

藏红花素在嗜酸性慢性鼻窦炎伴鼻息肉中调控 2 型炎症反应的研究

张婕^{1,2}, 尼玛吉宗², 徐小东³, 周菁⁴, 刘建敏⁴, 罗依蕤^{1,2}, 杜进涛⁴, 巴罗^{1,2}

1. 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850000
2. 西藏自治区人民医院 耳鼻咽喉科, 西藏 拉萨 850000
3. 山南市人民医院 耳鼻咽喉科, 西藏 山南 856000
4. 四川大学华西医院 耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610000

摘要:目的 探讨藏红花素在嗜酸性粒细胞性慢性鼻窦炎伴鼻息肉 (eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, Eos CRSwNP) 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 2 型炎症反应中的调控作用和作用机制, 为精准治疗鼻息肉提供新的靶点或通路。方法 收集慢性鼻窦炎伴鼻息肉 (chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSwNP) 患者鼻息肉组织进行病理学诊断, 根据炎症细胞类型分为嗜酸性粒细胞性慢性鼻窦炎伴鼻息肉 (eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, Eos CRSwNP) 和非嗜酸性粒细胞性慢性鼻窦炎伴鼻息肉 (non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps, Non-Eos CRSwNP)。密度梯度离心法提取 Eos CRSwNP 患者外周血中的 PBMC。用不同浓度 IL-33 刺激 PBMC, qPCR 检测转录因子 GATA3、T-bet 和细胞受体 CRTH2, qPCR 和 ELISA 分析炎症细胞因子 INF- γ , IL-5 和 IL-13 的表达情况。再加入不同浓度藏红花素进行干预, Western blotting 和 qPCR 检测 GATA3、T-bet 和 CRTH2。Graphpad prism 软件进行统计分析, 对比 IL-33 刺激前后、藏红花素干预前后指标变化有无显著差异。结果 共有 16 例经病理学确诊为 Eos CRSwNP。不同浓度的 IL-33 刺激 PBMC 后, qPCR 证实 T-bet、GATA3 和 CRTH2 的表达有明显升高 (P 值分别为 0.004、0.001、0.026); qPCR 和 ELISA 进一步发现 INF- γ , IL-5 和 IL-13 等细胞因子上调 (qPCR 的 P 值分别为 0.001、0.001、0.003; ELISA 的 P 值分别为 0.035、0.006、0.001), 其中 IL-33 浓度为 20 ng/mL 时对 PBMC 炎症细胞活化最为明显。再加入藏红花素干预后, Western blotting 和 qPCR 检测显示 T-bet、GATA3 和 CRTH2 表达呈下降趋势, 且在浓度为 10 μ g/mL 时最为明显 (WB 的 P 值分别为 0.027、0.001、0.002; qPCR 的 P 值分别为 0.019、0.001、0.001)。结论 藏红花素能够显著抑制 IL-33 激活的 CRSwNP 患者内的 2 型炎症反应, 具有潜在的 CRSwNP 新型治疗药物开发价值。

关键词:慢性鼻窦炎; 鼻息肉; 嗜酸性粒细胞; 外周血单个核细胞; 藏红花素; 2 型炎症反应

中图分类号: R765.41; R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2025)01-0061-07

引用格式: 张婕, 尼玛吉宗, 徐小东, 等. 藏红花素在嗜酸性慢性鼻窦炎伴鼻息肉中调控 2 型炎症反应的研究 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2025, 39(1): 61-68. ZHANG Jie, NIMA Jizong, XU Xiaodong, et al. Effect of Crocin on Type 2 inflammation in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(1): 61-68.

Effect of Crocin on Type 2 inflammation in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps

ZHANG Jie^{1,2}, NIMA Jizong², XU Xiaodong³, ZHOU Jing⁴, LIU Jianmin⁴, LUO Yirui^{1,2}, DU Jintao⁴, BA Luo^{1,2}

1. Medical College of Tibet University, Lasa 850000, Xizang, China
2. Department of Otorhinolaryngology, People's Hospital of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, Xizang, China
3. Department of Otolaryngology, Shannan City People's Hospital, Shannan 856000, Xizang, China
4. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: Objective To study the effect of crocin on Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps, the regulatory role and mechanism of Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) type 2 inflammation in patients with Eos CRSwNP, providing a new target or pathway for precise treatment of nasal polyps. **Methods** Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) patients were collected for pathological diagnosis. Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (Eos CRSwNP) and Non-eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (Non-Eos CRSwNP) were classified according to the inflammatory cell types.

