

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.28.005

变应性鼻炎新西兰兔静脉血中 CRLR 和 CGRP-RCP 的表达及变化研究*

祝 涵, 刘强和[△]

(桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科/桂林医学院耳鼻咽喉科学研究所, 广西桂林 541001)

[摘要] **目的** 观察新西兰兔变应性鼻炎模型静脉血中降钙素受体样受体(CRLR)、降钙素基因相关肽受体组分蛋白(CGRP-RCP)的表达及变化,分析其作用机制。**方法** 24只新西兰兔分为正常对照组(A组)和变应性鼻炎组(B组)。用卵清蛋白(OVA)致敏新西兰兔并行鼻腔激发刺激,制作变应性鼻炎模型。观察两组新西兰兔行为改变,并取其鼻甲及鼻中隔黏膜制作HE切片,观察新西兰兔鼻腔黏膜病理改变。收集静脉血,采用ELISA检测血清中CRLR、CGRP-RCP的水平变化。**结果** 行为学评分显示:两组新西兰兔在鼻腔激发后第1~5天的行为学评分比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE染色显示:A组鼻腔黏膜及间质稍水肿血管轻度增生、充血,炎性细胞浸润不明显,少量鼻分泌物;B组间质内水肿明显,血管增生、充血,可见大量嗜酸性粒细胞和其他炎性细胞浸润。B组CRLR、CGRP-RCP水平较A组明显增高($t = 5.143, 10.595, P < 0.05$)。**结论** CRLR、CGRP-RCP在变应性鼻炎的发病机制中可能起着重要作用。

[关键词] 降钙素受体样受体;降钙素基因相关肽受体组分蛋白;变应性鼻炎;酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R765.21

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)28-3903-03

Study on expression and change of CRLR, CGRP-RCP in venous blood of New Zealand rabbit with allergic rhinitis*

Zhu Han, Liu Qianghe[△]

(Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College / Otorhinolaryngology Institute of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expressions and change of calcitonin receptor-like receptor(CRLR) and calcitonin gene-related peptide receptor component protein(CGRP-RCP)in venous blood of New Zealand rabbit with allergic rhinitis and to analyze its effective mechanism. **Methods** Twenty-four New Zealand rabbits were divided into the normal control group(A) and allergic rhinitis group(B). Ovalbumin was used to immunize New Zealand rabbits and conduct the nasal cavity stimulation for preparing allergic rhinitis model. The rabbit behavior change was observed in the two groups. The turbinate and nasal septum mucosa were taken for preparing HE sections. The pathologic change of nasal mucosa was observed. The venous blood was collected for detecting CRLR and CGRP-RCP levels change by ELISA. **Results** The behavior scores showed that the behavior score on 1-5 d after nasal cavity stimulation had statistical difference between the two groups($P < 0.05$). The HE staining displayed that the nasal cavity mucosa and mesenchyma had slightly edema with blood vessels mild hyperplasia and congestion, the inflammatory cells infiltration was unobvious, and had little nasal secretions. The group B had obvious interstitial edema, vascular hyperplasia, congestion and a large number of eosinophils and other inflammatory cells infiltration. The CRLR and CGRP-RCP levels in the group B were significantly increased compared with the group A($t = 5.143, 10.595, P < 0.05$). **Conclusion** CRLR and CGRP-RCP may play an important effect in pathogenesis of allergic rhinitis.

[Key words] calcitonin receptor-like receptor ; calcitonin gene-related peptide receptor component protein; allergic rhinitis; ELISA

变应性鼻炎是易感个体接触变应原后,主要由免疫球蛋白E(IgE)介导,发生在鼻黏膜的变态反应性疾病,以喷嚏、流清涕和鼻塞等为主要特点^[1]。变应性鼻炎的发病率逐年增高,其全球患病率为10%~25%。20%~30%的变应性鼻炎患者常伴有哮喘,不仅影响患者鼻部症状,还与抑郁情绪相关,严重影响患者的日常生活和社会交际^[1-2]。大量文献报道,感觉神经肽与变应性鼻炎的发生、发展密切相关^[3]。降钙素基因相关肽(calcitonin in gene-related, CGRP)是一个含37个氨基酸残基的敏感感觉神经肽的重要肽类递质,是目前已知的最强内源性

