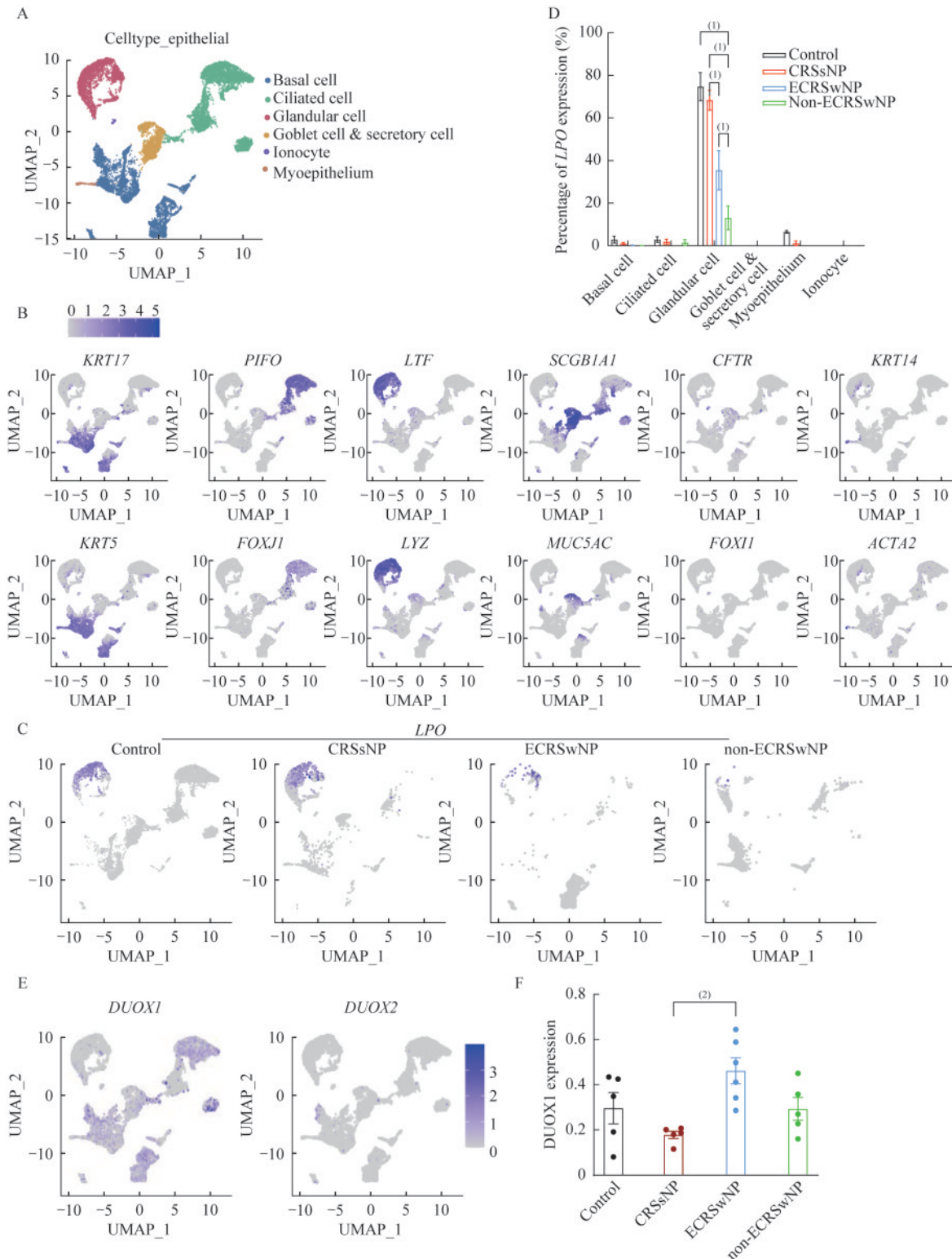
图1 LPO及DUOX1在鼻息肉及对照组织中的表达

Fig 1 The expression of LPO and DUOX1 in nasal polyps and control tissues

LPO在中国人鼻息肉中表达下调且与DUOX1表达不相关 既往研究^[24]显示,尽管ECRSwNP与非-ECRSwNP鼻息肉组织中微生物群有重叠,但几种致病菌丰度存在显著差异,尤其 *S. aureus* 在非-ECRSwNP中的丰度最高。Ordovas-Montanes等^[21]的研究主要聚焦2型免疫对鼻黏膜细胞组成及状态的影响,选取的鼻息肉样本来自阿司匹林耐受型CRSwNP患者及阿司匹林加重型呼吸系统疾病(aspirin-exacerbated respiratory disease, AERD)患者,但未按ECRSwNP/non-ECRSwNP严格分型。为提高分型精度,我们采用Wang等^[20]报道的中国人数据库分析LPO的表达。首先通过UMAP可视化与无监督聚类,对 *KRT8⁺EPCAM⁺* 上皮细胞重新聚类并注释,分出基底细胞(*KRT5*, *TP63*)、杯状/分泌细胞(*MUC5AC*, *SCGB1A1*)、纤毛细胞(*PIFO*, *FOXJ1*)、腺体细胞(*LYZ*, *LTF*)、离子细胞(*CFTR*, *FOXI1*)及肌上皮细胞(*ACTA2*, *KRT14*) (图2A、2B)。结果同样显示LPO主要由上皮腺

