

本文引文格式:郑少川,瞿申红,张少杰,等.紧密连接相关蛋白在变应性鼻炎小鼠模型中的表达研究[J].右江民族医学院学报,2023,45(2):237-241.

【论著与临床报道】

紧密连接相关蛋白在变应性鼻炎小鼠模型中的表达研究

郑少川^{1,2},瞿申红²,张少杰²,钟自玲²,张力行³,程熹乔²,莫丽萍²,吴迪²

(1. 右江民族医学院,广西 百色 533000;

2. 广西壮族自治区人民医院耳鼻咽喉头颈科,广西 南宁 530000;

3. 广西壮族自治区人民医院病理科,广西 南宁 530000)

摘要:目的 研究紧密连接相关蛋白在变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)小鼠模型中的表达变化,并初步探究其与羧肽酶 A3 之间的联系。方法 使用卵清蛋白致敏小鼠建立 AR 的小鼠模型,在最后 1 次鼻腔激发后观察小鼠行为学变化,收集小鼠血清和鼻黏膜组织,通过常规病理、免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 技术来评估小鼠鼻黏膜羧肽酶 A3 及紧密连接相关蛋白的表达变化。结果 AR 组小鼠表现出明显的打喷嚏和抓鼻症状;与 Control 组相比,AR 组小鼠羧肽酶 A3 表达显著上升($P < 0.001$),而 Claudin-1、Claudin-4 和 JAM-A 表达较 Control 组降低($P < 0.05$)。结论 羧肽酶 A3 可能通过鼻黏膜紧密连接的破坏参与 AR 的发病。

关键词:鼻炎,变应性;上皮屏障;紧密连接部;羧肽酶 A3

中图分类号:R765.21

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)02-0237-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.02.012

Expression of tight junction proteins in mice with allergic rhinitis

Zheng Shaochuan^{1,2}, Qu Shenhong², Zhang Shaojie², Zhong Ziling²,
Zhang Lixing³, Cheng Xiqiao², Mo Liping², Wu Di²

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Department of Otolaryngology, Head and Neck, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, Guangxi, China;

3. Department of Pathology, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of tight junction proteins in mice with allergic rhinitis (AR), and to explore the relationship between tight junction proteins and carboxypeptidase A3. **Methods** Ovalbumin sensitized mice were used to establish the AR mouse models, and behavioral changes of mice were observed after the last nasal stimulation. Serum and nasal mucosa of mice were collected. The expression changes of tight junction proteins and carboxypeptidase A3 in nasal mucosa of mice were evaluated by routine pathology, immunohistochemistry and real-time quantitative PCR. **Results** The mice in AR group showed obvious symptoms of sneezing and scratching nose. Compared with the control group, the expression of carboxypeptidase A3 in AR group significantly increased ($P < 0.001$), while the expressions of Claudin-1, Claudin-4 and JAM-A decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Carboxypeptidase A3 may be involved in the pathogenesis of AR through the destruction of tight junction proteins of nasal mucosa.

Key words: rhinitis, allergic; epithelial barrier; tight junction; carboxypeptidase A3

基金项目:国家自然科学基金项目(81960186)

