

·临床研究·

MUC5AC、MUC5B在慢性鼻-鼻窦炎患者中的表达及与细菌生物膜形成的关系分析

顾建明 梅文雅

[摘要] 目的 探究黏蛋白5AC(MUC5AC)、黏蛋白5B(MUC5B)在慢性鼻-鼻窦炎患者中的表达及与细菌生物膜形成的关系。方法 回顾性选择2020年12月至2023年4月行鼻内窥镜手术的50例慢性鼻-鼻窦炎患者作为观察组,另选取50例病理保存的健康标本作为对照组。采用免疫荧光及免疫印迹分别检测鼻黏膜组织中MUC5AC、MUC5B及蛋白表达,应用激光扫描共聚焦显微镜观察细菌生物膜阳性表达并进行Lund-Kennedy评分,扫描电镜下观察细菌生物膜形态,采用Pearson法分析MUC5AC、MUC5B与细菌生物膜阳性评分的相关性。结果 观察组患者鼻黏膜组织中的MUC5AC、MUC5B阳性细胞表达高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=54.27、61.18, P 均 <0.05)。观察组鼻黏膜组织中的MUC5AC、MUC5B蛋白表达高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=43.51、70.90, P 均 <0.05)。观察组患者细菌生物膜阳性评分高于对照组,差异有统计学意义($t=8.96$, $P<0.05$)。扫描电镜显示,观察组患者的黏膜组织表面伴黏附聚集、倒伏且部分组织伴丧失,对照组黏膜无明显病变反应。MUC5AC及MUC5B均与细菌生物膜阳性评分呈正相关(r 分别=0.37、0.30, P 均 <0.05)。结论 慢性鼻-鼻窦炎的MUC5AC、MUC5B与细菌生物膜形成具有显著正相关,临床诊疗中加强对于MUC5AC与MUC5B的检测对疾病的检出及后续治疗方案的实施具有重要意义。

[关键词] 黏蛋白5AC; 黏蛋白5B; 慢性鼻-鼻窦炎; 细菌生物膜

Expressions of MUC5AC and MUC5B in patients with chronic rhinosinusitis and their relationship with bacterial biofilm formation GU Jianming, MEI Wenya. Department of Otolaryngology, People's Hospital of Deqing, Deqing 313200, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of mucin 5AC (MUC5AC) and mucin 5B (MUC5B) in patients with chronic sinusitis and their relationship with bacterial biofilm formation. **Methods** Retrospective analysis was conducted on 50 patients with chronic sinusitis who underwent endoscopic sinus surgery from December 2020 to April 2023 and 50 healthy specimens preserved by pathology. Immunofluorescence and immunoblotting were used to detect the expression of MUC5AC, MUC5B, and protein in nasal mucosa tissue. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the positive expressions of bacterial biofilm and Lund-Kennedy score was performed. The morphology of bacterial biofilm was observed under scanning electron microscopy. Pearson method was used to analyze the correlation between MUC5AC, MUC5B, and bacterial biofilm positive score. **Results** The expressions of MUC5AC and MUC5B positive cells in nasal mucosa tissues of observation group were higher than that of control group, and the differences were statistically significant ($t=54.27, 61.18, P<0.05$). The expressions of MUC5AC and MUC5B proteins in the nasal mucosa tissue of the observation group were higher than that of the control group, and the differences were statistically significant ($t=43.51, 70.90, P<0.05$). The bacterial biofilm positive score in observation group was higher than that in control group, and the difference was statistically significant ($t=8.96, P<0.05$). Scanning electron microscopy showed that the mucosal

tissue surface of the observation group patients was accompanied by adhesive aggregation, lodging, and some tissues were lost, while the control group mucosa had no significant pathological reactions. Both MUC5AC and MUC5B were positively correlated

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.003.011

基金项目: 德清县武康健保集团县级科技计划项目(2020SK21)

作者单位: 313200 浙江德清, 德清县人民医院耳鼻喉科

with bacterial biofilm positive scores ($r=0.37, 0.30, P<0.05$). **Conclusion** The MUC5AC, MUC5B in chronic sinusitis is significantly positively correlated with bacterial biofilm formation. Strengthening the detection of MUC5AC and MUC5B in clinical diagnosis and treatment is of great significance for disease detection and the implementation of subsequent treatment plans.