体细胞产生,其在CRSwNP与健康组鼻黏膜间表达无显著差异,而在鼻息肉组织中显著下调,尤其在非-ECRSwNP鼻息肉组织中的表达最低(图2C、2D)。同时我们分析了双氧化酶在中国人鼻黏膜中的表达特点,发现中国人鼻黏膜主要表达DUOX1,其在ECRSwNP鼻息肉上皮细胞中的表达显著高于CRSwNP组鼻黏膜上皮细胞,但整体与LPO表达水平不相关(图2E、2F)。上述结果提示LPO的表达强度与息肉形成呈负相关,与DUOX1的表达无显著相关性。

LPO表达水平与黏膜下腺体细胞比例的关系 鼻上皮黏膜下腺体增生常见于CRSwNP患者,但在鼻息肉组织中很少见^[12]。基于不同类型鼻黏膜组织的单细胞测序数据,我们采用MASC比较腺体细胞的比例,结果显示其在CRSwNP患者与健康对照组鼻黏膜中无显著差异,而在非-ECRSwNP组鼻息肉中显著低于CRSwNP鼻黏膜组织。LPO在各组中的表达趋势与腺体细胞的比例成正相关



A: The UMAP graph shows the cell type of the nasal epithelial cells; B: Feature plot of epithelial cell marker genes; C: The expression of *LPO* in different nasal epithelial cells; D: Statistical graph shows the expression of *LPO*; E: The expression of *DUOX1* and *DUOX2* in nasal epithelial cells; F Statistical graph shows the expression of *DUOX1* in nasal epithelial cells. ⁽¹⁾ $P < 0.0001$, ⁽²⁾ $P < 0.01$. (Based on single-cell sequencing data of the Chinese population)

