

# 抑制趋化素样因子 1 对变应性鼻炎白细胞介素-9 表达和嗜酸性粒细胞的影响\*

张峻峥 时文杰 谢伟伟 李海亮 樊宏

(中南大学湘雅医学院附属海口医院耳鼻喉科, 海南 海口 570208)

**【摘要】** 目的 探究抑制趋化素样因子 1(CKLF1)对变应性鼻炎(AR)大鼠内白细胞介素-9(IL-9)与嗜酸性粒细胞的影响。方法 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、CKLF1 抗体组(AR+CKLF1-C19 组)、丙酸氟替卡松组(AR+FP 组),每组 10 只。除对照组外,其余各组大鼠均用卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝  $[Al(OH)_3]$  致敏法诱导 AR, AR+CKLF1-C19 组 AR 激发前连续 10 d 分别在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L CKLF1-C19 肽干预,AR+FP 组 AR 激发前连续 10 d 分别在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L 丙酸氟替卡松喷雾剂干预,对照组和模型组均同时在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L 生理盐水。末次鼻腔激发后,各组大鼠均进行表观行为学指标评分;ELISA 法检测血清 IL-9、免疫球蛋白 E(IgE)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平;HE 染色观察鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞表达;瑞氏染色检测鼻腔内嗜酸性粒细胞数目;免疫组织化学染色检测鼻黏膜组织 IL-9 表达;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白(MBP)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)在 mRNA 和蛋白水平上的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠出现打喷嚏、流涕以及频繁抓鼻的现象,血清中 IL-9、IgE 水平升高,IFN- $\gamma$  水平下降,鼻黏膜有水肿、黏膜层增厚以及黏膜上皮脱落的症状,嗜酸性粒细胞数目增加,鼻黏膜组织内 IL-9 阳性表达升高,MBP、ECP、EPO 在 mRNA 和蛋白水平上的表达均上调( $P < 0.05$ );与模型组比较,AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组大鼠打喷嚏、流涕、抓鼻等行为减少,血清中 IL-9、IgE 水平下降,IFN- $\gamma$  水平升高,鼻黏膜水肿及炎症细胞浸润减轻,嗜酸性粒细胞数目减少,鼻黏膜组织内 IL-9 阳性表达下降,同时,MBP、ECP、EPO 在 mRNA 和蛋白水平上的表达也均下调( $P < 0.05$ )。结论 抑制 CKLF1 能够明显降低变应性鼻炎大鼠嗜酸性粒细胞的浸润,抑制 IL-9 表达,从而对变应性鼻炎起到一定的治疗作用。

**【关键词】** 变应性鼻炎;趋化素样因子 1;嗜酸性粒细胞;白细胞介素-9

**【中图分类号】** R765.22 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.008

## Study on the effect of inhibiting chemokine-like factor 1 on the expression of interleukin-9 and eosinophils in allergic rhinitis

ZHANG Junzheng, SHI Wenjie, XIE Weiwei, LI Hailiang, FAN Hong

(Department of Otorhinolaryngology, Haikou Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of inhibiting chemokine like factor-1 (CKLF-1) on allergic rhinitis (AR) in rats with interleukin-9 (IL-9) Influence with eosinophils. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into control group (Control), model group (AR), CKLF1 antibody group (AR+CKLF1-C19), fluticasone propionate group (AR+FP), 10 rats in each group. Except for the control group, the rats in the other groups were all induced AR with ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide  $[Al(OH)_3]$  sensitization method, during the modeling period, the AR+CKLF1-C19 group was instilled 5  $\mu$ L of CKLF1-C19 peptide in the bilateral nasal cavity for 10 consecutive days before AR challenge; in the AR+FP group, 5  $\mu$ L fluticasone propionate spray were dripped into the bilateral nasal cavity for 10 consecutive days before AR challenge. Both the control group and the model group were instilled 5  $\mu$ L of saline in both nasal cavities at the same time. After the last nasal cavity challenge, rats in each group were scored with apparent behavior indicators. ELISA method was used to detect the level of serum IL-9, immunoglobulin E (IgE), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). HE staining was used to detect the expression of eosinophils in nasal mucosa tissue. Wright staining was used to

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200190)