收稿日期: 2024-01-13

基金课题: 国家自然科学基金 (81860186); 西藏自治区中央引导地方科技发展资金项目 (ZYYD2023000133)

通信作者: 巴罗。E-mail: bhanor@163.com

PBMC in peripheral blood of Eos CRSwNP patients was extracted by density gradient centrifugation. PBMC was stimulated with different concentrations of IL-33, and transcription factors GATA3, T-bet, and cell receptor CRTH2 were detected by qPCR. The expression of inflammatory cytokines INF- γ , IL-5, and IL-13 was analyzed by qPCR and ELISA. Then different concentrations of crocin were added for intervention, and GATA3, T-bet, and CRTH2 were detected by Western blotting and qPCR. GraphPad Prism software was used for statistical analysis to compare whether there were significant differences in index changes before and after IL-33 stimulation and crocin intervention. **Results** A total of 16 cases were pathologically confirmed as Eos CRSwNP. After stimulating PBMC with different concentrations of IL-33, qPCR confirmed that the expression of T-bet, GATA3, and CRTH2 was significantly increased (P values were 0.004, 0.001, and 0.026, respectively). qPCR and ELISA further revealed upregulation of cytokines INF- γ , IL-5, and IL-13 (P values of qPCR were 0.001, 0.001, and 0.003, respectively; P values of ELISA were 0.035, 0.006, and 0.001, respectively), with the most significant activation of PBMC inflammatory cells observed at an IL-33 concentration of 20 ng/mL. After intervention with crocin, Western blotting and qPCR showed a downward trend in the expression of T-bet, GATA3, and CRTH2, with the most significant effect observed at a concentration of 10 μ g/mL (P values of WB were 0.027, 0.001, and 0.002, respectively; P values of qPCR were 0.019, 0.001, and 0.001, respectively). **Conclusion** Crocin can significantly inhibit type 2 inflammation in IL-33-activated CRSwNP patients and has potential value in the development of new therapeutic drugs for CRSwNP.

Key words: Chronic rhinosinusitis; Nasal polyps; Eosinophils; Peripheral blood mononuclear cells; Crocin; Type 2 inflammatory effect

慢性鼻窦炎 (chronic rhinosinusitis, CRS) 表现为鼻窦黏膜的慢性炎症反应,伴鼻息肉的 CRS 患者往往需要手术治疗,而其中嗜酸性鼻息肉属于难治性鼻息肉^[1],病理上以 2 型炎症反应为特征,包括辅助型 T 细胞 2 (T helper 2 cell, Th2) 和 2 型先天性淋巴细胞 (type 2 innate lymphoid cell, ILC2) 等,组织学表现为在鼻息肉组织中大量募集嗜酸性粒细胞浸润,临床上表现为手术后易复发,缺乏有效的治疗方法。藏红花素提取自传统藏药材藏红花,是藏红花最主要的药效成分。现代研究从药理基础到临床试验已经证实^[2-3],藏红花素可以通过多种信号通路抑制下气道炎症反应。变应性鼻炎患者使用藏红花活性成分鼻喷剂后可抑制鼻黏膜充血扩张和腺体分泌,从而改善患者鼻塞、流涕等临床症状^[2]。此外,动物模型结果显示藏红花素通过降低 T-bet/GATA-3 以及 mir-146a 和 mir-106a 表达水平来抑制卵蛋白诱导的过敏性气道炎症和高反应性^[3]。但藏红花素在嗜酸性慢性鼻窦炎伴鼻息肉中的作用效果尚不清楚。基于此,本研究旨在探索藏红花素在 Eos CRSwNP 2 型炎症反应中可能存在的调控作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究纳入 16 例在西藏自治区人民医院耳鼻喉头颈外科进行鼻内镜外科手术的 Eos CRSwNP 患者。研究经西藏自治区人民医院伦理委员会批准 (编号:ME-TBHP-23-02),所有患者均签署知情同意书。CRSwNP 的诊断根据中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南 (2018) 中的诊断标准进行^[4]。Eos CRSwNP 的诊断根据欧洲鼻窦炎和鼻息肉意见书

中的诊断标准进行^[5]。

1.2 方法

1.2.1 外周血 PBMC 提取

PBMC 包括外周血中的淋巴细胞 (T、B、NK)、单核细胞和树突状细胞,由于采样方便、代表性强在免疫相关研究中得到广泛应用。研究者采集所有患者外周静脉血后,室温留取血样转移到无菌 EP 管中,加入 Hank's 平衡盐溶液充分混合。离心管中底层先加入 Ficoll-Paque PLUS 液,上层再缓缓加入上述稀释血液样品,使其分层,避免混合。在 18 $^{\circ}$ C ~ 20 $^{\circ}$ C 下,离心 500 $g \times 30$ min。将中间灰白色层 (淋巴细胞层) 转移到另一支离心管中,加入至少 3 倍体积的 Hank's 平衡盐溶液,吹打使其悬浮。以 400 g 速度离心 10 min,丢弃上清液,用红细胞裂解液去除红细胞,最终得到 PBMC 样本。

