

• 论著——实验研究 •

P 物质在变应性气道炎症小鼠中的生物节律性表达^{*}张婷¹ 何双八² 薛飞¹ 张勇¹ 张庆翔² 张倩¹ 许莉¹ 程友¹

【摘要】 目的:建立变应性气道炎症小鼠模型,探讨 P 物质在变应性气道炎症小鼠中的生物节律性表达。**方法:**将 84 只 BALB/c 小鼠随机分为 14 个组,分别为实验组 7 组(0:00 组,04:00 组,08:00 组,12:00 组,16:00 组,20:00 组,24:00 组)和对照组 7 组(0:00 组,04:00 组,08:00 组,12:00 组,16:00 组,20:00 组,24:00 组),每组 6 只。采用卵清蛋白腹腔注射+鼻腔局部激发+雾化吸入的方法制备小鼠变应性气道炎症模型。对实验动物血液进行 ELISA 法测量血清 P 物质含量,采用 RT-PCR 技术检测不同时间段内 P 物质在鼻腔组织、肺组织及支气管组织中基因表达的分布及含量。取小鼠鼻腔组织、左肺组织及左主支气管组织行免疫组织化学染色,观察组织切片中 P 物质阳性细胞的表达及分布。**结果:**实验组各时间段内血浆中 P 物质含量明显高于对照组($P<0.05$),其中,实验组中 0:00 组(321.99 ± 28.93) pg/mL、04:00 组(310.76 ± 25.31) pg/mL 及 24:00 组(335.62 ± 28.29) pg/mL 的 P 物质含量明显高于实验组其他时间段($P<0.05$)。实验组小鼠鼻腔组织、左肺组织及左主支气管组织中 P 物质 mRNA 表达明显高于对应的对照组($P<0.01$)。实验组小鼠鼻腔组织、左肺及左主支气管免疫组织化学切片中 P 物质表达显著高于对照组。**结论:**P 物质在变应性气道炎症小鼠模型中呈现高表达,且在凌晨及上午 04:00~08:00 表达出现峰值,这可能为治疗变应性气道炎症的给药时间提供新的依据。

【关键词】 变应性气道炎症;P 物质;生物节律

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.10.015

【中图分类号】 R765.21 **【文献标志码】** A

The experimental study on the biological rhythm expression of substance P in allergic airway inflammation mice

ZHANG Ting¹ HE Shuangba² XUE Fei¹ ZHANG Yong¹ ZHANG Qingxiang²
ZHANG Qian¹ XU Li¹ CHENG You¹(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing, 210002, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Nanjing Tongren Hospital)

Corresponding author: CHENG You, E-mail: chengyou2017@163.com

Abstract Objective: To establish the murine models of allergic airway inflammation, and to investigate the biological rhythm expression of substance P in it. **Method:** Eighty-four BALB/c mice were divided into 14 groups, which were airway inflammation groups(0:00 group, 04:00 group, 08:00 group, 12:00 group, 16:00 group, 20:00 group, 24:00 group) and normal control groups(0:00 group, 04:00 group, 08:00 group, 12:00 group, 16:00 group, 20:00 group, 24:00 group). The allergic airway inflammation models of mice were established by intraperitoneal injection of ovalbumin(OVA), nasal challenge and aerosol inhalation with OVA. The plasma substance P levels were measured by ELISA. The expression of substance P in nasal mucosa, left lung tissue and left bronchial tissue during different time periods was observed with RT-PCR and immunohistochemical technique. **Result:** In allergic airway inflammation groups, the plasma substance P levels were higher than in normal control groups($P<0.05$), and 0:00 group(321.99 ± 28.93) pg/mL, 04:00 group(310.76 ± 25.31) pg/mL and 24:00 group(335.62 ± 28.29) pg/mL were higher than other experimental groups($P<0.05$). The expression of substance P mRNA in nasal mucosa, left lung tissue and left bronchial tissue was higher than control groups($P<0.01$). By observing immunohistochemical sections, the expression of substance P in allergic airway inflammation groups was higher than control groups. **Conclusion:** The expression of substance P is high in allergic airway inflammation mice and the peaks are during 04:00—08:00 in the early morning, which may provide new basis for treating allergic airway inflammation.