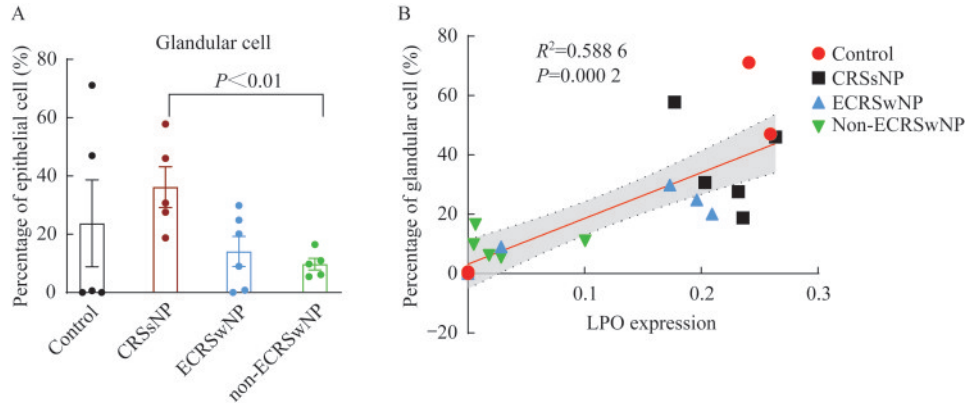
图2 LPO及双氧化酶在鼻息肉组织及对照鼻黏膜组织中的表达

Fig 2 The expression of LPO and DUOX in nasal polyps and control mucosa

(图3)。需要说明的是,图3B个别样本腺体细胞比例为0时,其LPO表达水平亦为0,并与坐标原点重合而不呈现为独立散点。因此,LPO下调反映黏膜下腺体细胞数量的显著减少,提示LPO可作为反映黏膜下腺体细胞数量的指标。

鼻息肉组织中黏膜下腺体数量减少伴随LPO蛋白表达下调 RT-qPCR结果显示,鼻息肉组织LPO mRNA水平低于正常对照组(图4A)。免疫组

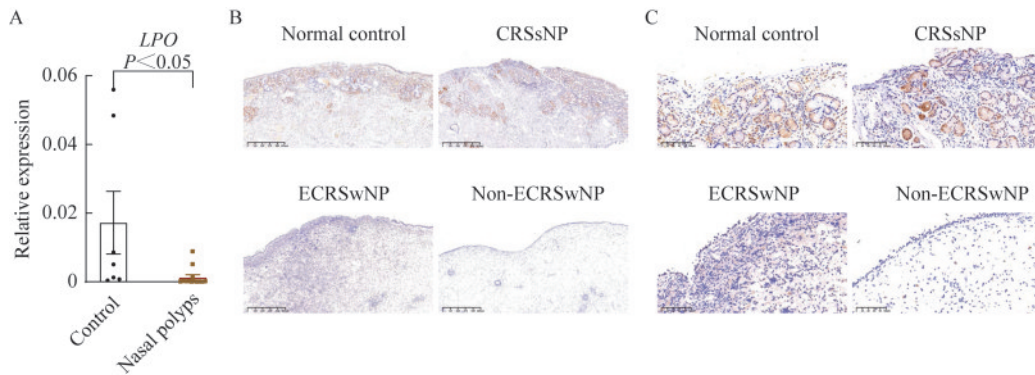
化结果显示,LPO在黏膜下腺体呈强阳性表达,在上皮细胞呈中等程度表达,其在鼻息肉中的表达低于正常对照组及CRSsNP患者鼻黏膜,且在non-ECRSwNP中表达最低(图4B、4C)。同时,鼻息肉黏膜下腺体细胞显著低于非息肉鼻黏膜组织(图4B、4C)。以上结果提示黏膜下腺体是鼻黏膜组织中LPO的主要来源,鼻息肉组织中腺体及LPO的表达均低于非息肉鼻黏膜组织。



A: The percentage of glandular cells in epithelial cells; B: The correlation of LPO expression and percentage of glandular cells.

图3 LPO表达与腺体细胞百分比相关性分析

Fig 3 Correlation analysis of LPO expression and percentage of glandular cells



A: LPO mRNA expression using RT-qPCR; B and C: LPO expression using IHC staining and healthy control tissues. Scale: 625 μ m (B) and 100 μ m (C).