1.2.2 PBMC 培养和刺激

根据细胞计数结果,计算 1×10^6 PBMC 细胞所需体积,并转移到 RPMI 1640 培养基。再参照 IL-33 相关 2 型炎症反应试验报道^[6-7],设计不同浓度分组,并计算 IL-33 所需量。依次为:PBMC+空白、PBMC+IL-33 (10 ng/mL)、PBMC+IL-33 (20 ng/mL)、PBMC+IL-33 (40 ng/mL)。IL-33 刺激 72 h 后进行 qPCR 和 ELISA 试验。

参照 CRSwNP 相关干预试验报道,选取 GATA3、T-bet、细胞受体 CRTH2、炎症细胞因子 INF- γ 、IL-5、IL-13 等指标作为 IL-33 刺激 2 型炎症反应建模是否成功的验证标准。qPCR 具体方法如下:利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物并合成,Trizol RNA 提取试剂提取 PBMC 标本总 RNA,配制逆转录反应液进行 cDNA 合成,进行 qPCR 检测,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s (退火),72 $^{\circ}$ C 45 s (延

伸), 72 °C 1 min(检测荧光), 共 40 个循环, 循环结束后继续于 72 °C 延伸 5 min。

ELISA 分析上清液中炎症细胞因子 IFN- γ (1 型炎症细胞因子), IL-5 (2 型炎症细胞因子) 和 IL-13 (2 型炎症细胞因子) 的变化情况。具体方法如下: PBMC 培养基 4 °C 离心 20 min 取上清液, 反应孔中加入 100 μ L 标准品工作液及检测样本, 37 °C 孵育 90 min, 甩干, 每个反应孔中加入 100 μ L 生物素标记抗体, 37 °C 孵育 60 min, 洗涤 4 次, 每个反应孔中加入 100 μ L HRP 标记链霉亲和素, 37 °C 孵育 30 min, 洗涤 4 次, 显色 15 min, 加入终止液, 酶标仪 450 nm 测量 OD 值, 绘制标准曲线。选择 IL-33 刺激效果最明显的浓度进行后续试验, 再根据不同浓度分组计算藏红花素所需量, 加入后进行共同刺激, 分别为 PBMC+IL-33 20 ng/mL、PBMC+IL-33 20 ng/mL+藏红花素 10 μ g/mL、PBMC+IL-33 20 ng/mL+藏红花素 25 μ g/mL、PBMC+IL-33 20 ng/mL+藏红花素 50 μ g/mL。IL-33 和藏红花素共刺激 PBMC 并培养 72 h 后, 收集 PBMC 的总蛋白、提取总 RNA 进一步行 Western blotting 实验和 qPCR 定量分析。

Western blotting 实验方法如下: 配置分离胶 (10%), 加 ddH₂O 水封压, 室温下 30 min; 倒掉 ddH₂O 水, 干燥, 按表配浓缩胶, 灌胶, 缓慢插入梳子 (注意不要有气泡), 室温下 30 min; 待浓缩胶凝固后倒入电泳缓冲液, 缓慢拔出梳子。待测样品测完蛋白含量后, 用 PBS 稀释至 1 mg/mL; 取出上样

样品 15 μ L 至 1.5 mL 离心管中, 加入 2 \times Loading Buffer, 100 °C 煮样本 10 min, 振荡器混匀样品。SDS-PAGE 电泳分离后转膜, TBST 缓冲液清洗 3 次, 加入相对应的一抗, 4 °C 过夜, 清洗后加入二抗室温下孵育 1~2 h, 用 ECL 化学发光试剂显影, FUSION-CAPT analysis 软件分析条带的灰度值。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学检验分析, Graphpad Prism 9.5 进行作图分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组均数的比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。Graphpad Prism 9.5 进行作图分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-33 活化 PBMC 中的 2 型炎症反应

经过术中冰冻病理证实为 Eos CRSwNP 的患者共 16 例。在 Eos CRSwNP 患者的外周血中利用密度梯度离心法得到 PBMC, 不同浓度的 IL-33 将 PBMC 刺激 72 h 后提取总蛋白和总 RNA, 利用 qPCR 验证, 结果发现 IL-33 可以上调转录因子 T-bet、GATA3 和细胞受体 CRTH2 等的表达, 见图 1。qPCR 和 ELISA 进一步观察到 IL-33 刺激后 PBMC 中炎症细胞因子如 INF- γ , IL-5 和 IL-13 等表达上调, 其中当 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时对炎症细胞活化最为明显, 释放出更多 Th2 相关细胞因子, 且经检测 mRNA 和蛋白表达水平具有很好的一致性, qPCR 结果见图 2, ELISA 结果见图 3。