第一作者简介:郑少川(1996-),男,在读硕士研究生,研究方向:变应性鼻炎鼻黏膜上皮屏障修复研究,E-mail:2628227214@qq.com

通讯作者简介:瞿申红(1975-),男,医学博士,主任医师,研究方向:变应性鼻炎的基础与临床研究,E-mail:2510243342@qq.com

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是耳鼻咽喉科的常见疾病,影响全球10%~40%的人口,在世界范围内造成巨大的医疗负担^[1-2]。AR的发病机制涉及Th1/Th2细胞失衡^[3]、炎症细胞的激活和IgE所介导的免疫反应^[4-5]。羧肽酶A3(carboxypeptidase A3, CPA3)是一种含锌蛋白水解酶,由肥大细胞合成并存储于分泌颗粒中,并随肥大细胞脱颗粒而释放至鼻腔黏膜^[7]。多项研究支持CPA3参与了变应性气道疾病的发生与发展^[8-9]。呼吸上皮能为机体提供物理、功能和免疫屏障,使得机体免受外界有害物质的伤害,紧密连接(tight junction, TJ)是消化道及呼吸道黏膜上皮的强细胞间连接^[10],黏膜紧密连接的破坏是变应性疾病发生与发展的重要原因^[11-12]。在本研究中,我们构建了卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的小鼠AR模型,通过常规病理、免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)和实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)等技术来评估小鼠鼻黏膜炎症程度及紧密连接相关蛋白的表达变化,并初步探究其与CPA3之间的联系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6周龄雌性Balb/c小鼠28只,体重约为13~17g,购买于广东维通利华实验动物技术有限公司,并饲养在广西医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 见表1。

表1 实验使用的主要试剂

试剂名称	生产公司
ovalbumin(OVA)	美国Sigma公司
氢氧化铝混合液	美国 ThermoFisher Scientific公司
2X SG Fast qPCR Master Mix (Low Rox)	上海 Sangon Biotech公司
MightyScript First Strand cDNA Synthesis Master Mix	上海 Sangon Biotech公司
HE染液	武汉 Servicebio公司
PAS染液	武汉 Servicebio公司
甲苯胺蓝染液	武汉 Servicebio公司
Anti-Junctional Adhesion Molecule 1/JAM-A抗体	英国 Abcam公司
Anti-ZO1 tight junction蛋白抗体	英国 Abcam公司

1.3 模型建立 将小鼠随机分成Control组和AR组,基础致敏阶段:AR组小鼠于第1天、第8天、第15天腹腔注射25 μL OVA(1%)和25 μL氢氧化铝混合液,激发阶段:在第22天~第28天使用1% OVA进行滴鼻激发,1次/日,每侧鼻孔15 μL,Control组用等量的PBS替换OVA进行基础致敏和激发。在最后一次滴鼻激发24h后处死小鼠,收集小鼠血清和鼻黏膜组织待后续实验。

1.4 行为学观察 最后1次经鼻PBS或OVA激发后,使用盲法由两名观察者记录小鼠的抓鼻及打喷嚏的次数,每只小鼠观察15min。

1.5 RT-qPCR检测 体式显微镜下剥离小鼠鼻黏

膜,运用传统Trizol法提取鼻黏膜总RNA,使用MightyScript第一链cDNA合成Master Mix进行RNA反转录,使用2X SG Fast qPCR预混液(低Rox)进行基因扩增。相关引物序列,见表2。

表2 相关引物序列

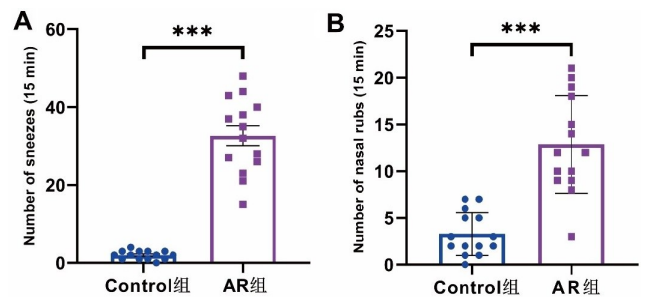
目的基因	引物序列
CPA3	F:5'-GTCACCAACTTCATTCGAAGCC-3' R:5'-TCCTTGCAACTTTCAATAGGTCC-3'
claudin 1	F:5'-CCTGGCTTCTCTGGGATGGA-3' R:5'-AGGACATCCACAGTCCCTCG-3'
claudin 4	F:5'-CCACTCTGTCCACATTGCCT-3' R:5'-CTTTGCACAGTCCGGGTTTG-3'

1.6 组织病理学 取小鼠鼻部,仔细剔除鼻骨周围软组织,随后经过脱钙、固定、常规包埋和切片后,再进行PAS、HE、IHC及甲苯胺蓝染色。

1.7 统计学方法 数据采用GraphPad Prism 8软件进行分析,结果以($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均先进行正态性检验,符合正态性分布的数据采用 t 检验,对于偏态分布的数据,采用Mann Whitney U 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。最后使用GraphPad Prism 8和Adobe Illustrator 2022软件进行作图。

