

# 变应性鼻炎大鼠鼻黏膜中补体调节蛋白 C<sub>1</sub>-INH和 CD46 的表达

郎军添<sup>1\*</sup>, 孙爱华<sup>1</sup>, 范静平<sup>1</sup>, 田树昌<sup>2</sup>, 曹鹏宇<sup>3</sup>, 贾 茹<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院耳鼻咽喉科, 上海 200003; 2. 江苏省扬州市东方医院耳鼻咽喉科, 扬州 225002; 3. 同济大学附属同济医院耳鼻咽喉科, 上海 200065)

**[摘要]** 目的:检测补体调节蛋白 C<sub>1</sub>-INH 和 CD46 在变应性鼻炎大鼠鼻黏膜中的表达水平,探讨其参与变应性鼻炎病理过程的可能机制。方法:9 只 SD 大鼠以 0.1% 卵清蛋白辅以氢氧化铝佐剂进行基础致敏,继之鼻部激发建立大鼠变应性鼻炎模型(AR 组),另 9 只以生理盐水代替 0.1% 卵清蛋白作为对照组(N 组)。取大鼠呼吸区鼻黏膜,采用 Western 印迹法检测组织中补体调节蛋白 C<sub>1</sub>-INH 和 CD46 的表达含量,进行对比。结果:Western 印迹结果显示两组大鼠 C<sub>1</sub>-INH 和 CD46 均阳性表达,而 AR 组大鼠鼻黏膜中 C<sub>1</sub>-INH 表达低于 N 组( $P < 0.05$ ),CD46 表达则高于 N 组,差异显著( $P < 0.01$ )。结论:补体调节蛋白 CD46 和 C<sub>1</sub>-INH 可能参与了变应性鼻炎的病理过程,其调控作用可能与补体激活的经典途径有关。

**[关键词]** 补体调节蛋白;C<sub>1</sub>-INH;CD46;鼻炎,变应性

**[中图分类号]** R 765.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)10-1098-03

## Expression of complement regulatory proteins C<sub>1</sub>-INH and CD46 in nasal mucosa of allergic rhinitis rats

LANG Jun-tian<sup>1\*</sup>, SUN Ai-hua<sup>1</sup>, FAN Jing-ping<sup>1</sup>, TIAN Shu-chang<sup>2</sup>, CAO Peng-yu<sup>3</sup>, JIA Ru<sup>1</sup> (1. Department of Otorhinolaryngology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Oriental Hospital, Yangzhou 225002; 3. Department of Otorhinolaryngology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To determine the expression of complement regulatory proteins (CRPs) C<sub>1</sub>-INH, MCP (CD46) in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats and to study the role of CRPs in the pathogenesis of allergic rhinitis. **Methods:** Nine healthy SD rats were sensitized and intranasally challenged with ovalbumin and Al(OH)<sub>3</sub> (as supplement) to establish allergic rhinitis models and another 9 SD rats treated with saline were taken as control. The nasal mucosa in respiratory area of both groups was obtained. Then Western blotting was performed to investigate the expression levels of C<sub>1</sub>-INH and CD46. **Results:** Western blotting showed that both C<sub>1</sub>-INH and CD46 had been detected in rat nasal mucosa. Expression level of CD46 in the nasal mucosa of allergic rhinitis was significantly higher than that in control rats ( $P < 0.01$ ); whereas the level of C<sub>1</sub>-INH was lower than that in control rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** It is suggested that both C<sub>1</sub>-INH and CD46 may be involved in the pathogenesis of rat allergic rhinitis. The regulatory role of CRPs may be related to the classical pathway of complement activation.

**[KEY WORDS]** complement regulatory protein; C<sub>1</sub>-INH; CD46; rhinitis, allergic

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1098-1100]

补体是机体免疫系统的重要组成部分,近年来,许多文献<sup>[1,2]</sup>报道了补体活化产物(过敏毒素 C<sub>3a</sub> 和 C<sub>5a</sub>) 在 I 型变态反应的病理生理变化中起到了一定作用。补体的活化受到补体调节蛋白(complement regulatory proteins, CRPs, 又称补体激活调节因子)家族的调控,对补体调节蛋白是否参与变应性鼻炎的病理过程国内外尚未见报道。本研究对变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR) 大鼠模型中补体调节蛋白 C<sub>1</sub>抑制物(C<sub>1</sub>-INH)和 CD46(膜辅蛋白, MCP) 的表达水平进行了分析,探讨其参与变应性鼻炎病理过程的可能机制,现报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物模型建立及组织制备 健康 SD 大鼠 18