Key words allergic airway inflammation; substance P; biological rhythm^{*}基金项目:中国博士后科学基金面上资助项目(No:2017M613438)¹东部战区总医院耳鼻咽喉头颈外科(南京,210002)²南京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:程友, E-mail: chengyou2017@163.com

变应性鼻炎(AR)和哮喘是发生在气道不同部位的变态反应性疾病,两者在发病机制、诊断及治疗方面有着广泛的一致性,即“同一气道,同一疾病”^[1],其典型的病理过程为变应性气道炎症(allergic airway inflammation)。P 物质(substance P)作为一种感觉活性肽,在变应性气道炎症的发病中起着重要作用,参与气道功能的调节和变应性气道炎症的病理生理过程^[2]。研究表明,免疫系统与生物钟系统具有紧密的联系^[3-4],变态反应本质上也在生物钟的控制之下。许多疾病,包括免疫性疾病都表现出症状的昼夜节律变化,例如 AR 患者的症状常在夜间和清晨加重^[5],哮喘的症状经常在夜间发作^[6]。有研究表明一些炎性细胞如肥大细胞、外周血单核细胞、NK 细胞等在免疫性疾病中表现出昼夜节律性变化^[7],然而,P 物质在参与变应性气道炎症发病过程中的生物节律性并不清楚,因此,我们设计了本实验,以探讨 P 物质在变应性气道炎症小鼠中的生物节律性表达,从而为临床用药时间提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

6 周龄 SPF 级雄性 BABL/c 小鼠 84 只,体重 20~25 g,购于东部战区总医院比较医学科,由东部战区总医院比较医学科动物实验中心代为饲养,所有实验步骤均符合东部战区总医院伦理委员会要求。84 只小鼠按每隔 4 h 时间段随机分为 14 个组,分别为实验组 7 组(0:00 组、04:00 组、08:00 组、12:00 组、16:00 组、20:00 组、24:00 组)和对照组 7 组(0:00 组、04:00 组、08:00 组、12:00 组、16:00 组、20:00 组、24:00 组),每组 6 只。OVA、Al(OH)₃ 佐剂、抑肽酶购自 Sigma 公司,P 物质 ELISA 试剂盒购自 CLOUD-CLONE CORP 公司, Anti-P 物质抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 变应性气道炎症小鼠模型制备 我们参考了部分文献^[8-9]并对造模方法做出了改进,具体步骤如下:将 40 μ g OVA+200 mg Al(OH)₃ 佐剂溶于 200 μ L PBS 溶液中,于早晨 08:00 腹腔右侧注射,隔日 1 次,共 7 次,观察 1 周;然后以 5% OVA 雾化 30 min,500 μ g OVA 溶于 20 μ L PBS 溶液中滴鼻激发,每侧鼻腔 10 μ L,每天 1 次,共 7 次。对照组以 0.9% 生理盐水代替 OVA。见图 1。

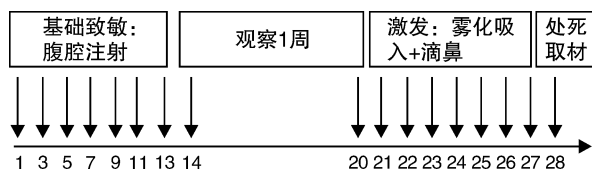


图 1 造模周期图

1.2.2 行为学观察 末次激发后观察每只小鼠 10 min 内打喷嚏次数、抓鼻次数、鼻腔分泌物及肺部症状,用相机记录分析其症状并用叠加法计分^[10],总分超过 5 分即为造模成功。