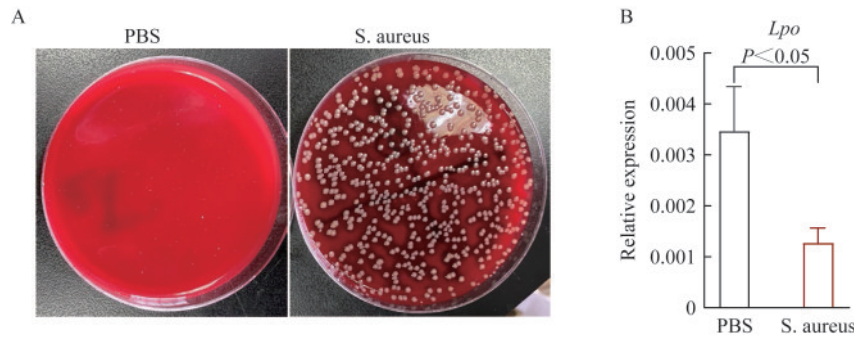
图4 LPO在鼻息肉组织与对照组织中的mRNA及蛋白水平

Fig 4 The mRNA and protein levels of LPO in nasal polyp tissues

S.aureus可下调鼻黏膜LPO表达 利用小鼠鼻腔感染模型研究*S. aureus*是否影响鼻黏膜LPO的表达。结果显示感染后第3天,小鼠鼻黏膜可见大量*S. aureus*定植(图5A),同时LPO表达显著低于对照组(图5B)。以上结果表明LPO的表达受*S. aureus*的负向调控。基于此,我们提出鼻黏膜*S. aureus*-LPO双向调控假说:LPO降低削弱鼻黏膜抗菌功能,有利于*S. aureus*定植;*S. aureus*定植又进一步抑制LPO表达,形成病理环路加速息肉进展(图6)。

讨 论

本研究基于美国及中国人群鼻黏膜单细胞转录组测序数据并结合动物模型,主要得出以下结论:(1)LPO主要来源于鼻黏膜上皮腺体细胞;(2)LPO在美国及中国人群鼻息肉组织中表达下调,且与腺体细胞的比例呈正相关;(3)non-ECRSwNP鼻息肉中LPO表达最低;(4)小鼠鼻腔



A: The colonization of *Staphylococcus aureus* in nasal mucosa using the Columbiaagar blood plate; B: Statistical analysis of *Lpo* expression.

图5 *S.aureus*感染下调鼻黏膜LPO的基因表达水平

Fig 5 *S. aureus* infection down-regulates the gene expression level of LPO in nasal mucosa

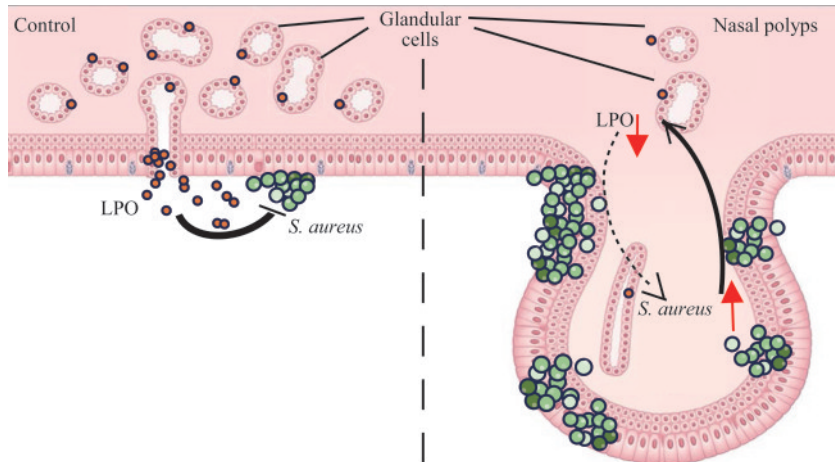


图6 鼻息肉中LPO与*S. aureus*双向调控的假设模型

Fig 6 Proposed model of bidirectional regulation of LPO and *S. aureus* in nasal polyps

感染模型显示 *S. aureus* 可下调鼻黏膜LPO表达,提示细菌可能通过抑制黏膜屏障功能促进自身定植,基于此我们提出 *S. aureus*-LPO双向调控假说。