只购于第二军医大学实验动物中心,雌雄各半,体质量 140~180 g,随机分为实验组(AR 组)和对照组(N 组),每组 9 只。AR 组大鼠参照章如新等<sup>[3]</sup>的方法建立变应性鼻炎模型:以 0.1% 卵清蛋白(OVA, Sigma, 美国) 3 ml/只,辅以氢氧化铝佐剂 30 mg 基础致敏,隔日 1 次腹腔注射共 7 次,然后每日 1 次注射 7 次。末次注射后每日用 2% OVA 滴鼻做局部激发,50 μl/侧,共 7 次。N 组大鼠以生理盐水代替卵清蛋白,其余相同。末次激发后 10 min 内,以 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 腹腔注射麻醉,腹主动脉放血致死,迅速打开鼻背,取鼻腔呼吸区黏

[作者简介] 郎军添,博士,讲师、主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: wolfjt3610@hotmail.com

膜,在 4 ℃ 生理盐水中漂洗,去除附带的骨片及肌肉成分,冲净。随机将一侧鼻黏膜放入无菌 Eppendorf 管中,-196 ℃ 液氮中冻存,另一侧鼻黏膜置于 10% 甲醛溶液中固定行常规 H-E 染色。

1.2 Western 印迹法检测 CRPs 表达 组织放于圆底管中,加入含蛋白酶抑制剂的 Brij 液,打碎匀浆。搅拌充分后,离心 10 min (4 ℃, 16 000 r/min)。将含蛋白的上清液移入冰浴的新管中,进行蛋白质浓度测定(细胞及组织总蛋白抽提试剂盒及生物素标记蛋白分子量标准试剂盒购自康成公司)。制备好分离胶(pH 8.8)和积层胶(pH 6.8),将样品液和标准液分别上样。使用 BioRad 电泳装置,SDS-PAGE 30 mA 4 ℃ 过夜,使蛋白转移于 PVDF 膜上。PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉水溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。TBS/T 洗膜 3 次。封闭过的膜加入一抗(CD46 为人抗鼠, $M_r$ :(52~58) × 10<sup>3</sup>, 1:250, NeoMarkers; C<sub>1</sub>-INH 为羊抗鼠, $M_r$ : 104 × 10<sup>3</sup>, 1:500, Bidesing) 室温孵育 1.5 h, TBS/T 洗膜 3 次。加入 HRP 标记的二抗[CD46 二抗为 Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP, 1:5 000, 康成; C<sub>1</sub>-INH 二抗 Anti-Sheep IgG(H+L)-HRP, 1:1 500, RockLand] 以结合一抗及 HRP 标记的抗体,室温孵育膜 1 h。TBS/T 洗膜 3 次。将膜置 SuperSignal West Pico 化学发光试剂盒(P.B., Rockford, USA)中室温孵育 5 min,显影,成像。图片扫描保存,用 Tanon 软件分析灰度值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 12.0 对结果进行 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 模型的制备情况 AR 组 9 只动物均出现了典型的变应性鼻炎症状,表现为频繁抓鼻、喷嚏,大量清水涕等,症状在滴鼻后持续 3 h 左右逐渐减轻;N 组大鼠仅在滴鼻后出现短暂抓鼻动作。按照安云芳等<sup>[4]</sup>对变应性鼻炎模型的评分,AR 组平均积分为 6.4,明显高于 N 组(积分 1.0,  $P < 0.01$ )。另外,AR 组动物鼻黏膜 H-E 染色显示不同程度组织水肿,血管扩张,肥大细胞和嗜酸性粒细胞在黏膜下和血管周围浸润;N 组无嗜酸性粒细胞浸润(图 1)。

2.2 补体调节蛋白的 Western 印迹检测 AR 组和 N 组大鼠鼻黏膜组织中 C<sub>1</sub>-INH 和 CD46 经 Western 免疫印迹法检测均呈阳性表达(图 2)。AR 大鼠鼻黏膜中 C<sub>1</sub>-INH 表达低于对照组大鼠[(0.39 ± 0.23) vs (0.76 ± 0.33),  $P < 0.05$ ],CD46 表达则高于对照组大鼠[(1.71 ± 0.53) vs (0.52 ± 0.33),  $P < 0.01$ ]。