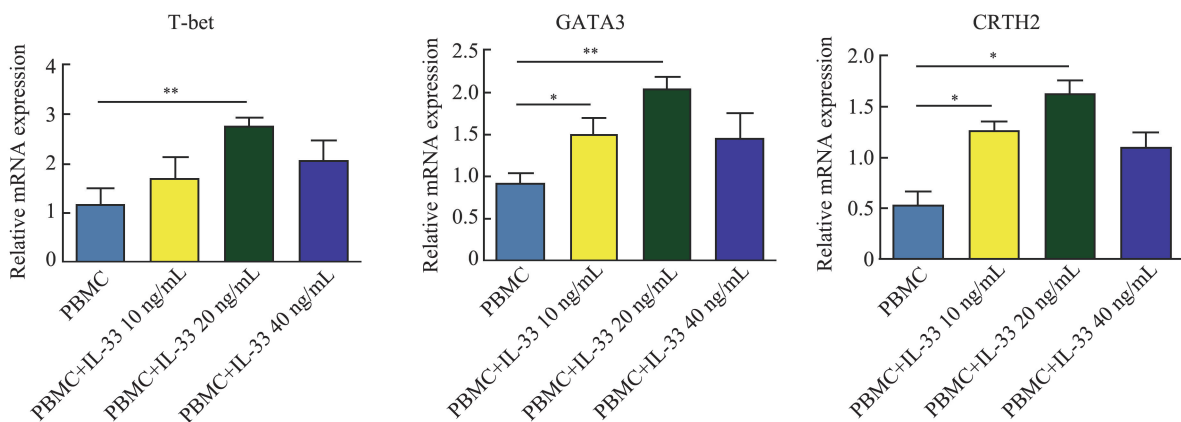


图 1 IL-33 刺激 PBMC 后细胞转录因子和细胞受体表达情况

T-bet: 加入 IL-33 后, PBMC 培养基中 T-bet 表达增加明显 ($P < 0.05$), 其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P = 0.004$); GATA3: 加入 IL-33 后, PBMC 培养基中 GATA3 表达增加明显 ($P < 0.05$), 其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P = 0.001$); CRTH2: 加入 IL-33 后, PBMC 培养基中 CRTH2 表达增加明显 ($P < 0.05$) 其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P = 0.026$)

Figure 1 Expression of transcription factors and cell receptors after IL-33 stimulation of PBMC

T-bet: After the addition of IL-33, the expression of T-bet in PBMC medium was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P = 0.004$); GATA3: After the addition of IL-33, the expression of GATA3 in PBMC medium was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P = 0.001$); CRTH2: After the addition of IL-33, the expression of CRTH2 in PBMC medium was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P = 0.026$)

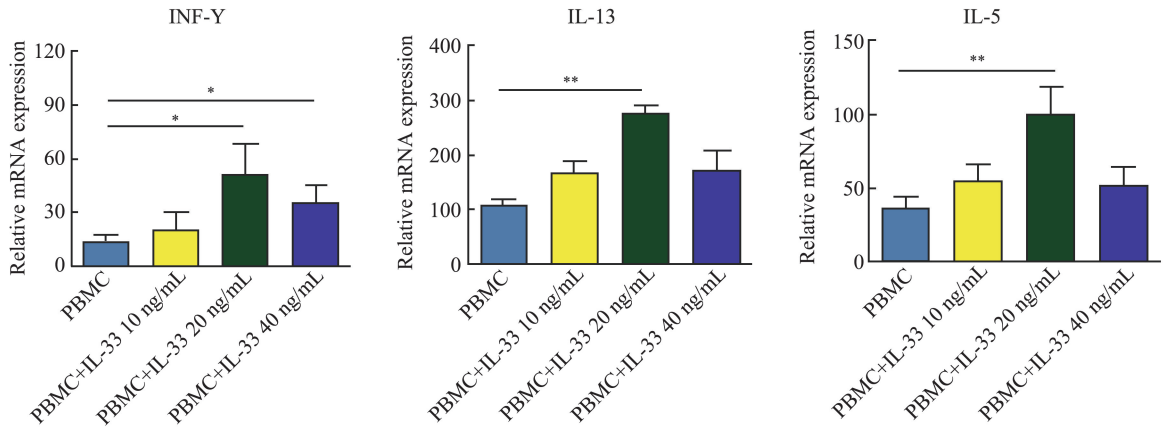


图 2 IL-33 刺激后 PBMC 中炎症细胞因子表达情况

INF-γ:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 INF-γ 表达增加明显 ($P<0.01$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.001$); IL-5:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 IL-5 表达增加明显 ($P<0.01$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.001$); IL-13:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 IL-13 表达增加明显 ($P<0.01$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.003$)

Figure 2 Expression of inflammatory cytokines in PBMC after IL-33 stimulation

INF-γ : After the addition of IL-33, the expression of INF-γ in PBMC supernatant was increased significantly ($P<0.01$), which was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.001$); IL-5: After the addition of IL-33, the expression of IL-5 in the PBMC supernatant was significantly increased ($P<0.01$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.001$); IL-13: After addition of IL-33, the expression of IL-13 in PBMC supernatant was significantly increased ($P<0.01$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.003$)