1.2.3 标本取材 参照文献^[11]小鼠处理过程,实验组和对照组于最后一次激发后第 2 天的 0:00、04:00、08:00、12:00、16:00、20:00、24:00 分别进行小鼠心脏取血,血液标本中加入 EDTA 抗凝及抑肽酶抑制神经肽分解,4℃ 4000g × 5 min 离心,上清液放入 -80℃ 冰箱待测。小心取出少许鼻腔组织、左肺组织、左主支气管组织放入 -80℃ 冰箱待测。将连同鼻腔的上颌骨置入 EDTA 脱钙液中脱钙,制备小鼠鼻、左肺及左主支气管石蜡切片。

1.2.4 ELISA 法测量血液中 P 物质含量 将离心后血液上清液取出,室温融化后进行 P 物质含量检测,操作步骤严格按照说明书要求,操作结束后将酶标板放入酶标仪中自动绘出标准曲线,并自动生成浓度数据。

1.2.5 组织中 P 物质 mRNA 表达 将预先冻存的组织取出,室温溶解后以 RT-PCR 技术检测不同时间段内组织中 P 物质 mRNA 表达,操作步骤严格按照说明书要求。

1.2.6 病理学检查 组织取出后常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烘干。将切片脱蜡至水,苏木精-伊红染色,中性树胶封片。采用 SABC 法进行免疫组织化学染色,操作步骤严格按照说明书要求,将组织标本与一抗 P 物质鼠抗单克隆抗体血清孵育,4℃ 过夜,HRP 标记免疫组织化学二抗室温孵育 30 min,滴加试剂 SABC, DAB 显色,苏木精复染,脱水,中性树胶封片,显微镜观察并拍照。

1.3 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一时间点的组间比较采用 *t* 检验,组内比较采用单因素方差分析,所有数据均使用 SPSS 22.0 进行统计学处理及分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 症状学表现

实验组 42 只小鼠叠加评分均大于 5 分,OVA 雾化及滴鼻激发后出现打喷嚏、双鼻流涕、抓鼻、全身瘙痒、呼吸急促等症状,对照组小鼠偶有抓鼻症状,变应性气道炎症模型建立成功。

2.2 外周血 P 物质含量比较

各时间点实验组血浆中 P 物质表达量均明显高于对照组 ($P < 0.01$);实验组内各时间点比较,0:00、04:00、24:00 组血浆中 P 物质表达较 08:00、12:00、16:00、20:00 组均差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 0:00、04:00、24:00 组血浆中 P 物质表达相比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。24 h 表达趋势见图 2a。

2.3 鼻腔组织、左肺组织及左主支气管组织中 P 物质 mRNA 表达

各时间点实验组和对照组小鼠鼻腔组织、左肺组织及左主支气管组织中 P 物质 mRNA 表达量见表 2、3、4, 结果显示, 实验组小鼠组织中 P 物质 mRNA 表达量均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。24 h P 物质 mRNA 表达趋势见图 2b、2c、2d。

2.4 各组小鼠鼻、肺、气管组织病理形态学观察

苏木精-伊红染色切片可见对照组小鼠鼻腔组织黏膜完整, 纤毛整齐, 未见明显炎性细胞浸润; 实验组小鼠鼻腔黏膜下组织间质水肿, 大量嗜酸粒细胞、中性粒细胞、浆细胞等炎性细胞浸润, 基膜部分缺失, 纤毛倒错、紊乱, 部分可见柱状上皮鳞化。对

照组左肺组织肺泡结构清晰, 未见明显炎性细胞浸润; 实验组小鼠左肺组织可见黏膜及黏膜下水肿, 血管及支气管周围大量嗜酸粒细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润。对照组小鼠左主支气管组织未见明显水肿及炎性细胞浸润; 实验组小鼠左主支气管组织可见黏膜水肿, 纤毛紊乱。见图 3a~3f。免疫组织化学切片可见 P 物质阳性物质呈颗粒状, 主要分布在胞质或胞核中, 在鼻腔组织中主要分布在纤毛柱状上皮细胞、上皮、血管内皮细胞及腺体周围; 左肺组织中阳性细胞主要分布在支气管上皮、肺泡上皮细胞、血管外皮细胞及肺间质细胞中; 左主支气管组织中阳性细胞主要分布在黏膜下、血管内皮细胞及部分淋巴细胞中。见图 3g~3l。

