

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

王素敏, 郑宏良*, 章如新, 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:**观察豚鼠变应性鼻炎不同病程中鼻黏膜组织一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)含量及血流量的变化及其相互关系,进一步探讨变应性鼻炎的可能发病机制。**方法:**120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、72h处死豚鼠($n=6$),取鼻黏膜组织,免疫组化染色测定其中内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达;采用NO检测试剂盒测定鼻黏膜组织NO含量;各组动物处死前检测鼻黏膜组织血流量。应用直线相关回归分析法分析豚鼠鼻黏膜组织中NO含量与血流量间的相关性。**结果:**激发前及激发后各时间点,致敏组豚鼠黏膜组织中iNOS的表达量明显高于正常对照组($P<0.01$),而eNOS表达无显著差异。激发前致敏组豚鼠鼻黏膜组织中NO含量、鼻黏膜中血流量均明显高于正常对照组($P<0.01$),激发即刻迅速下降至低于正常对照组($P<0.01$),以后呈逐渐回升趋势,72h基本接近激发前水平;而正常对照组各时间点基本无显著差异。致敏组豚鼠鼻黏膜组织中NO含量与鼻黏膜血流量之间有良好的线性关系($r=0.9935, P<0.001$)。**结论:**变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织iNOS蛋白过表达可能导致局部NO含量增多,从而增加局部鼻黏膜组织血流量。

[关键词] 鼻炎,变应性,常年性;鼻黏膜;血流量;一氧化氮

[中图分类号] R 765.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0512-04

Nitric oxide content and blood flow in nasal mucosa of allergic rhinitis guinea pigs

WANG Su-min, ZHENG Hong-liang*, ZHANG Ru-xin, LI Zhao-ji, ZHOU Shui-miao (Department of Otolaryngology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To examine the expression of nitric oxide synthase (NOS), the content of nitric oxide and blood flow in nasal mucosa of allergic rhinitis guinea pigs, so as to further investigate the mechanism of allergic rhinitis. **Methods:** One hundred and twenty guinea pigs were randomly divided into control group (injected with normal saline) and allergic group (nasal challenge with egg albumin). The guinea pigs were executed before and immediately, 24, 48, 72 h after the last nasal challenge; the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the content of nitric oxide were examined in mucosa tissues. The blood flow in the nasal mucosa was determined in animals before execution. Linear regression correlation was used to analyze the relationship between the nitric oxide content and blood flow in nasal mucosa. **Results:** The immunostaining for iNOS in surface epithelium of allergic rhinitis guinea pigs was markedly stronger than that of normal guinea pigs at all time points ($P<0.01$); immunostaining of eNOS was similar in the 2 groups. Compared with those in normal guinea pigs, the content of NO and blood flow increased significantly before the last challenge with allergen ($P<0.01$), decreased significantly immediately after the last nasal challenge ($P<0.01$), and then increased gradually and restored the normal level 72 h later; there was no significant difference in control group before and after challenge. The content of NO and blood flow in nasal mucosa was linearly correlated with each other in allergic group ($P<0.01$). **Conclusion:** Overexpression of iNOS protein in the nasal mucosa of allergic guinea pigs may increase local NO content and subsequently increase the blood flow in local nasal mucosa.

[KEY WORDS] rhinitis, allergic, perennial; nasal mucosa; blood flow; nitric oxide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 512-515]

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,它参与体内的众多病理生理反应;在呼吸系统内,NO可以维持血管平滑肌的张力和气道平滑肌张力,参与局部免疫反应^[1]。变应性鼻炎即过敏性鼻炎是呼吸道最常见的变态反应性疾病,NO在其发病机制中的作用不容忽视。有研究^[2]发现,变应性鼻炎时鼻腔呼出气中NO含量显

著增高,且外源性NO可以增加正常人鼻黏膜血流量。但变应性鼻炎时鼻黏膜中NO含量的变化与鼻

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

黏膜血流量的关系尚未见报道。本实验通过观察豚鼠变应性鼻炎抗原激发前后不同时程鼻黏膜中一氧化氮合酶(NOS)的表达、NO含量及血流量的变化,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 内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)兔抗鼠单克隆抗体、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)兔抗鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 生物技术公司);NO检测试剂盒、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒、蛋白标准液(南京建成生物研究所);721型可见分光光度计(上海跃进医疗仪器厂);LDF-1型激光多普勒血流仪(上海医用激光仪器厂出品)。