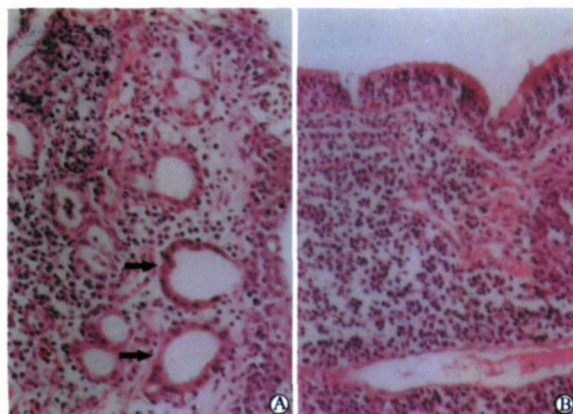


图 1 大鼠鼻黏膜组织 H-E 染色

Fig 1 Nasal mucosal histology of rats (H-E, ×200)

A: Allergic rhinitis group, arrows indicate the edema of mucosa and the dilation of submucosal gland; B: Normal saline control group, there was no significant dilation of submucosal gland

## 3 讨论

CRPs 家族是补体活化的重要调节因子,通过对补体活化的调控而影响补体级联反应的进行。本研究通过对变应性鼻炎大鼠 CRPs 的表达测定,探讨 CRPs 是否通过调控补体活化而参与变应性鼻炎的病理过程。CRPs 家族分为可溶性补体调节蛋白和膜结合补体调节蛋白两类,前者包括 C<sub>1</sub> 抑制物(C<sub>1</sub>-INH)、C<sub>4</sub> 结合蛋白(C<sub>4</sub>bp)、H 因子、I 因子、S 蛋白及备解素(P)等,后者主要有:I 型补体受体(CR1, CD35)、补体第二型受体(CR2, CD21)、衰变加速因子(DAF, CD55)、CD59、C8bp/同源限制因子、CD46 等。补体激活主要有三条途径:补体经典激活途径、替代途径和凝集素途径。关于补体参与变应性疾病究竟通过哪种途径目前尚无定论。本研究选取了分别作用于不同激活途径的两种补体调节蛋白 CD46 和 C<sub>1</sub>-INH 进行检测。

已有研究<sup>[5]</sup>证实 CD46 在新鲜鼻黏膜及培养的上皮细胞有表达。本研究发现 CD46 在 AR 大鼠鼻黏膜中的表达水平明显高于对照组( $P < 0.01$ ),C<sub>1</sub>-INH 的表达则低于对照组( $P < 0.05$ )。CD46 主要作用于替代途径,它具有 I 因子的辅因子活性,可阻断 C<sub>3</sub>b/C<sub>4</sub>b 在细胞膜上的沉积,还可降解 C<sub>3</sub>b 和 C<sub>4</sub>b,从而使 C<sub>3</sub>b/C<sub>4</sub>b 形成 C<sub>3</sub> 转化酶的能力消失<sup>[6,7]</sup>。现有的研究<sup>[8]</sup>显示,C<sub>3</sub>a 及 C<sub>5</sub>a 作为过敏毒素在变应性疾病中具有激活肥大细胞以及炎症细胞趋化等多种作用,而 C<sub>3</sub> 转化酶则是由 C<sub>3</sub> 裂解形成 C<sub>3</sub>a 的重要调控蛋白,CD46 的表达增强可能对 C<sub>3</sub>a 的产生过程起到抑制效应。这种抑制是否是变应性鼻炎 C<sub>3</sub>a 表达增强的负反馈作用尚需进一步研究。