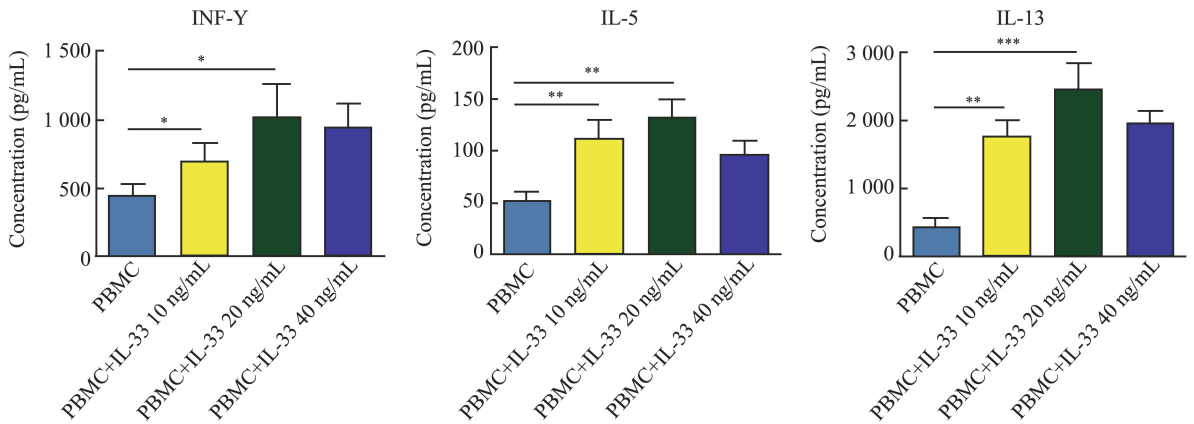


图 3 ELISA 检测 IL-33 刺激后 PBMC 中炎症细胞因子表达情况

INF-γ:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 INF-γ 表达增加明显 ($P<0.05$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.035$); IL-5:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 IL-5 表达增加明显 ($P<0.05$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.006$); IL-13:加入 IL-33 后,PBMC 上清液中 IL-13 表达增加明显 ($P<0.05$),其中在 IL-33 刺激浓度为 20 ng/mL 时最为明显 ($P=0.001$)

Figure 3 The expression of inflammatory cytokines in PBMC after IL-33 stimulation was detected by ELISA

INF-γ : After addition of IL-33, the expression of INF-γ in PBMC supernatant increased significantly ($P<0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.035$); IL-5: After addition of IL-33, the expression of IL-5 in PBMC supernatant increased significantly ($P<0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.006$); IL-13: After addition of IL-33, the expression of IL-13 in PBMC supernatant increased significantly ($P<0.05$), and the expression was most obvious when the stimulation concentration of IL-33 was 20 ng/mL ($P=0.001$)

2.2 藏红花素抑制 IL-33 活化后的 PBMC 中的 2 型炎症反应

为了探究藏红花素的抗炎作用,我们进一步将藏红花素与 IL-33 在 PBMC 中共刺激 72 h,对

PBMC 行 Western blotting 和 qPCR 检测,结果显示藏红花素处理组 T-bet、GATA3 和 CRTH2 等蛋白和 mRNA 表达呈下降趋势,Western blotting 结果见图 4, qPCR 结果见图 5。

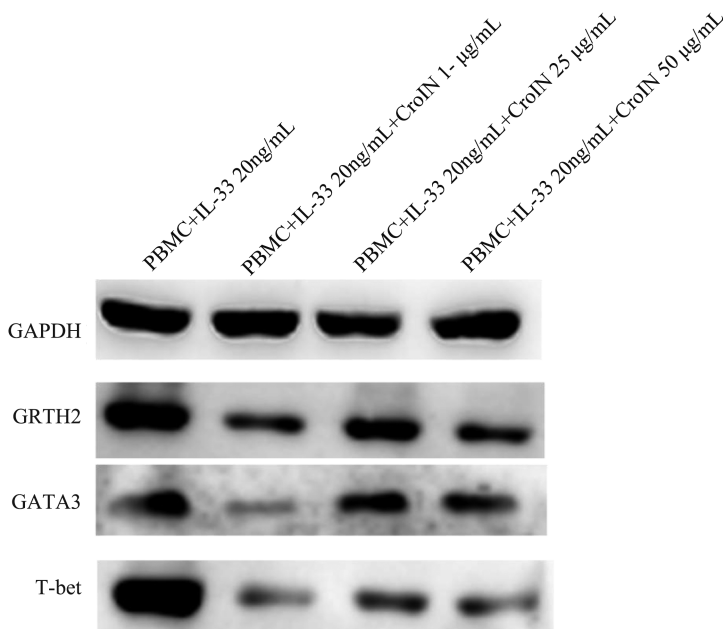


图 4 不同浓度藏红花素和 IL-33 共干预后 PBMC 中细胞转录因子和细胞受体表达情况

T-bet: 藏红花可以抑制转录因子 T-bet 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.027$); GATA3: 藏红花可以抑制 GATA3 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.001$); CRTH2: 藏红花可以抑制细胞受体 CRTH2 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.002$)