扩血管肽。而CGRP的功能主要由相应的受体介导,它的功能多样性可能与受体跨膜信号转导相关^[4]。降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)是CGRP的一个重要受体之一, CRLR是7次跨膜的G蛋白偶联受体蛋白,有3种形式存在($110 \times 10^3, 66 \times 10^3, 50 \times 10^3$)。CRLR本身无生物活性,只能单独转染CRLR基因,只有与活性修饰蛋白结合时,才能发挥其功能^[5]。降钙素基因相关肽受体组分蛋白(calcitonin in gene-related receptor component protein, CGRP-RCP)也是CGRP的受体之一,它是与降钙素基因相关肽受体

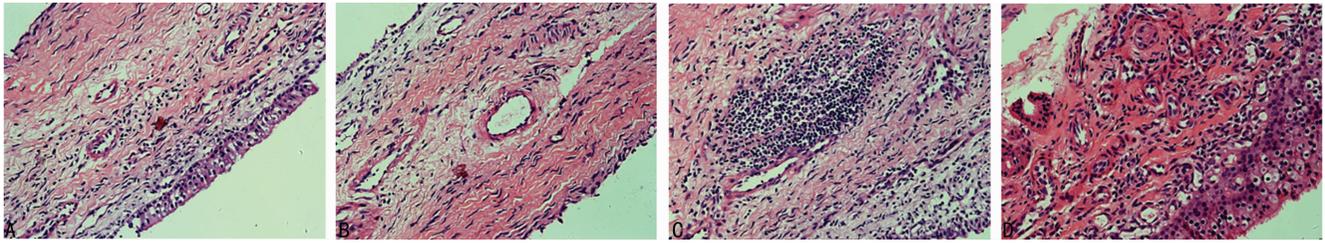
* 基金项目:人口健康安全技术开发与应用研究(20130120-6)。

作者简介:祝涵(1989-),医师,硕士,主要从事变应性鼻炎的基础与临床

研究。△ 通信作者, E-mail: lqh@glmc.edu.cn。

表 1 两组新西兰兔鼻腔激发后 5 d 行为学评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
A 组	12	2.313±0.265	2.155±0.058	2.054±0.069	2.054±0.069	2.232±0.285
B 组	12	5.339±0.106	5.458±0.067	5.714±0.094	5.910±0.094	6.046±0.046



A、B: A 组; C、D: B 组

图 1 两组 HE 染色($\times 400$)

的活性相关的一个辅助蛋白质, CGRP 携带的信息进入细胞内极可能与 CGRP-RCP 的作用相关联^[5]。本实验拟通过制作变应性鼻炎新西兰兔模型, 观察其静脉血中 CRLR、CGRP-RCP 表达及变化, 探讨其与变应性鼻炎发病的相关性。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及分组 雄性新西兰兔 24 只, 月龄 5 个月, 体重 2.0~2.5 kg, 由桂林医学院动物实验研究中心提供。分为正常对照组(A 组)、变应性鼻炎组(B 组), 每组 12 只。单笼饲养, 自由饮水和摄食, 光照明暗周期 12 h, 室温 20~25℃, 湿度 40%~60%, 饲养于桂林医学院动物实验研究中心。

1.2 实验仪器及试剂 显微镜(德国蔡司公司, 型号 Axio Imager Z2)、CRLR 酶联免疫试剂盒(BlueGene Biotech company)与 CGRP-RCP 酶联免疫试剂盒(BlueGene Biotech company)、伯乐 680 酶标仪。

1.3 方法

1.3.1 模型建立 变应性鼻炎模型制作^[6-7]。基础致敏期: 用卵清蛋白(OVA)1.5 mg 作抗原, 氢氧化铝 60 mg 作佐剂, 加生理盐水 2 mL 制成混悬液, 对每只新西兰兔腹腔注射, 每隔 1 日 1 次, 共 7 次。激发期: 于第 15 天起每天用 1% OVA 溶液每侧滴鼻 0.1~0.2 mL 激发过敏症状 1 次, 共 5 次。前 14 d A 组新西兰兔同期隔日用 2 mL 生理盐水进行腹腔注射; 第 15 天起每天用 1% OVA 溶液每侧滴鼻 0.1~0.2 mL 激发 1 次, 共 5 次。

