

· 短篇论著 ·

变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织中一氧化氮含量与组胺含量的相关研究

Relationship between the contents of nitric oxide and histamine in nasal mucosa of allergic rhinitis guinea-pigs

王素敏, 郑宏良*, 章如新, 张速勤, 温武, 李兆基, 周水森 (第二军医大学长海医院耳鼻喉科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**检测变应性鼻炎豚鼠不同病程鼻黏膜组织中一氧化氮(NO)及组胺含量,并探讨二者的相关性。**方法:**60只豚鼠随机分为正常对照组和致敏组,致敏组注射卵清蛋白制备变应性鼻炎豚鼠模型,正常对照组注射生理盐水替代卵清蛋白。分别于末次致敏前和末次致敏激发后即刻、激发后24、48、72 h处死豚鼠($n=6$),取鼻黏膜组织,采用NO检测试剂盒测定鼻黏膜组织NO含量,改良荧光测定法测定鼻黏膜组织组胺含量,应用直线相关回归分析法分析NO含量与组胺含量的相关性。**结果:**致敏原激发前致敏组动物鼻黏膜中NO含量和组胺含量均明显高于正常对照组($P<0.01$);致敏原激发即刻迅速下降至低于正常对照组,以后呈逐渐回升趋势,72 h后基本接近于激发前水平。致敏组动物鼻黏膜中NO含量和组胺含量呈正相关,相关性非常显著($r=0.967, P<0.01$)。**结论:**变应性鼻炎模型豚鼠鼻黏膜组织中组胺含量和NO含量呈正相关。

[关键词] 鼻炎, 变应性; 组胺; 鼻黏膜; 一氧化氮

[中图分类号] R 765.21 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0670-02

一氧化氮(NO)是一种具有多种复杂生物学活性的小分子物质,由一氧化氮合酶催化产生,是呼吸道内最重要的炎症介质之一,参与呼吸道内气管和血管平滑肌的松弛作用^[1]。作为变应性鼻炎公认的炎症介质,组胺对呼吸道内的气管和血管平滑肌也具有松弛作用。最近,有文献报道,在人类冠状动脉硬化患者的内皮平滑肌细胞中,组胺通过调节NO的含量来参与血管平滑肌的收缩^[2]。本实验拟通过观察变应性鼻炎豚鼠抗原激发前后不同时程鼻黏膜中NO及组胺含量的变化,并分析二者的相关性,进一步探讨变应性鼻炎的发病机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 二磷酸组胺,分析纯;邻苯二甲醛(OPT),瑞士Fluka厂出品。NO检测试剂盒、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒、蛋白标准液均购自南京建成生物研究所;日立740型荧光分光光度计,721型可见分光光度计;组胺标准液的制备:将二磷酸组胺置棕色瓶中减压干燥4 h,称取2.763 mg溶于0.1 mol/L HCl中稀释至100 ml。分装后冰箱保存。用前取0.1 ml稀释至10 ml(100 ng/ml)。

1.2 动物分组及处理 健康豚鼠,体质量250~350 g,雌雄不拘,由第二军医大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(沪)2002-0006。60只豚鼠随机分成正常组($n=30$)和致敏组($n=30$)。变应性鼻炎豚鼠模型制备参见章如新等^[3]的抗原致敏法。模型制备成功后,分别在末次卵清蛋白激发前和激发后即刻,激发后24、48、72 h进行取材和观察。正常对照组豚鼠以生理盐水代替卵清蛋白,其他与致敏组相同。检测以上各时间点豚鼠鼻黏膜中NO及组胺含量。

1.3 鼻黏膜组胺含量的测定 豚鼠断头处死,取双侧鼻黏膜组织,置0.4 mol/L高氯酸中,匀浆破细胞,30 000×g低温离心15 min,取上清。采用Shore等^[4]荧光测定法并加以改良。

步骤1:取1.6 ml上清液置于已加1.5 g NaCl带塞10 ml试管中,再加4.0 ml正丁醇和0.2 ml NaOH(2.5 mol/L),立即混匀,置康氏震荡器震荡5 min,静置后取出3.6 ml

正丁醇相加到已加1.2 ml HCl(0.1 mol/L)和2 ml正庚烷的10 ml带塞试管中,震荡5 min,弃有机相,取1 ml HCl相置入10 ml带塞试管中。

步骤2:1 ml HCl相用三蒸水稀释1倍,加0.5 ml NaOH(0.4 mol/L)碱化,混匀并迅速加入0.1%的OPT甲醇液0.1 ml,立即混匀,并在21~22℃反应10 min,加0.5 ml HCl(0.5 mol/L)酸化以终止缩合反应,并使荧光物质稳定,测定荧光值(激发波长350 nm,发射波长443 nm)。空白对照以三蒸水代替组织上清。组胺标准曲线:取10 μg/ml标准液,用0.1 mol/L HCl稀释成100 ng/ml,分别取1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 ml,并以0.1 mol/L HCl补足至1.0 ml,空白用0.1 mol/L HCl 1.0 ml,另向各管加三蒸水0.5 ml,25%三氯乙酸0.1 ml。

经上述方法步骤1与2,即为组胺内标准曲线,仅通过方法步骤2为组胺外标准曲线。

1.4 鼻黏膜NO含量的测定 参照文献^[5]方法进行。

1.5 统计学处理 不同组之间的比较分别采用 t 检验、 F 检验和直线相关与回归分析。

2 结果

2.1 鼻黏膜中组胺含量的变化 致敏组动物在致敏原激发前鼻黏膜中组胺含量明显高于正常对照组($P<0.01$);致敏原激发即刻迅速下降,低于正常对照组,仅为激发前的46%,差异非常显著($P<0.01$);以后呈逐渐回升趋势,24 h以后即高于正常对照组;72 h后回升为激发前的99%,基本接近于激发前水平。而正常对照组动物鼻黏膜中组胺含量则始终无明显变化。详见表1。