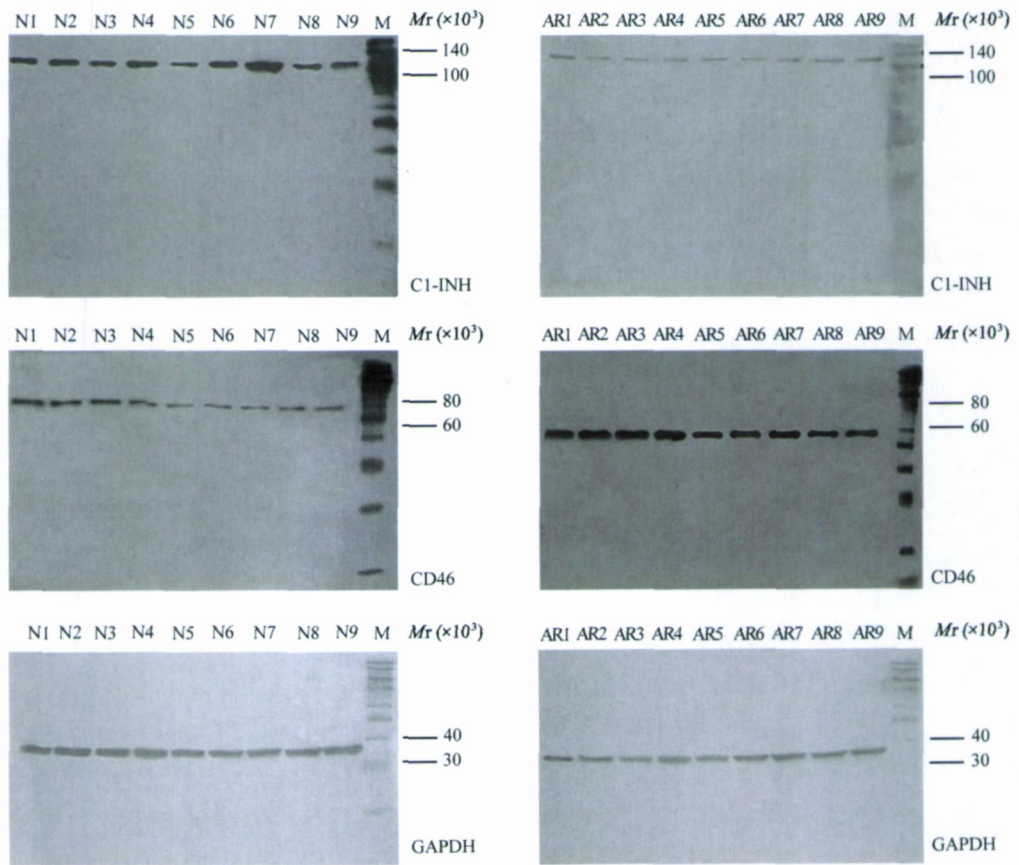


图2 Western印迹检测 C<sub>1</sub>-INH 和 CD46

Fig 2 Western blotting of C<sub>1</sub>-INH and CD46

N1-9: Normal saline control group; AR1-9: Allergic rhinitis group; M: Molecular marker

C<sub>1</sub>-INH 在 C<sub>1</sub>q 与靶分子结合时裂解 C<sub>1</sub> 复合物分子而阻止补体级联反应, C<sub>1</sub>-INH 缺陷最显著的表现是遗传性血管神经性水肿, 可发生上呼吸道的血管高渗透性<sup>[9]</sup>。有报道<sup>[10]</sup> 显示在呼吸道变态反应性疾病患者的血清中 C<sub>1</sub>-INH 水平明显降低, 但尚未见补体成分 C<sub>1</sub> 参与变应性疾病的报道。AR 大鼠鼻黏膜 C<sub>1</sub>-INH 的表达降低, 是否与调控 C<sub>1</sub> 复合物裂解有关尚无法定论, 但这一结果提示 C<sub>1</sub>-INH 很可能通过某种方式直接或间接参与了变应性鼻炎的病理过程。

本研究发现 CD46 与 C<sub>1</sub>-INH 可能参与了大鼠变应性鼻炎的过程, 提示补体活性成分参与变应性鼻炎的病理过程很可能存在有补体调节蛋白的调控机制, 而且 CRPs 的调控作用可能与经典途径关系密切, 可能为变应性鼻炎治疗提供新的思路。

[参考文献]

[1] Gerard NP, Gerard C. Complement in allergy and asthma[J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14:705-708.

[2] Humbles AA, Lu B, Nilsson CA, et al. A role for the C<sub>3</sub>a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma[J]. Nature, 2000, 406:998-1001.

[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] 安云芳, 赵长青, 朱庆义, 等. 变应性鼻炎鼻粘膜 P 物质受体的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33:139-142.

[5] Varsano S, Frolkis I, Shapiro H, et al. Human nasal epithelium adsorbs complement C<sub>3</sub>-related fragments and expresses cell membrane complement regulatory proteins [J]. Laryngoscope, 1996, 106(5 Pt 1): 599-604.

[6] 邵明丽, 俞颂东, 李卫芬, 等. 补体膜辅蛋白的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(S1): 95-97, 101.

[7] Ballard LL, Bora NS, Yu GH, et al. Biochemical characterization of membrane cofactor protein of the complement system[J]. J Immunol, 1988, 141: 3923-3929.

[8] Vogt W. Anaphylatoxins: possible roles in disease[J]. Complement, 1986, 3:177-188.

[9] Pappalardo E, Zingale LC, Terlizzi A, et al. Mechanisms of C<sub>1</sub>-inhibitor deficiency [J]. Immunobiology, 2002, 205:542-551.

[10] Anania A, Massobrio AM, Cascio B, et al. [Components of complement in patients with immediate hypersensitivity][J]. Minerva Med, 1998, 89:77-81.

[收稿日期] 2006-06-20

[修回日期] 2006-09-08

[本文编辑] 贾泽军