鼻黏膜先天防御屏障的破坏在 CRSwNP 的发病机制中发挥重要作用,大量研究显示 CRSwNP 患者鼻息肉组织中多种抗菌蛋白(S100A8/9、PLUNC 等)表达下调^[25]。本研究聚焦于LPO,作为呼吸道先天免疫防御 LPO-H₂O₂-SCN⁻系统的核心组分,其在正常人呼吸道分泌物中已被证实具有重要的抗菌功能^[17],但目前为止关于LPO在鼻息肉组织中的表达模式系统性的研究极少。本研究基于美国及中国人群鼻息肉及对照非息肉鼻黏膜组织的单细胞转录组测序数据,明确揭示了LPO主要来源于鼻黏膜上皮腺体细胞。两套单细胞测序数据一致性显示,美国与中国人群鼻息肉组织中LPO的表达水平均显著低于非息肉对照鼻黏膜组织,这一结果与既往有限的研究发现相互印证^[19,26]。研究^[27]发现 CRSwNP 患者鼻腔中 *S. aureus* 的定植率显著升高,

S. aureus 能够通过分泌肠毒素等因子损伤上皮屏障完整性,诱导黏膜产生氧化应激和炎症反应,从而加重疾病进程。LPO表达下调意味着黏膜屏障抗菌功能的减弱。

研究发现鼻息肉的发生与氧化应激与抗氧化防御系统的失衡相关^[29],CRSwNP患者鼻腔分泌物中H₂O₂的含量上升。本研究发现鼻息肉双氧化酶DUOX1的表达不低于非息肉鼻黏膜组织,甚至在中国 ECRSwNP 患者鼻息肉中的表达显著高于 ECRSwNP 患者鼻黏膜组织,这可能会引起息肉组织中H₂O₂含量的上升。而鼻息肉组织中LPO表达下调,会使气道H₂O₂不能及时转化为 OSCN⁻,削弱了黏膜抗菌功能,另一方面过量H₂O₂会引起黏膜损伤及慢性炎症。因此,LPO在维持黏膜屏障稳态中也发挥重要作用。鉴于LPO在气道黏膜防御中的重要作用,增强LPO介导的抗菌通路可作为应对呼吸道感染、增强黏膜屏障功能的潜在策略。有研究发现 CRSwNP 患者经全身糖皮质激素治疗后能够

显著上调鼻组织 LPO 表达水平^[28],这提示 LPO 在 CRSwNP 鼻息肉的表达下调是可以被逆转的,其恢复与炎症缓解及黏膜屏障功能改善相关。

本研究发现 LPO 主要由鼻黏膜上皮腺体细胞产生,其表达与黏膜下腺体的数量呈正相关,提示 LPO 的表达水平可作为反映鼻黏膜下腺体数量及功能状态的潜在生物标志物。既往研究发现鼻息肉形成过程中伴随黏膜下腺体显著减少,削弱了黏膜屏障分泌抗菌肽等防御因子的功能^[12],也损害了黏膜层对病原菌和吸入颗粒的清除功能^[30]。这提示 LPO 可能是腺体相关抗菌轴的重要组成部分,其也可作为黏膜屏障是否受损的指标。

LPO 产生的 OSCN⁻对呼吸道常见细菌(例如 *S. aureus*)定植具有明显的抑制作用。*S. aureus* 的致病性与其逃逸宿主免疫清除的能力相关,其进化出多种机制对抗宿主的抗菌功能,例如其通过表达黏附蛋白和毒素可逃避或抑制宿主抗菌肽^[31]。虽然 LPO-H₂O₂-SCN⁻抗菌系统对 *S. aureus* 具有直接杀伤作用,但该菌可通过表达过氧化氢酶等酶分子分解 H₂O₂来对抗该系统^[32]。研究发现 *S. aureus* 能够表达一种黄素蛋白二硫还原酶 MerA,将宿主产生的 HOSCN 还原为无毒的硫氰酸根,从而抵抗 OSCN⁻的抗菌功能^[33]。本研究中构建的小鼠 *S. aureus* 鼻腔感染模型结果显示 *S. aureus* 感染本身可显著抑制 LPO 的表达,提供了一种 *S. aureus* 抵抗宿主抗菌系统的新机制,提示在鼻黏膜中存在 *S. aureus* “定植-抑制-再定植”的正反馈环路。