[基金项目] 全军医药卫生科研基金(06MA164)。Supported by Medical and Health Scientific Fund of the PLA, China(06MA164)。

[作者简介] 王素敏,主治医师。E-mail: wsm1170@sina.com

* Corresponding author. E-mail: zhenghl@smmu.edu.cn

表 1 激发前后不同时间鼻黏膜组织中组胺含量的变化

(n=6, $\bar{x} \pm s, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

组别	激发前	激发后(t/h)			
		0	24	48	72
对照组	113.21±11.25	112.93±10.12	109.23±11.35	111.02±10.49	112.14±10.32
致敏组	206.42±25.18**	94.97±15.36**△△	132.76±18.34**△△	151.94±19.26**△△	204.68±22.45**

** P<0.01 与对照组比较;△△ P<0.01 与激发前比较

2.2 鼻黏膜中 NO 含量的变化 激发前致敏组动物鼻黏膜中 NO 含量明显高于正常对照组 (P<0.01);致敏原激发即刻迅速下降,仅为激发前的 53%,低于正常对照组;以后呈逐

渐回升趋势,24 h 以后即高于正常对照组;72 h 后回升为激发前的 97%,基本接近于激发前水平。而正常对照组动物鼻黏膜中 NO 含量则无明显变化。详见表 2。

表 2 激发前后不同时间鼻黏膜组织中 NO 含量的变化

(n=6, $\bar{x} \pm s, \text{cB}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	激发前	激发后(t/h)			
		0	24	48	72
对照组	29.86±1.05	30.36±1.15	31.02±1.31	30.91±1.28	30.34±1.64
致敏组	55.81±3.01**	25.43±2.12**△△	38.45±2.45**△△	43.68±2.74**△△	54.01±2.89**

** P<0.01 与对照组相比;△△ P<0.01 与激发前相比

2.3 致敏组豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量与组胺含量的关系
经相关和回归分析提示致敏组豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量与组胺含量两者之间具有良好的线性关系,线性方程为 $y=1.866\ 8+0.261\ 7x$,相关性非常显著($r=0.991\ 7, P<0.01$)。

3 讨 论

组胺是参与变应性鼻炎发病机制的一种重要的炎性介质,作用于 H₁ 受体可引起血管扩张,渗透性增高及腺体分泌以及神经反射等。本实验采用 Shore 等^[4] 的荧光测定法并加以改良,测定鼻黏膜中的组胺含量。结果表明,激发前致敏组动物鼻黏膜中组胺含量明显高于正常对照组;致敏原激发即刻迅速下降,仅为激发前的 46%;以后呈逐渐回升,24 h 以后即高于正常对照组;72 h 后回升为激发前的 99%,基本接近于激发前水平。提示变应性鼻炎发病过程有着动态的变化。

NO 是一种较小的生物信使分子,尽管化学结构简单,却以相对特异性的方式控制多种细胞功能,参与机体的多种病理生理过程。缓激肽、ADP、LTC₄ 和 SP 等多种生物活性物质对微循环渗透性的调节作用都是通过 NO 介导的。本实验用还原酶检测正常豚鼠和变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织中的 NO 含量及其动态变化规律。结果发现激发前致敏组动物鼻黏膜中 NO 含量明显高于正常对照组;致敏原激发即刻迅速下降,低于正常对照组,仅为激发前的 53%;以后呈逐渐回升趋势,24 h 以后即高于正常对照组;72 h 后回升为激发前的 97%,基本接近于激发前水平。而正常对照组动物鼻黏膜中组胺含量则无明显变化。提示鼻黏膜中 NO 含量在变应性鼻炎时因病情不同而不同,当未受到变应原刺激时鼻黏膜中 NO 含量明显高于正常水平,在遇到变应原刺激时鼻黏膜中 NO 含量急剧下降。

组胺作为一种重要的炎性介质,其多种生物活性是由

NO 介导的。有研究^[6] 发现,在冠状血管中,组胺通过 H₁ 受体和 NF- κ B 信号转导途径诱发诱导型一氧化氮合酶表达,合成和释放 NO,从而诱导产生血管平滑肌松弛反应。Leguia 等^[7] 研究发现,在最原始的生殖和发育过程中(低等动物海胆卵的受精过程),组胺仍然通过 NO 介导而发挥其调节作用。本研究证实,变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜中组胺含量与 NO 含量呈正相关,且相关性非常显著。所以,推测组胺在变应性鼻炎发病过程中的作用可能是通过 NO 介导的,但其确切机制还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Struben V M, Wieringa M H, Feenstra L, et al. Nasal nitric oxide and nasal allergy[J]. Allergy,2006,61:665-670.

[2] Chiba Y, Matsuo K, Sakai H, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in nasal mucosal of guinea pigs with induced allergic rhinitis[J]. Am J Rhinol,2006,20:336-341.

[3] 章如新,江德胜,李兆基,等. P 物质能神经阻滞剂治疗变应性鼻炎的实验研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,1994,29:282-285.

[4] Shore A P,Burkhalter A, Cohn H V, et al. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues[J]. J Pharmacol Ther, 1959,127:182-186.

[5] 王素敏,郑宏良,章如新,等. 变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织中一氧化氮含量与血流量的相关研究[J]. 第二军医大学学报, 2007,28:512-515.

[6] Yuan Y,Granger H J,Zawieja D C, et al. Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade[J]. Am J Physiol, 1993, 264 (5 Pt 2): H1734-H1739.

[7] Leguia M, Wessel G M. The histamine H₁ receptor activates the nitric oxide pathway at fertilization[J]. Mol Reprod Dev, 2006,73:1550-1563.