2 结果

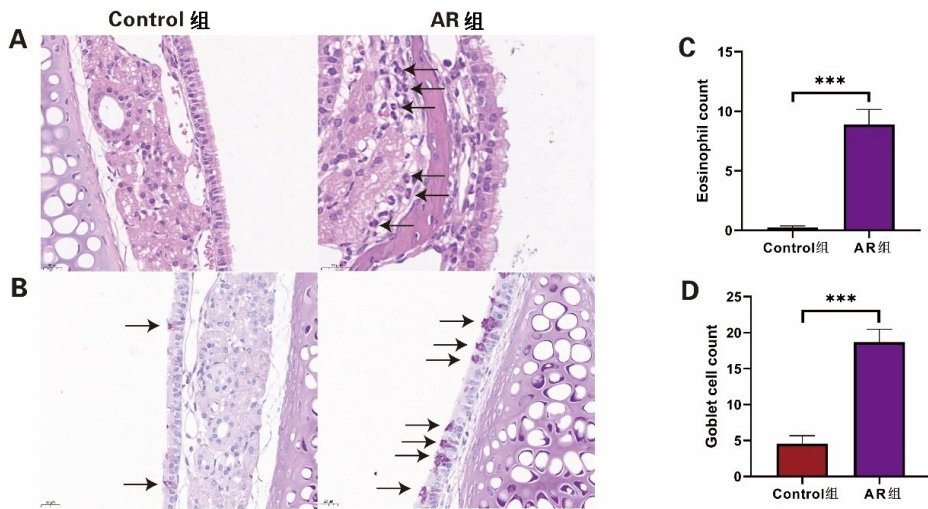
2.1 小鼠行为观察 为了确定鼻腔症状的变化,观察了最后一次滴鼻激发后小鼠的打喷嚏和抓鼻频率,发现AR小鼠表现出明显的打喷嚏和抓鼻频率,与Control组相比差异有统计学意义($P < 0.001$),见图1。



注:A.打喷嚏次数;B.抓鼻次数。*** $P < 0.001$ 。

图1 小鼠行为观察

2.2 OVA的经鼻激发诱导了鼻腔嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞增生 完整的纤毛有助于鼻腔分泌物的正常排出,与Control组相比,AR组小鼠鼻黏膜纤毛排列紊乱,部分黏膜出现纤毛缺失。通过ImageJ对鼻黏膜HE染色和PAS染色进行评估,结果显示AR组小鼠鼻黏膜出现了明显的嗜酸性粒细胞浸润(见图2A),杯状细胞显著增生、肥大(见图2B),其中杯状细胞主要在中鼻甲和鼻中隔中下部的黏膜表层,而嗜酸性粒细胞则弥散浸润在鼻黏膜的固有层。