本研究存在以下不足:(1)缺少对 LPO 抗菌活性的直接测定。LPO 表达水平的下降仅提示 LPO-H₂O₂-SCN⁻抗菌系统潜能的降低,但实际 LPO 催化活性还与底物(SCN⁻)供给,H₂O₂的生成及髓过氧化物酶 MPO/EPO 的竞争等因素相关,有关 LPO-H₂O₂-SCN⁻抗菌系统在鼻息肉发病过程中的具体作用及机制还需要开展功能性实验并结合细菌组学与免疫分型,以及增加样本量等来进行进一步的研究。(2)尚未明确 *S. aureus* 抑制 LPO 表达的具体分子机制。(3)样本量有限,有关 LPO 参与腺体抗菌轴的推断还需在更大规模的队列中进行验证。

本研究我们提出“*S. aureus*-LPO 双向调控”假设:腺体细胞-LPO 轴表达下调能够损伤鼻黏膜屏障功能,使 *S. aureus* 更易定植,而定植的 *S. aureus* 能够进一步抑制 LPO 的表达,推动鼻息肉尤其是 non-

ECRSwNP 的微生态-炎症失衡。该框架串联了上皮重构、抗菌蛋白与细菌定植,为鼻息肉分型化管理与潜在复发风险检测提供了备选指标,靶向 LPO 介导的黏膜抗菌屏障恢复,有望为 CRSwNP 的防治提供新的策略。

作者贡献声明 韩苗苗 实验设计,数据分析,论文撰写。李睿哲 单细胞数据分析。曹清收集标本,单细胞数据分析。姜鸿飞 论文撰写和修订。何睿,李华斌 实验设计,论文指导。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] SEDAGHAT AR, KUAN EC, SCADDING GK. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: prevalence and risk factors [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2022, 10(6): 1395-1403.
- [2] ALBU S. Chronic rhinosinusitis-an update on epidemiology, pathogenesis and management [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(7):2285.
- [3] GUO CL, LU RY, WANG CS, et al. Identification of inflammatory endotypes by clinical characteristics and nasal secretion biomarkers in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Int Arch Allergy Imm*, 2023, 184(10):955-965.
- [4] STEVENS WW, SCHLEIMER RP, KERN RC. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2016, 4(4):565-572.
- [5] COPE EK, GOLDBERG AN, PLETCHER SD, et al. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1):53.
- [6] VICKERY TW, RAMAKRISHNAN VR, SUH JD. The role of *Staphylococcus aureus* in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2019, 19(4):21.
- [7] KIM YM, JIN J, CHOI JA, et al. Enterotoxin B-induced endoplasmic reticulum stress response is associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(1-2):96-103.
- [8] PATOU J, GEVAERT P, VAN ZELE T, et al. Enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps[J]. *J Allergy Clin Immun*, 2008, 121(1): 110-115.
- [9] DENNIS DP. Chronic sinusitis: defective T-cells