Figure 4 Expression of transcription factors and cell receptors in PBMC after different concentrations of crocin and IL-33

T-bet: Saffron could inhibit the expression of T-bet transcription factor ($P < 0.05$), and the expression of T-bet transcription factor was most obvious when the concentration was $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P = 0.027$); GATA3: Saffron inhibited the expression of GATA3 ($P < 0.05$), which was most significant when the concentration was $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P = 0.001$); CRTH2: Saffron could inhibit the expression of CRTH2 ($P < 0.05$), which was most significant when the concentration was $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P = 0.002$)

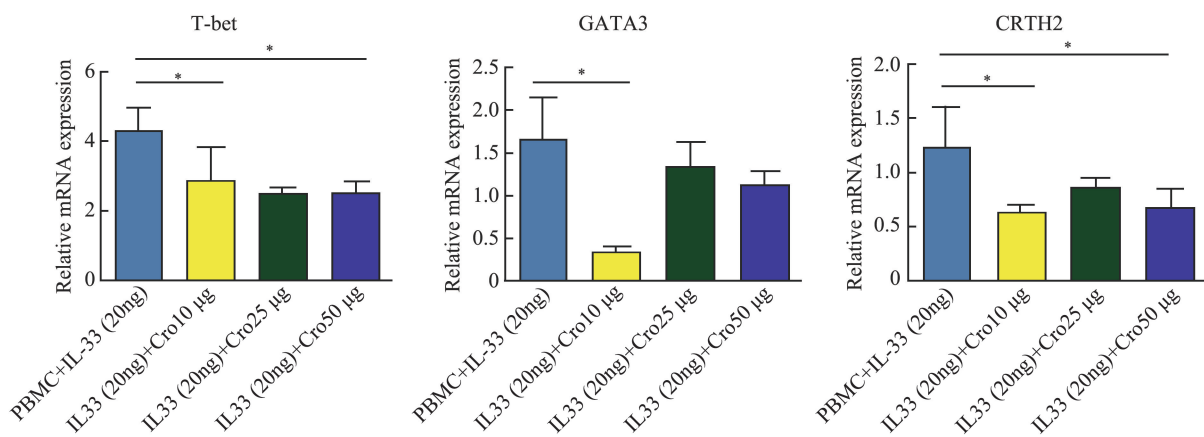


图 5 qPCR 检测不同浓度藏红花素和 IL-33 共刺激干预 PBMC 后细胞转录因子和细胞受体表达情况

T-bet: 藏红花素可以抑制转录因子 T-bet 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.019$); GATA3: 藏红花素可以抑制 GATA3 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.001$); CRTH2: 藏红花素可以抑制细胞 CRTH2 表达 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时最为明显 ($P = 0.001$)

Figure 5 qPCR was used to detect the expression of transcription factors and cell receptors after different concentrations of crocin and IL-33 co-stimulated PBMC

T-bet: Crocin could inhibit the expression of T-bet ($P < 0.05$), which was most evident at a concentration was $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P = 0.019$); GATA3: Crocin could inhibit the expression of GATA3 ($P < 0.05$), and the concentration of $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ was the most significant ($P = 0.001$); CRTH2: Crocin could inhibit the expression of CRTH2 in cells ($P < 0.05$), and the concentration of $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ was the most significant ($P = 0.001$)

3 讨论

不同的鼻窦炎,发病机制、临床表现、治疗预后均有明显不同。在不同地区慢性鼻窦炎伴鼻息肉的表型差异明显,说明鼻息肉是一种异质性明显的疾病,目前已经证实嗜酸性鼻息肉患者复发率高,如果鼻息肉组织中嗜酸粒细胞百分比超过 27%,对鼻息肉的复发有预测价值^[6]。因此对于嗜酸性鼻息肉(Eos CRSwNP)的发病机制及干预策略的研究显得尤为迫切和重要。鼻息肉在免疫表型上分为两类:以 Th2 细胞反应和明显的嗜酸性粒细胞浸润为特征;以 Th1/Th17 细胞反应和非嗜酸性粒细胞浸润为特征^[7]。Lou 等^[8]团队将 HE 染色高倍镜下每视野嗜酸性粒细胞数量 ≥ 55 个纳入为嗜酸性鼻息肉组:Eos CRSwNP,否则为 Non-Eos CRSwNP 组。近年来,国外学者研究发现,欧美地区超过 80% 的鼻息肉中都有 Th2 优势反应,并伴随大量的嗜酸性粒细胞浸润^[9],这表明 Th2 优势反应在欧美白种人群中起着重要作用。然而,在亚太地区例如韩国、日本等亚洲族群中,嗜酸粒细胞(EOS)的比例却很小,大部分呈现出非嗜酸性鼻息肉的特征^[10]。Du 等^[11]研究表明,随着时间的流逝,嗜酸粒细胞的比例显著上升,且鼻腔内存在 Th2 型嗜酸粒细胞的炎症反应,且 Th2 型嗜酸粒细胞的复发率显著增高。因此,CRSwNP 的炎症表型不同地区、不同种族和不同时间均存在明显的差异,不断分析鼻息肉组织中的炎症细胞表达情况,持续探索鼻息肉发病的炎症网络及关联机制,将可能为鼻息肉的治疗提供精准的靶向治疗方案^[12]。

