HIF-1α介导的线粒体自噬在慢性鼻窦炎中黏液分泌的作用及机制研究

洪伟

（上饶市人民医院　江西上饶　334000）

【摘　要】目的　探讨缺氧诱导因子-1α（hypoxia-inducible factor1α, HIF-1α）介导的线粒体自噬在慢性鼻窦炎（chronic rhinosinusitis, CRS）黏液高分泌中的调控作用及分子机制，明确人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶（human neutrophil elastase, HNE）是否通过HIF-1α-线粒体自噬通路诱导黏蛋白5AC（mucin5AC, MUC5AC）过度表达。方法　收集共20名CRS患者（10名CRSwNP和10名CRSsNP患者）及正常对照鼻窦黏膜标本10例，检测HNE、HIF-1α、线粒体自噬相关蛋白及MUC5AC的表达。结果　CRS组HNE、HIF-1α、PINK1、BNIP3、LC3B-Ⅱ/Ⅰ及MUC5AC均显著高于对照组（P<0.05）。结论　HNE通过激活HIF-1α诱导线粒体自噬，进而促进鼻黏膜上皮MUC5AC高表达，是CRS黏液高分泌的重要分子机制。

【关键词】慢性鼻窦炎；HIF-1α；线粒体自噬；人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶

Study on the Role and Mechanism of HIF-1α-Mediated Mitochondrial Autophagy in Mucin Secretion During Chronic Rhinosinusitis

Hong Wei

（Shangrao People's Hospital, Shangrao, Jiangxi　334000）

[Abstract] Objective – To investigate the regulatory role and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)-mediated mitochondrial autophagy in the hypersecretion of mucus in chronic rhinosinusitis (CRS), and to determine whether human neutrophil elastase (HNE) induces excessive expression of mucin5AC (MUC5AC) through the HIF-1α–mitochondrial autophagy pathway. Methods – Nasal sinus mucosal specimens were collected from 20 CRS patients (10 with CRSwNP and 10 with CRSsNP) and 10 healthy controls; the expressions of HNE, HIF-1α, mitochondrial autophagy-related proteins, and MUC5AC were measured. Results – The levels of HNE, HIF-1α, PINK1, BNIP3, LC3BII/LCI, and MUC5AC were significantly higher in the CRS group compared to the control group (P <0.05). Conclusion – HNE activates HIF-1α to induce mitochondrial autophagy, thereby promoting the high expression of MUC5AC in the nasal mucosal epithelium; this represents an important molecular mechanism underlying the hypersecretion of mucus in CRS.

[Key words] Chronic sinusitis; HIF-1α; Mitophagy; Human neutrophil elastase

CRS 是临床常见慢性炎症，以鼻黏膜慢性炎症与黏液高分泌为主要特征，严重影响患者生活质量。MUC5AC 是气道主要黏蛋白，在 CRS 患者中显著高表达，是导致鼻塞、流涕及引流障碍的关键因素[1]。

缺氧是慢性炎症组织的典型微环境，HIF–1α作为缺氧核心转录因子，在 CRS 鼻黏膜中高表达并与中性粒细胞炎症相关[2–3]。研究证实，HIF–1α可通过 BNIP3 等分子介导线粒体自噬，参与细胞稳态与炎症调控[4]。本研究通过临床标本与体外细胞实验，探讨 HIF–1α–线粒体自噬在 CRS 黏液分泌中的作用，验证“HNE 通过 HIF–1α–线粒体自噬通路调控 MUC5AC”的科学假设，为阐明 CRS 发病机制和寻找治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床标本收集

收集 2025 年至 2026 年在上饶市人民医院耳鼻咽喉科行鼻内镜手术的患者鼻窦黏膜标本，其中 CRSwNP 组 10 例，CRSsNP 组 10 例，正常对照组 10 例（取自鼻中隔矫正术或鼻窦囊肿手术患者的正常鼻窦黏膜）。所有患者均符合《慢

性鼻-鼻窦炎诊断和治疗指南（2018 年，修订版）》的诊断标准，术前 2 周内未使用口服糖皮质激素及内固醇类鼻喷雾剂，排除后鼻孔息肉、真菌性鼻窦炎、哮喘、免疫缺陷性疾病及其他全身性疾病。本研究经医院伦理委员会批准，所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