[Key words] Mucin 5AC; Mucin 5B; chronic sinusitis; bacterial biofilm

慢性鼻-鼻窦炎是常见的上呼吸道疾病,其产生与细菌、病毒、真菌性感染、过敏、鼻部解剖结构缺陷等因素相关^[1,2]。黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC)作为一种黏液分子,主要存在于上呼吸道中黏膜表层和深层黏液中。研究表明,在慢性鼻-鼻窦炎的发展中 MUC5AC 具有调节作用^[3]。而黏蛋白 5B (mucin, MUC5B)为一种分泌性黏液糖蛋白,主要存在于呼吸道上皮细胞和黏液层中,具有保护和防御作用^[4]。细菌生物膜是一种由微生物组成的复杂结构常见于多种不同环境中^[5]。现阶段对于以上因素在慢性鼻-鼻窦炎中的相关性研究相对较少,本次研究探究 MUC5AC、MUC5B 在慢性鼻-鼻窦炎中的表达及与细菌生物膜形成的相关性分析。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2020 年 12 月至 2023 年 4 月在德清县人民医院行鼻内窥镜手术的患者 50 例为观察组,纳入标准:符合西医慢性鼻-鼻窦炎诊断标准^[6];年龄 >18 周岁;既往无鼻部手术;鼻窦 CT 显示至少一个解剖部位浑浊或阻塞;无其他慢性疾病病史。排除标准:临床资料缺失;妊娠及哺乳期的妇女;伴随其他免疫缺陷及恶性肿瘤疾病。观察组中男性 27 例、女性 23 例;平均年龄 (42.56 ± 2.23) 岁。另选取 50 例我院病理保存的健康标本作为对照组。对照组中男性 31 例、女性 19 例;平均年龄 (41.89 ± 2.30) 岁;两组患者在年龄、性别方面比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 取患者中鼻甲、钩突鼻窦面标本,使用生理盐水漂洗后剔除表面分泌物,取 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 黏膜组织后将其固定在 2.5% 戊二醛溶液中,低温保存备用。

1.2.2 免疫荧光检测 MUC5AC、MUC5B 使用磷酸盐缓冲液洗涤鼻黏膜组织,梯度乙醇脱水,二甲苯溶液透明,石蜡包埋,4℃冷却后制作成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 切片,40℃烘烤,脱蜡后经二甲苯溶液浸泡 40 min,后采用 90% 无水乙醇干预 2 min、80% 无水乙醇干预

2 min、70% 干预 2 min,清洗后将切片抗原修复,冷却 30 min 后将其清洗,加入内源性过氧化氢酶阻断剂,静置 10 min 后再清洗,常温封闭 1 h 后用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min,滴加一抗 MUC5AC (1:1000)、MUC5B (1:1000),4℃孵育过夜,清洗后加二抗,37℃孵育 1 h,清洗后室温避光显色,孵育 15 min,在荧光显微镜下将 MUC5AC、MUC5B 蛋白定位在细胞膜和细胞浆上,呈红色荧光染色。每组标本随机抽取 10 张切片,在高倍($\times 200$)视野下用荧光显微镜图像处理软件并计算阳性细胞面积,取其均值。

1.2.3 免疫印迹检测 MUC5AC、MUC5B 蛋白 将鼻黏膜组织在冰上裂解 30 min 后提取蛋白,测定蛋白浓度后煮样,设置 80 V、30 min,110 V、120 min 电泳,转膜后 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 稀释一抗 MUC5AC (1:1000)、MUC5B (1:1000),4℃过夜孵育,洗膜 3 次,每次 10 min,完成后加二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h,洗膜 3 次,每次 10 min,完成后进行 ECL 发光系统显像,用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.4 细菌生物膜阳性评分 将 10 mm 黏膜标本置于 DMEM 高糖培养基中,冲洗后进行细胞计数,调整浓度,离心收集,激光扫描共聚焦显微镜下判断阳性细菌生物膜,10 μm 环境下观察细胞形态,绿色荧光为活菌(红色荧光为死亡细胞和细菌),同时被不规则片状胞外多糖类物质围绕,阳性评分依据 Lund-Kennedy 评分标准进行评分,评分范围为 0~8 分,得分越高则表示病情越严重^[7]。

1.2.5 细菌生物膜形态 所有标本均行扫描电镜下观察细菌生物膜形态,采用双蒸水洗涤后,用乙醇梯度脱水处理,干燥后进行喷金,完成后在电镜显微镜下进行观察,其中伴随水通道、三维立体结构、圆形、椭圆形小体等形态学特征则判定为具有细菌生物膜形成。

1.3 统计学方法 采用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;慢性鼻-鼻窦炎中的 MUC5AC、

MUC5B与细菌生物膜阳性评分相关性采用 *Pearson* 法分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组鼻黏膜组织中 MUC5AC、MUC5B 阳性细胞表达见表1和封三图4

表1 两组鼻黏膜组织中 MUC5AC、MUC5B 阳性细胞表达/%

组别	MUC5AC	MUC5B
观察组	36.29±3.46*	40.38±3.55*
对照组	8.38±1.12	7.79±1.26

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表1和封三图4可见,观察组患者鼻黏膜组织中的 MUC5AC、MUC5B 阳性细胞表达高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=54.27、61.18, P 均 < 0.05)。