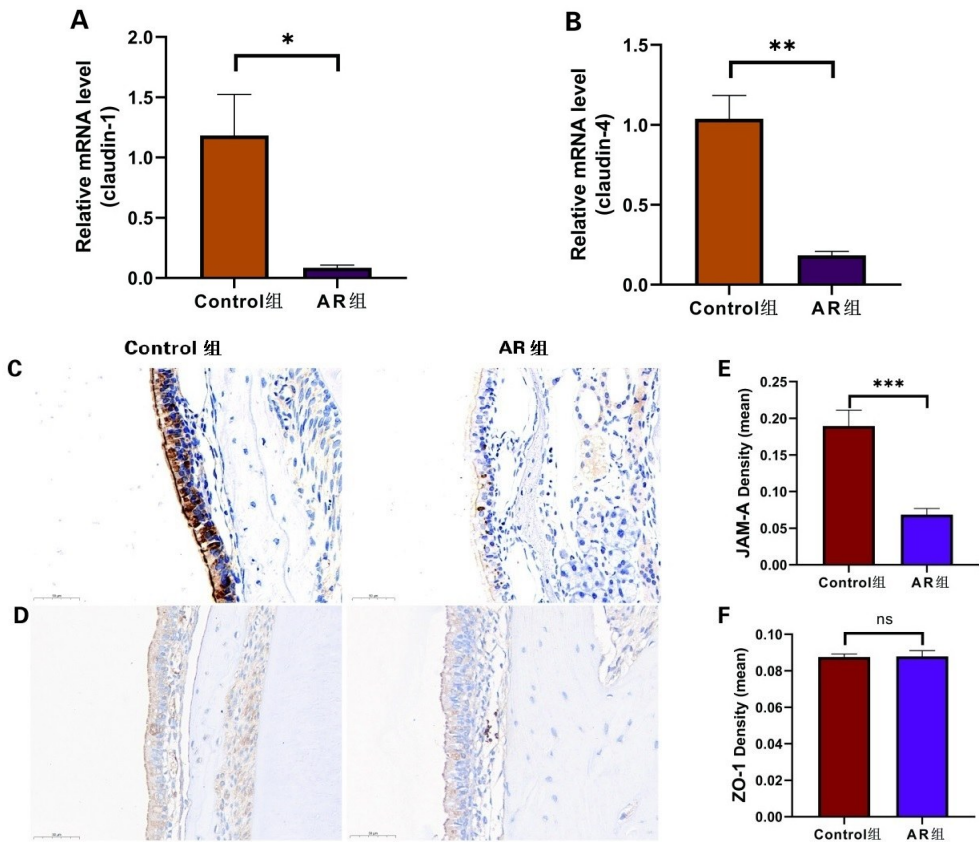


注:A, Control 组和 AR 组的 HE 染色, 箭头所示为嗜酸性粒细胞; B, Control 组和 AR 组的 PAS 染色, 箭头所示为杯状细胞; C, 每个随机视野嗜酸性粒细胞计数; D, 每个随机视野杯状细胞计数。*** $P < 0.001$ 。

图 2 小鼠鼻黏膜组织学改变(原始放大倍数 400×)

2.3 小鼠鼻黏膜中 Claudin-1、Claudin-4、JAM-A 及 ZO-1 的表达 为了评估 OVA 诱导的鼻腔炎症对鼻黏膜紧密连接及其相关蛋白的影响, 评估了 Claudin-1、Claudin-4、JAM-A 及 ZO-1 的表达变化, 与 Control

组相比, AR 组鼻黏膜 Claudin-1、Claudin-4 基因表达水平显著下降(见图 3A、图 3B), 且 JAM-A 的蛋白表达水平显著低于 Control 组(见图 3C、图 3E), 但并未观察到 ZO-1 蛋白表达的显著改变(见图 3D、图 3F)。



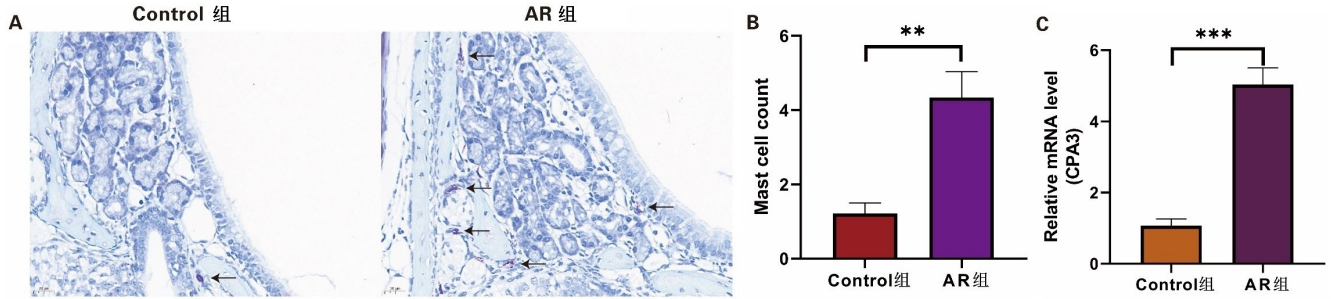
注: A 和 B 分别为小鼠鼻黏膜 Claudin-1、Claudin-4 相对基因表达; C 和 D 分别为 JAM-A 和 ZO-1 的免疫组织化学染色(原始放大倍数 400×); E 和 F 分别为 JAM-A 和 ZO-1 的平均光密度值定量。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns: 无意义。