- responding to superantigens, treated by reduction of fungi in the nose and air[J].*Arch Environ Health*, 2003, 58(7): 433-441.
- [10] BACHERT C, GEVAERT P, HOLTAPPELS G, *et al.* Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation[J].*J Allergy Clin Immunol*, 2001, 107(4): 607-614.
- [11] XU ZF, YAN JY, WEN WP, *et al.* Pathophysiology and management of *Staphylococcus aureus* in nasal polyp disease[J].*Expert Rev Clin Immunol*, 2023, 19(8): 981-992.
- [12] SCHLEIMER RP. Immunopathogenesis of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis [J].*Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 331-357.
- [13] KATO A, SCHLEIMER RP, BLEIER BS. Mechanisms and pathogenesis of chronic rhinosinusitis [J].*J Allergy Clin Immunol*, 2022, 149(5): 1491-1503.
- [14] VAN CROMBRUGGEN K, VOGL T, PEREZ-NOVO C, *et al.* Differential release and deposition of S100A8/A9 proteins in inflamed upper airway tissue [J].*Eur Respir J*, 2016, 47(1): 264-274.
- [15] SESHADRI S, LIN DC, ROSATI M, *et al.* Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis [J].*Allergy*, 2012, 67(7): 920-928.
- [16] TIEU DD, PETERS AT, CARTER RG, *et al.* Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis [J].*J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(3): 667-675.
- [17] WIJKSTROM-FREI C, EL-CHEMALY S, ALIRACHEDI R, *et al.* Lactoperoxidase and human airway host defense [J].*Am J Respir Cell Molecular Biol*, 2003, 29(2): 206-212.
- [18] BJORCK L, ROSEN C, MARSHALL V, *et al.* Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria [J].*Appl Microbiol*, 1975, 30(2): 199-204.
- [19] TSAI YJ, HSU YT, MA MC, *et al.* Transcriptomic analysis of genes associated with oxidative stress in chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps: identifying novel genes involved in nasal polyposis [J].*Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(10): 1899.
- [20] WANG W, XU Y, WANG L, *et al.* Single-cell profiling identifies mechanisms of inflammatory heterogeneity in chronic rhinosinusitis [J].*Nat Immunol*, 2022, 23(10): 1484-1494.
- [21] ORDOVAS-MONTANES J, DWYER DF, NYQUIST SK, *et al.* Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells [J].*Nature*, 2018, 560(7720): 649-654.
- [22] CAO Y, HU X, ZHOU C, *et al.* Increased IL-1alpha expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J].*Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2023, 280(3): 1209-1217.
- [23] CHEN Y, SONG Y, WANG Z, *et al.* The chemerin-CMKLR1 axis in keratinocytes impairs innate host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection [J].*Cell Mol Immunol*, 2024, 21(6): 533-545.
- [24] FENG T, MIAO P, LIU B, *et al.* Sinus microbiota in patients with eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J].*Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 672355.
- [25] VIKSNE RJ, SUMERAGA G, PILMANE M. Antimicrobial and defense proteins in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J].*Medicina (Kaunas)*, 2023, 59(7): 1259.
- [26] JO A, CHOI TG, HAN JY, *et al.* Age-related increase of collagen/fibrin deposition and high PAI-1 production in human nasal polyps [J].*Front Pharmacol*, 2022, 13: 845324.
- [27] CHEGINI Z, DIDEHDAR M, KHOSH BAYAN A, *et al.* The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis [J].*Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 29.
- [28] WORKMAN AD, MIYAKE MM, NOCERA AL, *et al.* Unexpected effects of systemic steroids on the CRSwNP proteome: is protein upregulation more important than inhibition? [J].*Int Forum Allergy Rh*, 2020, 10(3): 334-342.
- [29] TAI J, SHIN JM, PARK J, *et al.* Oxidative stress and antioxidants in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J].*Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(1): 195.
- [30] NNABUE OE, PLETCHER SD, GURROLA JG, *et al.* Septum submucosal glands exhibit aberrant morphology and reduced mucin production in chronic rhinosinusitis [J].*Int Forum Allergy Rhinol*, 2021, 11(10): 1443-1451.
- [31] KAWADA-MATSUO M, LE MNT, KOMATSUZAWA H. Antibacterial peptides resistance in *Staphylococcus aureus*: various mechanisms and the association with pathogenicity [J].*Genes*, 2021, 12(10): 1527.
- [32] CONNER GE, WIJKSTROM-FREI C, RANDELL SH, *et al.* The lactoperoxidase system links anion transport to host defense in cystic fibrosis [J].*FEBS Letters*, 2007, 581(2): 271-278.
- [33] SHEARER HL, LOI VV, WEILAND P, *et al.* MerA functions as a hypothiocyanoic acid reductase and defense mechanism in *Staphylococcus aureus* [J].*Molecul Microbiol*, 2023, 119(4): 456-470.