表 1 各时间点小鼠血浆 P 物质含量

pg/mL, $\bar{x} \pm s$

时间点	只数	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
0:00	6	321.99 ± 28.93 ¹⁾²⁾	166.25 ± 11.91	12.19	<0.01
04:00	6	310.76 ± 25.31 ¹⁾²⁾	140.33 ± 22.74	12.27	<0.01
08:00	6	261.17 ± 25.28 ¹⁾	111.14 ± 8.42	13.79	<0.01
12:00	6	238.76 ± 23.91 ¹⁾	114.86 ± 12.57	11.24	<0.01
16:00	6	251.19 ± 26.83 ¹⁾	109.33 ± 9.42	12.22	<0.01
20:00	6	240.91 ± 25.91 ¹⁾	101.30 ± 7.37	12.69	<0.01
24:00	6	335.62 ± 28.29 ¹⁾²⁾	141.04 ± 9.40	15.99	<0.01

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 08:00、12:00、16:00、20:00 比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 各时间点小鼠鼻腔组织中 P 物质 mRNA 表达

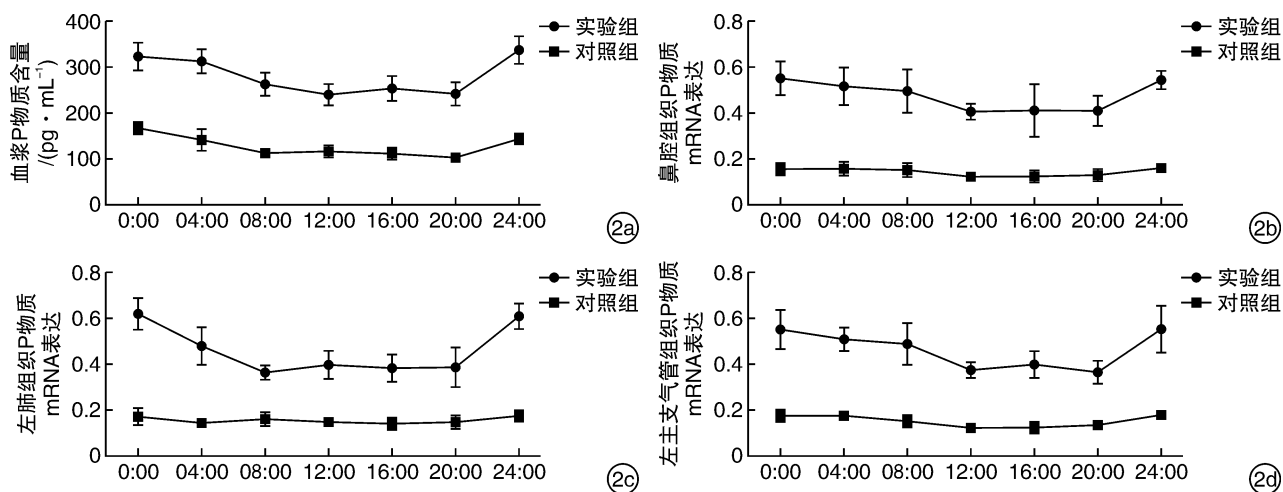
时间点	只数	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
0:00	6	0.553 ± 0.073	0.160 ± 0.021	12.718	<0.01
04:00	6	0.519 ± 0.082	0.164 ± 0.029	9.964	<0.01
08:00	6	0.498 ± 0.094	0.158 ± 0.029	8.495	<0.01
12:00	6	0.410 ± 0.033	0.128 ± 0.019	18.347	<0.01
16:00	6	0.414 ± 0.113	0.129 ± 0.026	6.023	<0.01
20:00	6	0.413 ± 0.063	0.134 ± 0.029	9.782	<0.01
24:00	6	0.544 ± 0.038	0.165 ± 0.015	22.877	<0.01