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。120只豚鼠随机分成正常组($n=60$)和致敏组($n=60$)。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进行观察和取材。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的NOS(iNOS, eNOS)的表达、NO含量及血流量。

1.3 豚鼠鼻黏膜中iNOS和eNOS蛋白的表达 豚鼠用1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,打开胸腔,纵向切开心包膜,并用纱线在动脉弓下打一松结,将自制的插管经左心室插入主动脉,随即将纱线扎紧固定,再在右心房开一孔放血;先以生理盐水冲洗直至流出的液体不见血时,用4%多聚甲醛固定液灌注,30 min内取出鼻黏膜组织,置入4%多聚甲醛固定液中固定3 h;然后经修整组织块等步骤,石蜡包埋并切片,进一步按照免疫组化试剂盒要求进行免疫组化染色,显微镜下观察,连接计算机图象分

析处理系统,对染色结果进行分析。测量面积为 $22\ 143\ \mu\text{m}^2$,取5个不同部位采样,取平均值。

1.4 豚鼠鼻黏膜组织NO含量的测定 豚鼠断头处死,取双侧鼻黏膜组织,以生理盐水配成10%的匀浆液,4 000 r/min离心,取上清。按NO检测试剂盒说明书的步骤进行测定,测定550 nm光密度值(D)以检测上清NO浓度;395 nm测 D 值以检验样品蛋白浓度。按下列公式计算:蛋白含量(g/L)=(测定管 D_{395} /标准管 D_{395}) \times 标准管浓度(g/L);NO($\mu\text{mol/L}$)=(样品管 D_{550} -空白管 D_{550})/(标准管 D_{550} -空白管 D_{550}) \times 20 $\mu\text{mol/L}$ 标准品浓度/样品的蛋白含量(g/L)。

1.5 豚鼠鼻黏膜血流量的测定 各组动物在处死以前,均先测量鼻黏膜血流量。将激光多普勒血流仪光纤探头垂直轻放于双侧下鼻甲前端黏膜表面(应特别注意光纤探头应放置于有血管通过的位点),探头以轻轻接触为度,记录血细胞流量读数(mV/s),每侧测3次,取平均值。

1.6 统计学处理 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 10.0软件ANOVA分析差异的显著性;采用直线相关回归分析法行相关性分析。

2 结果

2.1 豚鼠鼻黏膜组织中eNOS和iNOS蛋白的表达

正常对照组和致敏组豚鼠鼻黏膜上皮细胞内均有eNOS中等量表达,两组间比较无显著差异;激发后各时间点致敏组eNOS表达与正常对照组无显著差异。正常对照组豚鼠鼻黏膜上皮细胞内有少量iNOS表达,未激发状态下致敏组豚鼠鼻黏膜内iNOS的表达量明显增多($P<0.01$);激发即刻、激发后24、48、72 h致敏组豚鼠鼻黏膜iNOS的表达量明显高于正常对照组($P<0.01$)。见图1、表1。

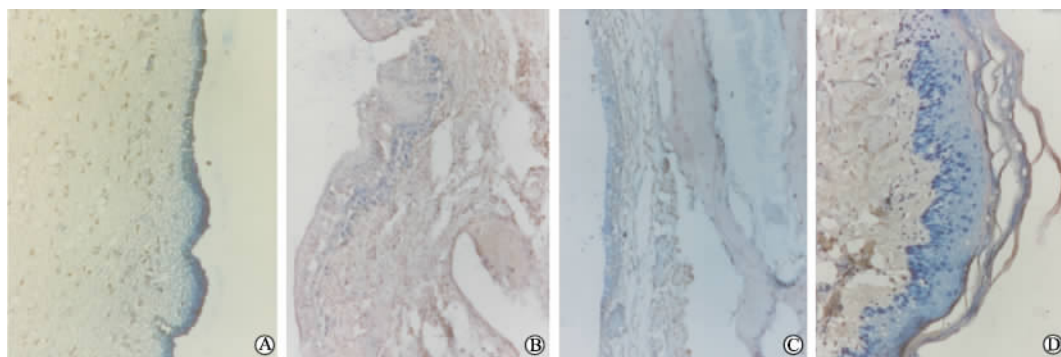


图1 正常对照组(A、C)和致敏组(B、D)豚鼠鼻黏膜上皮细胞内eNOS(A、B)、iNOS(C、D)的表达

Fig 1 Expression of eNOS(A、B) and iNOS(C、D) in nasal epithelium mucosa in control group and allergic group