图 3 小鼠鼻黏膜紧密连接相关蛋白的表达

2.4 小鼠鼻黏膜肥大细胞浸润及 CPA3 表达的变化

为了评估肥大细胞的浸润情况,使用甲苯胺蓝对鼻黏膜组织切片进行染色,发现 AR 组鼻腔黏膜固有层大量的肥大细胞浸润(见图 4A),肥大细胞的数量明显

大于 Control 组(见图 4B),差异有统计学意义($P < 0.01$)。对鼻黏膜组织进行 RT-qPCR 检测后发现 AR 组 CPA3 mRNA 表达显著高于 Control 组(见图 4C)。



注:A.小鼠鼻黏膜甲苯胺蓝染色,箭头所示为肥大细胞(原始放大倍数400×);B.每个随机视野肥大细胞计数;C.鼻黏膜CPA3的相对表达量。*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$

图4 小鼠鼻黏膜肥大细胞及CPA3表达的变化

3 讨论

AR是一种常见的鼻黏膜过敏性疾病,症状包括鼻痒、鼻塞、流涕和打喷嚏^[13],影响到全球10%~40%的人口,而且通常会持续一生,严重影响患者的学习、工作和生活^[14]。AR的发病是一个复杂的过程,研究表明Th1/Th2细胞失衡^[13]、多种炎症细胞的活化和IgE所介导的免疫反应均参与其中^[4-5]。羧肽酶A3是一种含锌蛋白水解酶,由肥大细胞合成并存储于分泌颗粒中,并随肥大细胞脱颗粒而释放至鼻腔黏膜^[7],多项研究支持CPA3参与了变应性气道疾病的发生与发展^[8-9],但具体机制尚未明确。有研究表明具有蛋白酶活性的日本雪松导致了鼻黏膜上皮屏障的破坏,并证明了重组蛋白酶抑制剂rhCystatin SN可以逆转上皮屏障的损伤^[15],因此CPA3的鼻黏膜释放可能是上皮屏障损伤的重要原因之一。呼吸上皮提供物理、功能和免疫屏障,保护机体免受吸入环境颗粒的潜在伤害^[10],当上皮屏障受到损害时,可能会激活针对外源性过敏原、微生物和污染物的免疫炎症反应,反复的外源性刺激导致了鼻黏膜的慢性炎症,而黏膜下炎症本身将继续维持上皮屏障的受损和开放状态,使得机体持续受到过敏原、污染物、微生物及其酶和毒素等的持续伤害,导致恶性循环^[16]。TJ是消化道及呼吸道黏膜上皮的强细胞间连接,是细胞旁通透性的关键调控因子,在对吸入的病原体产生限速屏障方面至关重要^[10]。TJ包括跨膜蛋白和胞内蛋白,TJ跨膜蛋白主要包括Claudins、Occludin、junctional adhesion molecules (JAMs),负责在细胞间隙建立强连接。TJ胞质蛋白主要包括ZO-1、ZO-2、ZO-3、MUPP-1、PAR-3、PAR-6等,主要作用是作为与肌动蛋白细胞骨架连接的媒介^[17]。本研究成功建立了OVA诱导的典型

AR小鼠模型,模型组小鼠具有明显的打喷嚏及抓鼻子等AR症状。有研究表明Th2型细胞因子会导致杯状细胞的增生和黏液分泌的增加^[15],通过对小鼠鼻黏膜进行HE和PAS染色,发现AR小鼠鼻黏膜大量嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞增生。为了探究OVA诱导的鼻腔炎症对鼻黏膜CPA3及TJ相关蛋白的影响,本研究观察了Claudin-1、Claudin-4、JAM-A和ZO-1的表达变化,发现AR组TJ跨膜蛋白Claudin-1、Claudin-4和JAM-A的表达下降,这证明了OVA诱导的鼻腔炎症导致了TJ的破坏。但本研究并未发现TJ胞内蛋白ZO-1表达与Control组有显著性差异,这可能提示导致TJ破坏的因素来自上皮细胞外的鼻腔或黏膜固有层。本研究证实了AR小鼠鼻黏膜固有层肥大细胞数量的上升和CPA3 mRNA的高表达,其与TJ的破坏同时出现在AR小鼠的鼻黏膜,因此推测CPA3可能通过鼻黏膜TJ的破坏参与AR的发病,这一点还需要更进一步的研究来验证。