表 3 各时间点小鼠左肺组织中 P 物质 mRNA 表达

时间点	只数	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
0:00	6	0.618 ± 0.067	0.170 ± 0.038	14.254	<0.01
04:00	6	0.479 ± 0.085	0.140 ± 0.018	9.603	<0.01
08:00	6	0.363 ± 0.312	0.157 ± 0.026	12.193	<0.01
12:00	6	0.395 ± 0.064	0.146 ± 0.018	9.149	<0.01
16:00	6	0.382 ± 0.061	0.138 ± 0.021	9.241	<0.01
20:00	6	0.388 ± 0.088	0.146 ± 0.030	6.344	<0.01
24:00	6	0.611 ± 0.056	0.171 ± 0.021	18.122	<0.01

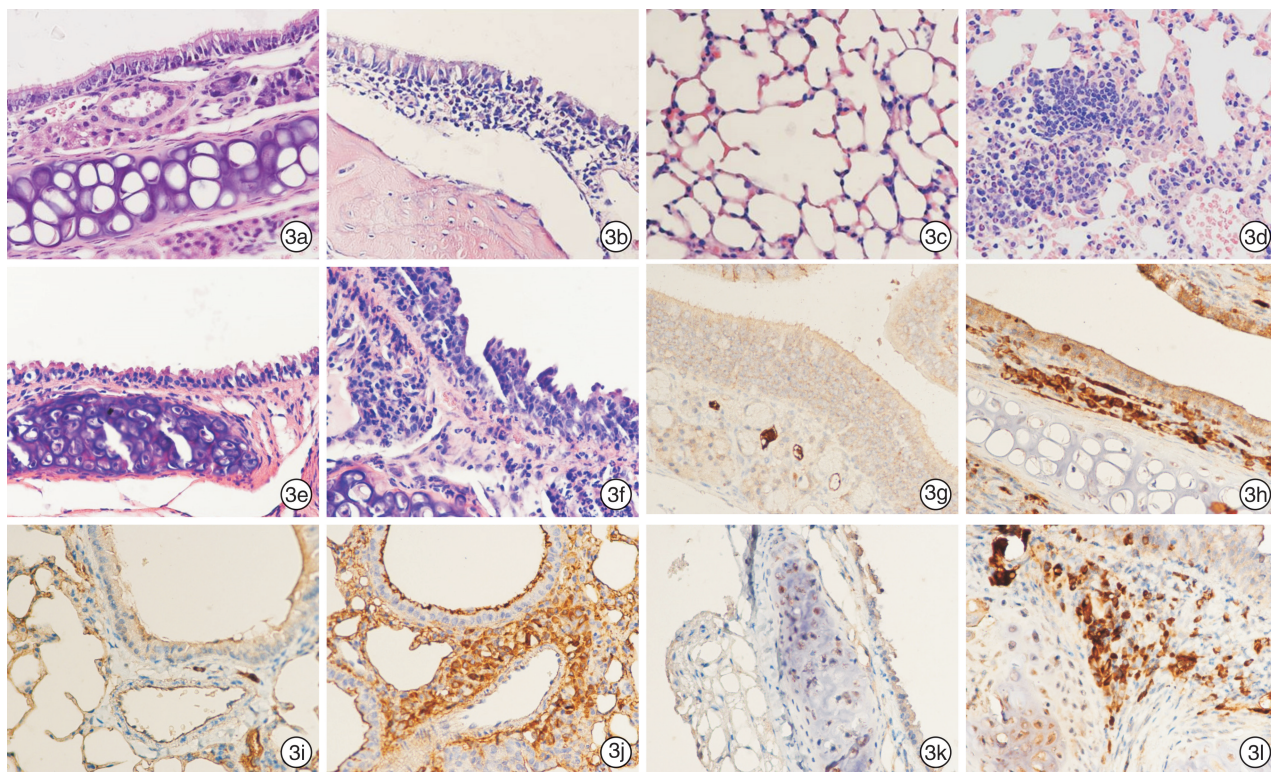
表 4 各时间点小鼠左主支气管组织中 P 物质 mRNA 表达

时间点	只数	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
0:00	6	0.553 ± 0.085	0.176 ± 0.020	10.552	<0.01
04:00	6	0.509 ± 0.050	0.178 ± 0.011	15.736	<0.01
08:00	6	0.488 ± 0.091	0.152 ± 0.021	8.834	<0.01
12:00	6	0.374 ± 0.036	0.125 ± 0.006	16.953	<0.01
16:00	6	0.395 ± 0.059	0.124 ± 0.017	10.903	<0.01
20:00	6	0.366 ± 0.049	0.134 ± 0.008	11.541	<0.01
24:00	6	0.552 ± 0.102	0.178 ± 0.015	8.883	<0.01



2a:24 h 小鼠血浆中 P 物质表达趋势;2b:24 h 小鼠鼻腔组织 P 物质 mRNA 表达趋势;2c:24 h 小鼠左肺组织 P 物质 mRNA 表达趋势;2 d:24 h 小鼠左主支气管组织 P 物质 mRNA 表达趋势;实验组夜间 P 物质表达较高。