2.2 两组患者鼻黏膜组织中 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达见表2和图1

表2 两组患者鼻黏膜组织中 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达

组别	MUC5AC 蛋白	MUC5B 蛋白
观察组	2.88±0.25*	3.20±0.19*
对照组	1.25±0.06	1.23±0.05

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

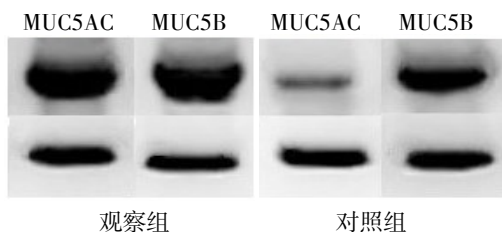


图1 两组患者鼻黏膜组织 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达示意图

由表2和图1可见,观察组鼻黏膜组织中的 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=43.51、70.90, P 均 < 0.05)。

2.3 两组细菌生物膜阳性评分比较 观察组患者细菌生物膜阳性评分为(6.89±2.36)分,高于对照组(3.58±1.12)分,差异有统计学意义($t=8.96$, $P < 0.05$)。

2.4 两组细菌生物膜荧光染色结果见封三图5

由封三图5可见,激光扫描共聚焦显微镜下显示,与对照组相比,观察组被不规则片状胞外多糖类物质围绕,同时绿色荧光活跃。

2.5 两组电镜下细菌生物膜形态比较见封三图6

由封三图6可见,扫描电镜下显示,观察组鼻黏膜组织表面纤毛均伴黏附聚集、倒伏、紊乱及丧失等现象,另有部分组织伴纤毛肿胀;对照组鼻黏膜

表面纤毛无明显紊乱现象。

2.6 慢性鼻-鼻窦炎患者中 MUC5AC、MUC5B 与细菌生物膜阳性评分的相关性分析 MUC5AC、MUC5B 与细菌生物膜阳性评分均呈正相关(r 分别=0.37、0.30, P 均 < 0.05)。

3 讨论

慢性鼻-鼻窦炎由于病因、病情及细菌耐药等问题常导致临床治疗难度较大。目前,对于慢性鼻-鼻窦炎的治疗有抗生素治疗、鼻腔冲洗及手术干预等方式。提高慢性鼻-鼻窦炎的检测效率对于疾病的预防和治疗至关重要。

黏蛋白作为重要的物理屏障能通过分泌黏液阻止细菌等感染因子附着。MUC5AC、MUC5B 作为上呼吸道黏膜中重要的黏蛋白基因,在人体鼻腔黏膜中均有一定程度的表达^[8]。MUC5B 能够参与鼻-鼻窦炎黏液的调节与合成,若黏液的层数过厚便会对鼻部以及整个呼吸道的排出功能造成限制,同时增强炎症反应并加重疾病进程。MUC5B 的表达强度升高,不仅能够促进黏液的分泌,同时还会抑制鼻窦的清除能力。且有相关研究表示,MUC5B 表达水平的变化与慢性鼻-鼻窦炎病症的严重程度具有重要相关性^[9]。分析 MUC5B 在慢性鼻-鼻窦炎中高表达的原因可能是由于慢性炎症反应所导致的黏液分泌异常增加所致。MUC5AC 也是促进炎症黏液形成的关键因素之一,其高表达也可加快慢性鼻-鼻窦炎的发生发展^[10]。在慢性鼻-鼻窦炎疾病进程中,大量的 MUC5AC 会导致杯状细胞及腺体细胞异常增生,在鼻窦内不断积聚并形成黏稠的分泌物。同时,由于疾病期的排出困难,进而也在一定程度上加剧炎症反应不断形成,最终加重疾病反应^[11]。本次研究结果显示,与健康人群相比,慢性鼻-鼻窦炎患者鼻黏膜组织中 MUC5AC、MUC5B 阳性细胞及蛋白表达均较高(P 均 < 0.05),提示在慢性鼻-鼻窦炎中,MUC5AC、MUC5B 及细菌生物膜形成均有不同程度升高现象。这可能是因为鼻-鼻窦炎患者中 MUC5AC 和 MUC5B 的过度表达导致黏液层的增厚和黏稠度增加,从而为细菌生物膜提供了适宜的环境。与 Lachowicz-Scroggins 等^[12]研究结论一致。

通常情况下,慢性鼻-鼻窦炎患者上呼吸道黏膜中 MUC5AC 表达量要比健康人群高约2倍。相关研究也表示,MUC5AC、MUC5B 过度表达不仅可导致上皮细胞功能障碍、黏液分泌过度,同时也为细菌生物膜形成提供便利条件。细菌生物膜是细菌