研究抽取 Eos CRSwNP 患者的外周血后提取 PBMC,利用不同浓度 IL-33 刺激 PBMC 中的炎性细胞。通过 qPCR 验证观察到,IL-33 刺激 PBMC 后 GATA3、CRTH2 和 T-bet 等转录因子和细胞受体在 mRNA 水平呈上调趋势。这说明 IL-33 不仅活化了嗜酸性鼻息肉患者 PBMC 中的 2 型炎症细胞,同时也可以活化 1 型炎症细胞。本研究进一步利用 qPCR 和 ELISA 分别检测 PBMC 和上清液中细胞因子的变化情况,观察到 IL-33 在上调炎症细胞转录因子的同时其分泌的炎症细胞因子(INF- γ 、IL-5 和 IL-13)表达量也明显增加,这说明 PBMC 中的炎性细胞可以被 IL-33 激活。这种现象有明显的浓度依赖性,其中 IL-33 为 20 ng/mL 是对炎症细胞活化最为明显,但是具体是通过那条通路活化还需进一步探索。根据最新的研究报道,IL-33 既可以通过激活生长刺激表达基因 2 (Growth stimulation

expressed gene 2, ST2) 阳性的免疫细胞(如 ILC2 和 CD4⁺T 细胞)来激活 2 型炎症反应^[13-14],也可以通过激活嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞等在变态反应免疫应答中发挥重要作用^[15-16]。国外研究发现,IL-33 可以诱导谱系特异性转录因子 FOXP3、GATA3 和 T-bet 的表达,从而激活 Th1 细胞上 ST2 的表达^[17]。IL-33/ST2 轴覆盖了几乎所有炎症细胞^[18],小鼠鼻黏膜上皮细胞的离体研究显示,IL-33 可促进炎症因子的生成,其机制为 NF- κ B、TSLP 等多条信号通路的活化^[19]。IL-33 是近年来发现的一类重要的免疫调节因子,在 2 型、1 型炎症反应和调节性免疫反应中具有多效性,在多种炎症反应,如过敏性、纤维化、感染性、慢性炎症等方面均有广泛的应用。

我们此项研究进一步探索了藏红花素的抗炎作用,利用不同浓度的藏红花素与 IL-33 在 PBMC 中共培养后发现,PBMC 中 2 型炎症细胞和 1 型炎症细胞的 GATA3、CRTH2 和 T-bet 等转录因子和细胞受体在蛋白和 mRNA 水平均呈现出了明显的抑制现象,因此,我们认为藏红花素可以显著抑制 IL-33 活化后的炎症细胞,不仅可以抑制 PBMC 中的 2 型炎症细胞,同时可以抑制 1 型炎症细胞,且当藏红花素浓度为 10 μ g/mL 对炎症细胞抑制现象最为明显。后续课题组计划通过细胞免疫荧光染色等手段设计试验,进一步探索藏红花素抑制 IL-33 诱导的 PBMC 炎症反应的作用机制和信号通路。

然而本研究还是初步的,对于 IL-33 刺激后嗜酸性鼻息肉患者 PBMC 中各型炎性细胞数量的变化和激活炎性细胞的机制等,并没有进行深入探讨。同时由于实验条件限制,暂时无法完成藏红花素干预后 PBMC 的上清液细胞因子检测,实验数据欠完整。

综上所述,藏红花素可以抑制 IL-33 激活的 PBMC 2 型炎症反应,表明藏红花素有广泛的抑制 2 型炎症反应作用。结果表明藏红花素可能是治疗慢性鼻窦炎的潜在药物,但还需要进一步在动物模型和临床试验中验证其抗炎作用和机制。同时我们也注意,藏红花素在在较高浓度时对细胞的转录因子和炎性细胞因子的抑制现象并没有相应的增加现象,因此下一步准备继续探索更小浓度或者局部小剂量使用藏红花素对炎症的抑制情况。逐步开展临床试验,在观察藏红花素潜在应用价值的同时还应注意不良反应,选择合适的给药途径和剂量也需进一步深入研究。