总之,本研究成功建立了OVA诱导的AR小鼠模型,并证实了AR小鼠鼻黏膜上皮TJ的破坏和CPA3的高表达,预测CPA3可能是鼻黏膜TJ损伤的重要原因。这需要进一步的研究验证。

参考文献:

- [1] ZHANG M, NI J Z, CHENG L. Safety of intranasal corticosteroids for allergic rhinitis in children[J]. Expert Opin Drug Saf, 2022, 21(7): 931-938.
- [2] YANG D, YAN Y J, PU K X. The association between air pollutants and daily outpatient visits for allergic rhinitis: a time-series analysis based on distribution lag nonlinear model in chongqing, China[J]. Risk Manag Healthc Poli-

- cy, 2022, 15: 1501-1515.
- [3] SIDDHURAJ P, NORDSTROM F U, JOGDAND P, et al. Histology-based blood leukocyte profiling reveals parallel Th2 and Th17 signatures in seasonal allergic rhinitis [J]. *Acta Otolaryngol*, 2022, 142(9-12): 696-704.
- [4] NAGASE H, UEKI S, FUJIEDA S. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases; asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis [J]. *Allergol Int*, 2020, 69(2): 178-186.
- [5] QAMAR S, AWAN N, CHEEMA K M, et al. Comparative analysis of nasal smear eosinophilia and serum ige levels for the diagnosis of allergic rhinitis [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(12): 1297-1300.
- [6] LEWICKI L, SIEBERT J, KOLINSKI T, et al. Mast cell derived carboxypeptidase A3 is decreased among patients with advanced coronary artery disease [J]. *Cardiol J*, 2019, 26(6): 680-686.
- [7] WAERN I, TAHA S, LORENZO J, et al. Carboxypeptidase inhibition by NvCI suppresses airway hyperreactivity in a mouse asthma model [J]. *Allergy*, 2021, 76(7): 2234-2237.
- [8] WINTER N A, QIN L, GIBSON P G, et al. Sputum mast cell/basophil gene expression relates to inflammatory and clinical features of severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(2): 428-438.
- [9] WANG S Y, XU J H, XI J, et al. Autophagy inhibition preserves tight junction of human cerebral microvascular endothelium under oxygen glucose deprivation [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(5): 644-651.
- [10] KIM H J, LEE S H, JEONG S, et al. Protease-activated receptors 2-antagonist suppresses asthma by inhibiting reactive oxygen species-thymic stromal lymphopoietin inflammation and epithelial tight junction degradation [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(4): 560-571.
- [11] SUN Y B, LIU M, FAN X S, et al. Effects of cigarette smoke on the aggravation of ovalbumin-induced asthma and the expressions of TRPA1 and tight junctions in mice [J]. *Mol Immunol*, 2021, 135: 62-72.
- [12] DONG J H, XU O, WANG J X, et al. Luteolin ameliorates inflammation and Th1/Th2 imbalance via regulating the TLR4/NF- κ B pathway in allergic rhinitis rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(3): 319-327.
- [13] TSABOURI S, NTRITSOS G, KOSKERIDIS F, et al. Omalizumab for the treatment of allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rhinology*, 2021, 59(6): 501-510.
- [14] FUKUOKA A, MATSUSHITA K, MORIKAWA T, et al. Human cystatin SN is an endogenous protease inhibitor that prevents allergic rhinitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(3): 1153-1162.
- [15] HELLINGS P W, STEELANT B. Epithelial barriers in allergy and asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(6): 1499-1509.
- [16] OTANI T, NGUYEN T P, TOKUDA S, et al. Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(10): 3372-3396.
- [17] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1514(1): 21-33.

收稿日期: 2023-01-16; 修回日期: 2023-02-07