图 2 血液与组织中 P 物质表达趋势



3a~3f:苏木精-伊红染色(×400),可见实验组小鼠黏膜下水肿,炎性细胞浸润;图 3g~3l:免疫组织化学染色(×400),实验组小鼠组织可见 P 物质阳性细胞分布。

图 3 病理形态学观察

3 讨论

昼夜节律是正常生理功能的重要组成部分,人体所有的生理功能均表现出稳定的昼夜节律变化,包括体温、代谢、内分泌等^[12]。因此,衍生了一门重要的学科即时间生物学,已经成为生命科学最有发展前景的学科之一。而关于变应性气道炎症的时间生物学研究很早就引起了广泛的关注,1973年,Nicholson 等^[13]通过对 264 例 AR 患者一天中

不同症状的研究发现,大多数患者夜间及早晨的症状发作明显比中午或其他时间段频繁且严重,部分合并支气管哮喘的患者在夜间及清晨出现了较为严重的喘息及咳嗽症状。其后,相当多的研究证实了 AR 和支气管哮喘症状在夜间或清晨醒来时最重^[6]。生物钟是调节神经元活动、新陈代谢以及免疫细胞功能的多模式系统,目前神经元活动和新陈代谢被认为是免疫功能的强大影响因素^[14-15],已知

的与变应性反应相关的外周时钟(如肥大细胞钟)可能是节律性变应性反应的主要驱动因素^[16],交感神经活动在参与免疫系统生物钟调控的同时,作为感觉神经末梢释放的神经肽可能也在变应性反应的生物节律中起重要作用,类似于肥大细胞钟,可能是一个重要的调控因素。

神经肽介导了变应性气道炎症的发病,参与其病理生理学过程和症状变化。目前已知的变应性气道炎症的生物节律由生物钟基因控制,但其症状的昼夜变化还受到肥大细胞、嗜酸粒细胞等炎性细胞的影响^[17],作为参与变应性气道炎症发病的炎性递质之一——神经肽是否同样有昼夜节律的变化呢?我们选取了神经肽家族中最具代表性的P物质作为研究对象,不同时间段内模型小鼠血液中P物质表达量表现出明显的差异性,且凌晨及夜间04:00左右出现表达的峰值;同时,组织中P物质mRNA的表达同样也出现相似的结果,鼻腔组织、左肺组织及左主支气管组织在不同时间段P物质mRNA表达出现较为相似的昼夜节律波动。因此,我们猜测P物质在变应性气道炎症中的昼夜节律性表达影响了该病症状的节律性表现。当然,本实验的样本量相对较少,可能会出现一定的差异,但我们可以肯定的是,P物质的表达在凌晨或夜间的表达量相对白天其他时间段高,与变应性气道炎症的昼夜节律性具有一致性,提示神经肽在变应性气道炎症中的昼夜节律性表达参与了该病昼夜节律波动的调控。