参考文献:

[1] 张罗. 生物制剂治疗慢性鼻窦炎鼻息肉的现状和展望[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2023, 37(11): 853-855. doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2023.11.001

[2] 徐小东. 藏红花活性成分鼻喷剂治疗中重度变应性鼻炎的临床疗效观察[D]. 西藏大学, 2023

[3] Aslani MR, Jafari Z, Rahbarghazi R, et al. Effects of crocin on T-bet/GATA-3 ratio, and miR-146a and miR-106a expression levels in lung tissue of ovalbumin-sensitized mice[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(10): 1267-1274. doi:10.22038/IJBMS.2022.65622.14433

[4] 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. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.02.001

[5] Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020[J]. Rhinology, 2020, 58(29): 1-464. doi:10.4193/Rhin20.600

[6] Bai JQ, Huang JH, Price CPE, et al. Prognostic factors for polyp recurrence in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. J Allergy Clin Immunol, 2022, 150(2): 352-361.e7. doi:10.1016/j.jaci.2022.02.029

[7] 朱玉, 朱新华. TH2 细胞因子在 2 型慢性鼻窦炎伴鼻息肉中的作用机制研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(5): 156-161. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.258

ZHU Yu, ZHU Xinhua. Research progress on the role of TH2 cytokines in Type2 chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2023, 37(5): 156-161. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2022.258

[8] Lou HF, Meng YF, Piao YS, et al. Predictive significance of tissue eosinophilia for nasal polyp recurrence in the Chinese population[J]. Am J Rhinol Allergy, 2015, 29(5): 350-356. doi:10.2500/ajra.2015.29.4231

[9] Carsuzaa F, Béquignon é, Dufour X, et al. Cytokine Signature and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 417. doi:10.3390/ijms23010417

[10] Kidoguchi M, Imoto Y, Noguchi E, et al. Middle meatus microbiome in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis in a Japanese population[J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 152(6): 1669-1676. doi:10.1016/j.jaci.2023.06.029

[11] Du JT, Ba L, Li B, et al. Distinct expression of NK2 homeobox 1 (NKX2-1) and goblet cell hyperplasia in nasal polyps with different endotypes [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2017, 7(7): 690-698. doi:10.1002/alr.21932

[12] 敖天. 慢性鼻窦炎伴鼻息肉的内型研究及其指导下的精准控制与治疗[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2022, 36(3): 7-14. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2022.005

AO Tian. An endotype study of chronic rhinosinusitis with nasal polyps and precise control and treatment under the guidance[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2022, 36(3): 7-14. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.1.2022.005

[13] Zhou YL, Xu ZD, Liu ZQ. Role of IL-33-ST2 pathway in regulating inflammation: current evidence and future perspectives[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 902. doi:10.1186/s12967-023-04782-4

[14] Olguin-Martínez E, Muñoz-Paleta O, Ruiz-Medina BE, et al. IL-33 and the PKA Pathway Regulate ILC2 Populations Expressing IL-9 and ST2 [J]. Front Immunol, 2022, 13:787713. doi:10.3389/fimmu.2022.787713

[15] Shakerian L, Kolahdooz H, Garousi M, et al. IL-33/ST2 axis in autoimmune disease [J]. Cytokine, 2022, 158: 156015. doi:10.1016/j.cyto.2022.156015

[16] 杨卜嘉, 于传飞, 侯书婷, 等. IL-33/ST2 信号通路及相关药物研究进展 [J]. 中国药事, 2024, 38(1): 96-104. doi:10.16153/j.1002-7777.2024.01.013

YANG Bojia, YU Chuanfei, HOU Shuting, et al. Research advances in IL-33/ST2 signaling pathway and related drugs [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2024, 38(1): 96-104. doi:10.16153/j.1002-7777.2024.01.013

[17] Choi MR, Sosman JA, Zhang B. The janus face of IL-33 signaling in tumor development and immune escape [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(13): 3281. doi:10.3390/cancers13133281

[18] Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): a critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine [J]. Cytokine, 2022, 156: 155891. doi:10.1016/j.cyto.2022.155891

[19] Jin J, Fan YJ, Nguyen TV, et al. Fallopia japonica root extract ameliorates ovalbumin-induced airway inflammation in a CARAS mouse model by modulating the IL-33/TSLP/NF-κB signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12514. doi:10.3390/ijms241512514

[20] Anaiegoudari F, Anaiegoudari A, Kheirkhah-Vakilabad A. A review of therapeutic impacts of saffron (Crocus sativus L.) and its constituents [J]. Physiol Rep, 2023, 11(15): 15785. doi:10.14814/phy2.15785

[21] Bastani S, Vahedian V, Rashidi M, et al. An evaluation on potential anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Crocin [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113297. doi:10.1016/j.biopha.2022.113297