1.3.2 行为学评分 每次鼻腔激发后, 立刻观察 30 min, 采用叠加量化计分法计分, 总分大于 5 分, 说明造模成功。0 分为无抓鼻、无喷嚏、无鼻涕; 1 分为轻度抓鼻, 打 1~3 个喷嚏, 鼻涕留至前鼻孔; 2 分为频繁抓鼻, 打 4~10 个喷嚏, 鼻涕超出前鼻孔; 3 分为抓鼻不止, 打 10 个喷嚏以上, 涕流满面。

1.3.3 标本采集 在新西兰兔股静脉处取血。消毒新西兰兔耳缘静脉周围皮肤, 用 1% 戊巴比妥(3 mL/kg)进行耳缘静脉麻醉, 新西兰兔出现角膜反射明显迟钝及瞳孔缩小, 说明麻醉适度。随后先做股静脉暴露分离手术, 然后注射器平行于血管从股静脉下端向心脏方向刺入, 最后用真空负压抗凝管分别抽取 2 mL 血液。室温放置 2 h 后, 3 000 转离心 10 min 将血清和红细胞迅速小心分离, 取血清, 置于-76℃冰箱中待测。

1.3.4 组织病理学检查 两组新西兰兔在耳缘静脉注入 10

mL 空气处死, 并取鼻甲和鼻中隔黏膜放入 10% 中性甲醛固定、脱水透明、浸蜡包埋、切片(5~8 μm)、脱蜡、HE 染色、脱水透明、固封。光学显微镜下观察, 数码拍照, 用图像分析系统(Image-ProPlus6.0)对每张切片在 40 倍显微镜下分别选取 3 个视野, 分别于 400 倍镜下观察。

1.3.5 ELISA 进行标本检测 ELISA 操作按试剂盒说明书进行, 用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度值(A 值), 根据标准品定制和 A 值间的对应关系建立标准曲线, 计算标本中 CRLR、CGRP-RCP 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分 鼻腔激发开始后, B 组新西兰兔出现抓鼻、喷嚏、流涕症状, 且随着激发天数的增长, 上述症状逐渐加重, 总分均大于 5 分, 造模成功; A 组新西兰兔仅出现轻微症状。两组行为学评分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 HE 染色切片观察 A 组鼻腔黏膜及间质稍水肿, 血管轻度增生、充血, 炎性细胞浸润不明显, 少量鼻分泌物。B 组间质内水肿明显, 血管增生、充血, 可见大量嗜酸性粒细胞和其他炎性细胞浸润。见图 1。

2.3 ELISA 检测 B 组 CRLR、CGRP-RCP 水平较 A 组明显增高($t=5.143, 10.595, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组血清中 CRLR、CGRP-RCP 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CRLR(pg/mL)	CGRP-RCP(pg/mL)
A 组	12	36.159±3.723	10.986±0.869
B 组	12	48.200±1.600	28.096±2.659

3 讨论

变应性鼻炎是指鼻腔黏膜对免疫性(变应原)刺激因子过度敏感产生的超出正常生理范围的过强反应, 是一种只有免疫学机制诱发的鼻炎, 其发病机制复杂^[8]。变应性鼻炎已成为一个全球范围内引发关注的健康问题, 同时其治疗也是一个世界性难题, 到目前为止仍没有有效根治的方法。