A、C were in control group; B、D were in allergic group

表 1 激发前及激发后不同时间点致敏豚鼠鼻黏膜 eNOS 与 iNOS 的相对表达量(与正常对照组相比)

Tab 1 Changes of eNOS and iNOS in nasal mucosa at different time points after challenge

(n=6, $\bar{x} \pm s, \%$)

Index	Before challenge	Time after challenge(t/h)			
		0	24	48	72
eNOS	102.78±6.24	104.15±5.54	103.58±6.18	106.46±6.02	101.24±5.89
iNOS	593.28±33.58	586.78±25.55	592.32±31.27	584.21±29.61	588.19±31.82

2.2 豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量的测定 如表 2 所示,激发前致敏豚鼠鼻黏膜中 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,明显低于正常对照组(P<0.01);以后呈逐渐回

升趋势,24 h 后即高于正常对照组(P<0.01),但仍低于激发前(P<0.01);72 h 回升至激发前水平。而激发前后,正常对照组豚鼠鼻黏膜中 NO 含量则无明显变化。

表 2 激发后不同时间点豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量的测定

Tab 2 Changes of NO contents in nasal mucosa at different time points after challenge

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

Group	Before challenge	Time after challenge(t/h)			
		0	24	48	72
Control	29.86±1.05	30.36±1.15	31.02±1.31	30.91±1.28	30.34±1.64
Allergic	55.81±3.01**	25.43±2.12** $\Delta\Delta$	38.45±2.45** $\Delta\Delta$	43.68±2.74** $\Delta\Delta$	54.01±2.89**

** P<0.01 vs control group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs before challenge group

2.3 豚鼠鼻黏膜组织中血流量的变化 如表 3 所示,激发前致敏豚鼠鼻黏膜组织中血流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(P<0.01),仅为激发前的 60%(P<0.01);以后呈逐渐回升趋势,24、48 h 高于正

常对照组(P<0.01),但仍低于激发前(P<0.01);72 h 后回升至激发前的 95%,与激发前无显著差异。而激发前后,正常对照组豚鼠鼻黏膜中血流量无明显变化。

表 3 激发后不同时间点豚鼠鼻黏膜组织血流量的变化

Tab 3 Changes of blood flow in nasal mucosa at different time points after challenge

(n=6, $\bar{x} \pm s, \text{mV/s}$)

Group	Before challenge	Time after challenge(t/h)			
		0	24	48	72
Control	4.34±0.55	4.12±0.63	4.27±0.51	4.32±0.58	4.23±0.64
Allergic	6.37±1.03**	3.78±0.81** $\Delta\Delta$	5.13±0.93** $\Delta\Delta$	5.51±1.02** $\Delta\Delta$	6.02±0.98**

** P<0.01 vs control group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs before challenge group

2.4 致敏豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量与血流量的关系 相关性分析结果表明,致敏豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量与血流量之间有良好的线性关系,相关方程为 $y = 1.3047 + 0.0973x$ ($r = 0.9935$, $P < 0.001$)。

3 讨论

国外研究^[4]表明在正常人的鼻黏膜内主要是以内皮细胞为主的各种细胞表达 eNOS,而在鼻炎患者的鼻黏膜内则主要是以上皮细胞为主的各种细胞表达 iNOS。Lundberg 等^[5]研究发现正常人上颌窦

上皮细胞内有 iNOS 的表达。本实验用免疫组织化学方法,观察正常豚鼠和变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜中 eNOS 和 iNOS 的分布特征。结果表明,正常对照组和致敏豚鼠鼻黏膜组织黏膜上皮细胞内均有 eNOS 中等量阳性染色,两者无明显差异;而 iNOS 在正常对照组豚鼠鼻黏膜中,只有黏膜上皮细胞内有轻度阳性染色,而在致敏豚鼠鼻黏膜呈阳性染色。这说明在正常豚鼠鼻黏膜组织内主要为 eNOS 阳性表达,而在变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织内则主要为 iNOS 阳性表达。国内张辉等^[6]利用原位杂交方法发现, iNOS mRNA 在变应性鼻炎患者黏膜上皮、腺