重组人 HNE（美国 R&D）；AG1478、环孢素 A、$CoCl_2$（美国 Sigma）；HIF-1α 组成型活性质粒及空质粒（上海吉凯基因）；HNE、HIF-1α、线粒体自噬相关蛋白及 MUC5AC 一抗（美国 CST）；ELISA、qRT-PCR 试剂盒（武汉博士德、日本 TaKaRa）；透射电镜（日本日立）、实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI）。

1.3 实验方法

采用免疫组织化学染色（4%多聚甲醛固定组织，一抗 1:200 稀释，Image-ProPlus6.0 测定平均光密度）、ELISA 检测组织及细胞上清中 HNE 和 MUC5AC 蛋白水平，通过 Westernblot（一抗 1:1000、二抗 1:5000 稀释，β-actin 为内参）和 qRT-PCR（$2^{-}\Delta\Delta Ct$ 法，GAPDH 为内参）检测目标蛋白及 mRNA 表达。

培养人原代鼻黏膜上皮细胞并经细胞角蛋白 AE1/AE3 免疫荧光鉴定。将对数生长期细胞分为 6 组：对照组、HNE 组（30nMHNE 刺激 24h）、空质粒+HNE 组（转染空质粒 24h 后加 30nMHNE 刺激 24h）、HIF-1α 质粒+HNE 组（转染 HIF-1α 组成型活性质粒 24h 后加 30nMHNE 刺激 24h）、$CoCl_2$+HNE 组（100μM $CoCl_2$ 预处理 1h 后加 30nMHNE 刺激 24h）、环孢素 A+HNE 组（1μM 环孢素 A 预处理 1h 后加 30nMHNE 刺激 24h）。其中，质粒转染采用脂质体转染法（Lipofectamine3000），严格按照说明书操作。最后通过透射电镜观察细胞内线粒体形态及自噬体形成情况。

1.4 统计学分析

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRS 患者鼻窦黏膜中各指标的表达差异

免疫组化显示，HNE、HIF-1α、LC3B 及 MUC5AC 主要定位于鼻黏膜上皮细胞胞浆，其阳性表达强度在 CRSwNP 组和 CRSsNP 组均显著高于正常对照组（P<0.05），且 CRSwNP 组更高（P<0.05）。

ELISA、Westernblot 及 qRT-PCR 结果一致，两组 CRS 患者组织中 HNE、HIF-1α、线粒体自噬相关蛋白（LC3B-Ⅱ/Ⅰ）及 MUC5AC 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高（P<0.05），且 CRSwNP 组升高更明显（P<0.05）。

2.2 HNE 对原代鼻黏膜上皮细胞 MUC5AC 表达的浓度依赖性影响

见表 1。

2.3 HNE 对原代鼻黏膜上皮细胞 MUC5AC 表达的时间依赖性影响

见表 2。

2.4 不同干预对原代鼻黏膜上皮细胞各指标表达的影响

见表 3。

表 1 不同浓度 HNE 刺激 24h 后 MUC5AC 的表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

HNE 浓度（nM）	MUC5AC 蛋白（ng/mL）	MUC5ACmRNA（相对表达量）	F 值	P 值
0	0.85±0.12	1.00±0.15	-	-
10	3.26±0.48*	3.57±0.61*	68.42	<0.001
25	2.91±0.43*#	3.18±0.55*#		
50	2.54±0.37*#&	2.76±0.49*#&		

注：与 0nM 组比较，*P<0.05；与 10nM 组比较，#P<0.05；与 25nM 组比较，&P<0.05

表 2 10nMHNE 刺激不同时间后 MUC5AC 的表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

刺激时间（h）	MUC5AC 蛋白（ng/mL）	MUC5ACmRNA（相对表达量）	F 值	P 值
0	0.83±0.11	1.00±0.14	-	-
12	1.95±0.29*	2.13±0.36*		