早前的研究表明,与早晨给药相比,抗组胺药美唑他嗪在夜间给药更能控制AR的症状^[18]。另一项研究发现,相比于早晨09:00给药,夜间21:00给药能更好地降低哮喘豚鼠血浆内皮素浓度,控制哮喘的发作^[19]。本研究首次报道了P物质在变应性气道炎症中生物节律性表达及其昼夜节律的变化,为进一步研究变应性气道炎症的生物节律提供了参考方向,同时为临床针对性给药时间提供了理论依据,即在凌晨或晨起给药或选择具有合适半衰期的药物在夜间或凌晨释放,有可能更好地减少神经肽的表达,控制变应性气道炎症的症状。当然,结合临床的具体情况以及患者的个体差异,依据生物节律性的不同而针对的给药时间仍然需要进一步及大样本的研究。

参考文献

[1] Grossman J. One airway, one disease[J]. *Chest*, 1997, 111(2 Suppl): 11S-16S.
[2] Schäper C, Gustavus B, Koch B, et al. Effect of fluticasone on neuropeptides in nasal lavage in persistent allergic rhinitis[J]. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2010, 20(3): 214-221.
[3] Man K, Loudon A, Chawla A. Immunity around the clock[J]. *Science*, 2016, 354(6315): 999-1003.

[4] Scheiermann C, Gibbs J, Ince L, et al. Clocking in to immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(7): 423-437.
[5] Kitahata Y, Nunomura S, Terui T, et al. Prolonged culture of mast cells with high-glucose medium enhances the Fc epsilon RI-mediated degranulation response and leukotriene C4 production[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152 Suppl 1: 22-31.
[6] Smolensky MH, Lemmer B, Reinberg AE. Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(9-10): 852-882.
[7] Wang X, Reece SP, Van Scott MR, et al. A circadian clock in murine bone marrow-derived mast cells modulates IgE-dependent activation in vitro[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(1): 127-134.
[8] Sun YQ, Deng MX, He J, et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(12): 2692-2699.
[9] 杨瑞嘉, 黄志纯. 变应性鼻炎动物模型的建立与评价[J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 31(2): 87-89.
[10] 江满杰, 李泽卿, 吴晋蓉, 等. 变应性鼻炎豚鼠模型上下气道炎症一致性研究[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2012, 19(10): 559-563.
[11] 徐定远, 张勇, 薛飞, 等. 变应性气道炎症动物模型的实验取材[J]. *医学研究生学报*, 2009, 22(11): 1147-1149.
[12] 丁建明. 光照对哺乳类动物生物钟的调节机制[J]. *基础医学与临床*, 2005, 25(7): 577-586.
[13] Nicholson PA, Bogie W. Diurnal variation in the symptoms of hay fever: implications for pharmaceutical development[J]. *Curr Med Res Opin*, 1973, 1(7): 395-400.
[14] Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(2): 156-166.
[15] Gaber T, Strehl C, Buttgerit F. Metabolic regulation of inflammation[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5): 267-279.
[16] Nakao A. Clockwork allergy: How the circadian clock underpins allergic reactions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(4): 1021-1031.
[17] Baumann A, Feilhauer K, Bischoff SC, et al. IgE-dependent activation of human mast cells and fMLP-mediated activation of human eosinophils is controlled by the circadian clock[J]. *Mol Immunol*, 2015, 64(1): 76-81.
[18] Storms WW. Pharmacologic approaches to daytime and nighttime symptoms of allergic rhinitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(5 Suppl): S146-153.
[19] 赵小寅, 樊莹, 金芳, 等. 不同时辰给药对哮喘豚鼠血浆内皮素的影响[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 2001, 17(2): 102-103.

(收稿日期: 2020-03-21)