体及毛细血管均有中度表达,在 mRNA 水平证实变应性鼻炎患者黏膜上皮主要表达 iNOS。

本实验用还原酶法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豚鼠鼻黏膜中 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,以后呈逐渐回升趋势,24 h 后即高于正常对照组;72 h 后回升基本接近于激发前水平。这提示鼻黏膜中 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。Boot 等^[7]研究表明,在变应性鼻炎患者中,鼻内 NO 含量随着疾病发展呈动态变化,但其变化周期较本研究长。最近 Unal 等^[8]发现变应性鼻炎患者血浆中 NO 和精氨酸含量的变化也与变应性鼻炎的症状相关。

变应性鼻炎时鼻黏膜血流量是增加还是减少,目前仍有争议。有研究^[9-10]认为,变应原能刺激变应性鼻炎患者裸露在鼻黏膜表面的 C 类无髓鞘感觉神经末梢,释放神经肽,从而引起鼻黏膜血流量增加。也有不少学者^[11]认为,变应性鼻炎发作时毛细血管内血细胞聚集导致周围血流量减少;同时由于血管通透性增加导致鼻黏膜水肿,使静脉血回流受阻,从而使血流量减少。本研究结果发现,变应性鼻炎豚鼠在未受致敏原激发时鼻黏膜血流量明显高于正常对照组,但受致敏原激发后其鼻黏膜中血流量则迅速下降,以后再逐渐升高,直至激发后 72 h 达到激发前水平。这说明在致敏原激发前后,变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜血流量是一个动态变化过程,提示变应性鼻炎时鼻黏膜血流量随着病情的变化而变化。

Runer 等^[2]对 6 名正常志愿者鼻腔内应用 NO 供体(硝普钠)后,发现鼻腔内 NO 浓度增加(50.1 ± 10.0)%;鼻黏膜血流量也增加了(67.3 ± 15.5)%,分析认为 NO 可能对鼻黏膜血流量有一定的调节作用。本实验采用统计学方法分析致敏组豚鼠鼻黏膜组织中 NO 含量与血流量的关系,结果发现血流量变化与鼻黏膜中 NO 含量的变化呈正相关,表明 NO 可能参与了变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜血流量的调节过程。这提示变应性鼻炎时鼻黏膜血流量的变化与鼻黏膜中 NO 含量有关,NO 可能通过调节鼻黏膜血流量的变化来参与变应性鼻炎的发病过程,与

Runer 等^[2]的研究结果一致。

本研究结果表明,变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜中 eNOS 表达无明显变化,iNOS 表达明显增多,与 Chiba 等^[12]的研究结果类似,提示鼻黏膜中 NO 含量增多可能与 iNOS 过表达有关。变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜组织 iNOS 蛋白过表达可能导致局部 NO 含量增多,从而增加局部鼻黏膜组织血流量。而 NO 与 iNOS 的具体相关性有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Rossaint R, Falke K J, Lopez F, et al. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 1993,328: 399-405.
- [2] Runer T, Lindberg S. Effects of nitric oxide on blood flow and mucociliary activity in the human nose[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1998, 107: 40-46.
- [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] Furukawa K, Harrison D G, Saleh D, et al. Expression of nitric oxide synthase in the human nasal mucosa[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153: 847-850.
- [5] Lundberg J O, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, et al. High nitric oxide production in human paranasal sinuses[J]. *Nat Med*, 1995, 1: 370-373.
- [6] 张辉,张大良,李瑞峰,等. 变应性鼻炎患者外周血白细胞及鼻黏膜诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的意义[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2003, 38: 32-34.
- [7] Boot J D, de Kam M L, Mascelli M A, et al. Nasal nitric oxide: longitudinal reproducibility and the effects of a nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2007, 62: 378-384.
- [8] Unal M, Eskandari H G, Ercetin N, et al. Serum nitrite/nitrate and arginase levels in patients with allergic rhinitis[J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2007, 69: 113-115.
- [9] 章如新,江德胜,李兆基,等. 变应性鼻炎患者血浆中 P 物质及鼻黏膜血流量的变化[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1993, 28: 72-73.
- [10] 章如新,江德胜,李兆基,等. 变应性鼻炎患者血浆中血管活性肠肽的研究[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1993, 28: 165-166.
- [11] 柳端今,赵燕玲,周渊,等. 鼻粘膜微区血流量测定[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1994, 29: 366-367.
- [12] Chiba Y, Matsuo K, Sakai H, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in nasal mucosae of guinea pigs with induced allergic rhinitis[J]. *Am J Rhinol*, 2006, 20: 336-341.

[收稿日期] 2007-03-10

[修回日期] 2007-04-29

[本文编辑] 贾泽军