形成的主要形式,是在不利环境中所产生的胞外多聚糖被膜。经研究发现,细菌生物膜既能由单一菌种构成,也可由多种细菌混合形成。临床中,多种难治型、顽固型感染均与细菌生物膜的形成相关^[13]。研究表明,许多病原微生物可以形成生物膜,且能在一定程度上保护微生物免受抗生素、免疫系统以及其他防御机制的攻击^[14]。在慢性鼻-鼻窦炎疾病中由于外源菌群的不断入侵,常导致鼻黏膜正常菌群遭到破坏,进而刺激异常菌群黏附性生长,大量生成黏液,最终形成细菌保护膜。国外研究发现,在慢性鼻-鼻窦炎患者中,MUC5AC和MUC5B的表达水平明显增加,且患者的鼻腔和鼻窦中常见细菌和真菌的生物膜形成,这表明这两种黏蛋白可能在慢性鼻-鼻窦炎的发病机制中起重要作用,且这些生物膜可以促进细菌的存活和繁殖,并与慢性鼻-鼻窦炎的病情恶化有关^[15]。本次研究结果显示,与健康人群相比,慢性鼻-鼻窦炎患者细菌生物膜阳性评分较高($P<0.05$),且在扫描电镜下慢性鼻-鼻窦炎患者的黏膜表面纤毛有倒悬、缺失、混乱及黏附聚集等现象,且部分纤毛肿胀、损伤程度较重。进一步相关性分析发现,MUC5AC、MUC5B均与细菌生物膜形成呈正相关(P 均 <0.05),表明MUC5AC和MUC5B的高表达与细菌生物膜形成有关。但对于细菌生物膜形成与MUC5AC、MUC5B的具体作用机制仍需后续进一步探究。

综上所述,慢性鼻-鼻窦炎中MUC5AC、MUC5B、细菌生物膜三者均存在一定的相关性,但本次研究仍存在一定不足之处,对于三者的具体机制分析仍需进一步探究,日后会继续完善进而为临床相关疾病的诊疗提供有效策略。

参考文献

- 1 Wang JC, Moore CA, Epperson MV, et al. Association of the sinonasal bacterial microbiome with clinical outcomes in chronic rhinosinusitis: A systematic review[J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2020, 10(4):433-443.
- 2 Zhao N, Tang S. Systematic review and meta-analysis of biyuanshu oral liquid in the treatment of chronic rhinosinusitis[J]. *Medicinal Plant*, 2020, (5):80-83.
- 3 Yan DQ, Ye Y, Zhang J, et al. Human neutrophil elastase induces MUC5AC overexpression in chronic rhinosinusitis through miR-146a[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2020, 34(1):59-69.
- 4 Yan Z, Liu L, Jiao L, et al. Bioinformatics analysis and identification of underlying biomarkers potentially linking allergic rhinitis and asthma[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 27(26):e924934.
- 5 Kao ST, Bassiouni A, Ramezanpour M, et al. Rhinitis, sinusitis, allergy proteomic analysis of nasal mucus samples of healthy patients and patients with chronic rhinosinusitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 12(1):147.
- 6 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会, 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(2008年, 南昌)[S]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(1):6-7.
- 7 Li H, Wang D, Sun X, et al. Relationship between bacterial biofilm and clinical features of patients with chronic rhinosinusitis[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(1):155-163.
- 8 Liu L, Yan C, Tao S, et al. Association of MUC2, MUC5AC and MUC5B genes with the recurrence of nasal polyps[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2):1808-1814.
- 9 Fakih D, Rodriguez-Pieiro AM, Trillo-Muyo S, et al. Normal murine respiratory tract has its mucus concentrated in clouds based on the Muc5b mucin[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318(6):L1270-L1279.
- 10 刘成, 卫平存, 胡金旺, 等. 18 β -甘草次酸对变应性鼻炎大鼠鼻黏膜中水通道蛋白5及黏蛋白5AC的影响[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2020, 27(7):398-403.
- 11 Song D, Joyner K, Duncan GA. Mucin-based hydrogels for studying the impact of MUC5B: MUC5AC ratio on airway mucus function[C]//American Thoracic Society 2020 International Conference, May 15-20, 2020 - Philadelphia, PA. 2020.
- 12 Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(10):1296-1299.
- 13 Melia CE, Bolla JR, Katharios-Lanwermyer S, et al. Architecture of cell-cell junctions in situ reveals a mechanism for bacterial biofilm inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(31):e2109940118.
- 14 刘卓慧, 龙瑞清, 张帆, 等. 慢性中耳炎细菌培养与细菌生物膜形成无显著相关[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(11):4503-4509.
- 15 Ghosh A, Jayaraman N, Chatterji D. Small-molecule inhibition of bacterial biofilm[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(7):3108-3115.

(收稿日期 2023-12-28)

(本文编辑 高金莲)