呼吸区鼻黏膜是整个机体黏膜免疫系统的主要部位之一,

具有预处理吸入空气的作用,构成了呼吸道第一道屏障。鼻黏膜含有大量的血管和腺体,受丰富的感觉神经和自主神经末梢支配,感觉神经纤维、交感神经纤维和副交感神经纤维在鼻腔内形成一个巨大的网络保护,使鼻腔黏膜免受内部及外部刺激。机体通过神经-免疫和内分泌途径产生生理反应和免疫应答,来维持上呼吸道内环境的平衡。这些生理性机制在很大程度上受神经调控,如神经反射释放的肽类物质(CGRP)可通过其受体(CRLR、CGRP-RCP)作用于其靶点,从而产生调节鼻黏膜作用^[9-10]。大量文献也证实了变应性鼻炎是一种神经性炎症^[11]。CGRP是由感觉神经末梢释放的含有37个氨基酸的神经肽,广泛分布于人体中枢神经系统和外周血管组织,具有舒张血管的作用,并参与神经调节^[12]。目前发现CGRP受体由3个组分组成,分别为CRLR、受体活性修饰蛋白质1(RAMP1)和受体组分蛋白质(RCP)^[13-14]。CRLR是7次跨膜的G蛋白偶联受体蛋白,经CGRP激活后,CRLR被磷酸化,从而CGRP通过磷酸化的CRLR而传递进入胞内,进行下游应答,CRLR的增加增强了CGRP的应答作用^[15]。其中CGRP-RCP是一个含148个氨基酸残基的胞内膜蛋白,增强了根据现有文献表明,其作用可能是通过激活CRLR,从而促进受体与效应分子结合,CGRP-RCP也可能起一个桥梁作用,连接受体与效应分子,从而参与信号转导^[16]。本实验显示,鼻腔激发开始后,B组新西兰兔出现抓鼻、喷嚏、流涕症状,且随着激发天数的增长,上述症状逐渐加重,总分均大于5分,造模成功;A组新西兰兔仅出现轻微症状。两组行为学评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。A组鼻腔黏膜及间质稍水肿,血管轻度增生、充血,炎性细胞浸润不明显,少量鼻分泌物。B组间质内水肿明显,血管增生、充血,可见大量嗜酸性粒细胞和其他炎性细胞浸润。B组CRLR、CGRP-RCP水平较A组明显增高($t = 5.143, 10.595, P < 0.05$)。证明了CRLR、CGRP-RCP可能参与了变应性鼻炎的发生。

参考文献

- [1] Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease[J]. *Nature Med*, 2012, 18(5): 693-704.
- [2] Takemura M, Inoue D, Takamatsu K, et al. Co-existence and seasonal variation in rhinitis and asthma symptoms in patients with asthma[J]. *Respir Investig*, 2016, 54(5): 320-326.
- [3] 刘军, 耿宛平, 刘强和. 鼻黏膜神经肽在过敏性鼻炎中的作用[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3278-3280.
- [4] Kashiwabara M, Asano K, Mizuyoshi T, et al. Suppression of neuropeptide production by quercetin in allergic rhinitis model rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016(16): 132.
- [5] 秦旭平, 李元建. 降钙素基因相关肽受体重构及其信号跨膜转导[J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(2): 121-126.
- [6] 张丽, 杜经纬, 王丽洪, 等. 豚鼠和新西兰兔变应性鼻炎模型建立及比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(3): 335-338.
- [7] Kim YH, Yang TY, Park CS, et al. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis[J]. *Allergy*, 2012, 67(2): 183-190.
- [8] Gould HJ, Takhar P, Harries HE, et al. Germinal-centre reactions in allergic inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(10): 446-452.
- [9] 阎艾慧, 韩佳利. 变应性鼻炎的临床特点与诊断[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2016, 30(4): 7-9.
- [10] Fischer A, Wussow A, Cryer A, et al. Neuronal plasticity in persistent perennial allergic rhinitis[J]. *J Occup Environ Med*, 2005, 47(1): 20-25.
- [11] Knipping S, Holzhausen HJ, Riederer A, et al. Allergic and idiopathic rhinitis: an ultrastructural study[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009, 266(8): 1249-1256.
- [12] Filiz A, Tepe N, Boran E, et al. CGRP receptor antagonists attenuate pain behavior induced by cortical spreading depression in freely moving rats[J]. *J Head Pain*, 2014, 15(1): 1.
- [13] Cottrell GS, Alemi F, Kirkland JG, et al. Localization of calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) in human gastrointestinal tract[J]. *Peptides*, 2012, 35(2): 202-211.
- [14] 唐江琼, 秦旭平. 降钙素基因相关肽受体组分蛋白[J]. *生命的化学*, 2011, 31(2): 277-280.
- [15] Dong Y, Chauhan M, Balakrishnan M, et al. CGRP rescues proximity associations of CRLR with RAMP1 in rat uterine artery smooth muscle cells exposed to TNF- α [J]. *Am J Obst Gynecol*, 2016, 214(1): S309-310.
- [16] M Dickerson I. Role of CGRP-receptor component protein (RCP) in CLR/RAMP function[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14(5): 407-415.

(收稿日期: 2017-04-12 修回日期: 2017-06-08)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读者发送终末动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读者免费阅读。读者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“ChongqingMedicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。