24	3.28 ± 0.49*#	3.61 ± 0.62*#	72.15	<0.001
48	2.87 ± 0.42*#&	3.15 ± 0.54*#&		

注：与 0h 组比较，*P<0.05；与 12h 组比较，#P<0.05；与 24h 组比较，&P<0.05

表 3　不同干预组细胞中各蛋白的相对表达量（ $\bar{x} \pm s$ ，n=3）

检测指标	对照组	HNE 组	空质粒+HNE 组	HIF-1α 质粒+HNE 组	$CoCl_2$+HNE 组	环孢素 A+HNE 组	F 值	P 值
HIF-1α	0.22 ± 0.05	0.68 ± 0.14*	0.67 ± 0.13*	1.15 ± 0.22*#&	1.09 ± 0.21*#&	0.66 ± 0.13*	102.58	<0.001
PINK1	0.17 ± 0.04	0.55 ± 0.11*	0.54 ± 0.10*	0.92 ± 0.18*#&	0.88 ± 0.17*#&	0.31 ± 0.06*#	97.43	<0.001
BNIP3	0.18 ± 0.04	0.57 ± 0.11*	0.56 ± 0.10*	0.94 ± 0.18*#&	0.90 ± 0.17*#&	0.32 ± 0.06*#	99.85	<0.001
LC3B-Ⅱ/Ⅰ	0.24 ± 0.05	0.71 ± 0.14*	0.70 ± 0.13*	1.17 ± 0.22*#&	1.12 ± 0.21*#&	0.39 ± 0.08*#	113.69	<0.001
MUC5AC	0.84 ± 0.12	3.27 ± 0.48*	3.25 ± 0.47*	5.12 ± 0.89*#&	4.87 ± 0.85*#&	1.73 ± 0.31*#	128.45	<0.001

注：与对照组比较，*P<0.05；与 HNE 组比较，#P<0.05；与空质粒+HNE 组比较，&P<0.05

2.5 透射电镜观察细胞内线粒体自噬体形成

透射电镜显示：对照组线粒体形态正常、无明显自噬体；HNE 组线粒体大量受损且出现典型线粒体自噬体；HIF-1α 过表达或 $CoCl_2$ 处理会进一步增加自噬体；环孢素 A 可抑制自噬体形成，但无法改善线粒体损伤。

3 讨论

MUC5AC 高表达是 CRS 黏液高分泌的核心环节，本研究临床标本显示 CRS 患者 HNE 与 MUC5AC 均显著升高，且 CRSwNP 组升高更明显，体外实验进一步证实 HNE 可通过 HIF-1α 诱导 MUC5AC 表达。进一步发现，HIF-1α 在 CRS 中显著升高并介导 MUC5AC 上调，提示 HIF-1α 在 CRS 黏液高分泌过程中发挥关键调控作用。

本研究首次明确 HIF-1α 可通过诱导线粒体自噬调控 MUC5AC 表达：HNE 可激活 HIF-1α 介导的线粒体自噬，透射电镜可见大量包裹受损线粒体的自噬体形成；抑制 HIF-1α 可阻断该过程，而过表达 HIF-1α 或化学缺氧可进一步增强线粒体自噬；线粒体自噬抑制剂环孢素 A 可显著降低 MUC5AC，但不影响 HIF-1α 表达，证实线粒体自噬位于 HIF-1α 下游。

综上，本研究揭示了“HNE→HIF-1α→线粒体自噬→MUC5AC”的调控通路，为 CRS 靶向治疗提供了新的潜在靶点，也为深入理解 CRS 黏液高分泌的分子机制提供了实验依据。

参考文献：

[1]Kato K, Song B H, Howe C L, et al. A Comprehensive Systematic Review of the Association Between Airway Mucins and Chronic Rhinosinusitis[J].American Journal of Rhinology & Allergy,2019,33(4):433-448.

[2]Kim J, Lee H J. Involvement of HIF1α in mediating VEGF-dependent epithelial cell growth and overexpression in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis[J].The Journal of Immunology,2010,184(S1).

[3]Zhong B, Sun S, Tan K S, et al. Hypoxia-inducible factor 1α activates the NLRP3 inflammasome to regulate epithelial differentiation in chronic rhinosinusitis[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology,2023,152(6):1444-1459.

[4]Semenza G L. Mitochondrial autophagy: life and breath of the cell[J].Autophagy,2008,4(4):534-536.

课题名称：HIF-1α 介导的线粒体自噬在慢性鼻窦炎中黏液分泌的作用及机制研究；

项目编号：2025D044。