引用本文:张峻峥,时文杰,谢伟伟,等.抑制趋化素样因子 1 对变应性鼻炎白细胞介素-9 表达和嗜酸性粒细胞的影响[J].西部医学,2022,34(8):1133-1139. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.008

detect the number of eosinophils in the nasal cavity. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of IL-9 in nasal mucosa tissue. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot was used to detect eosinophil major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), and eosinophil peroxidase in nasal mucosa tissue (Eosinophil peroxidase, EPO) expression at the mRNA and protein levels. **Results** Compared with the control group, rats in the model group had sneezing, runny nose and frequent snatching. The serum IL-9 and IgE levels increased, the IFN- $\gamma$  level decreased, and the nasal mucosa had edema and thickened mucosal layer. As well as the symptoms of mucosal epithelial shedding, the number of eosinophils increased, the positive expression of IL-9 in nasal mucosa tissue increased, and the expression of MBP, ECP, and EPO at the mRNA and protein levels were all up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, rats in the AR+CKLF1-C19 group and AR+FP group slowed down their sneezing, runny nose, and snatching behaviors, serum IL-9 and IgE levels decreased, IFN- $\gamma$  levels increased, and nasal mucosa edema. And the infiltration of inflammatory cells was reduced, the number of eosinophils decreased, and the positive expression of IL-9 in nasal mucosa tissue decreased. At the same time, the expressions of MBP, ECP, and EPO at the mRNA and protein levels were all down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhibiting the expression of CKLF-1 in the rat model of allergic rhinitis can significantly reduce the infiltration of eosinophils and inhibit the expression of IL-9, thus playing a certain therapeutic effect on AR.

**【Key words】** Allergic rhinitis; Chemokine-like factor 1; Eosinophils; Interleukin-9

变应性鼻炎(Allergic rhinitis, AR)是一种变应原引起的 IgE 介导的免疫反应相关鼻黏膜炎症<sup>[1]</sup>。AR 患者通常以鼻腔阻塞、鼻漏、打喷嚏和鼻痒等症状为主要特征,给患者带来了沉重负担,严重影响其知觉和认知功能。如今,AR 已成为影响全球 10%~20% 成年人的重要公共卫生问题<sup>[2-4]</sup>。AR 由吸入的过敏原包括尘螨、花粉和动物皮屑等引起,而且一些 AR 患者对抗组胺药和皮质类固醇不敏感,长期使用会产生一系列不良反应<sup>[5]</sup>。趋化素样因子 1(Chemokine like factor-1, CKLF1)是一种新颖的细胞趋化因子,具有独特结构和多种活性,包含趋化因子家族趋化因子所具有的两个连续的半胱氨酸<sup>[6]</sup>。已有研究表明,CKLF1 与变应性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、心脑血管疾病等均有重要联系<sup>[7-8]</sup>。本研究通过构建大鼠 AR 模型,使用 CKLF1 拮抗肽 C19 抑制 CKLF1 的表达,旨在探讨干预 CKLF1 对 AR 大鼠体内 IL-9 及嗜酸性粒细胞的影响,为 AR 的临床诊治研究提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,3~4 周龄,体质量 200~220 g。饲养环境:温度(25.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C、相对湿度 40%~60%、光暗周期 12 h/12 h 交替,所有大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。本研究通过动物伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂 CKLF1 拮抗肽 C19 购于医学免疫国家重点实验室,丙酸氟替卡松(FP)购于葛兰素史克制药(重庆)有限公司,卵清蛋白(OVA)和氢氧化铝[Al(OH)<sub>3</sub>] 购于美国 Sigma 公司,特异性 ELISA IL-9、IgE、IFN- $\gamma$  试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司,HE 染色试剂盒和免疫组织化学染色试剂盒购于

武汉博士德生物公司,RNAiso Plus 试剂、逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购于日本 Takara 公司,瑞氏染色试剂液、BCA 蛋白检测试剂盒和 ECL 发光液购于上海碧云天生物研究所,兔抗 MBP 单抗隆抗体(货号 ab7349)、兔抗 ECP 单克隆抗体(货号 ab207429)、兔抗 EPO 单克隆抗体(货号 ab275686)、兔抗 GAPDH 多克隆抗体(货号 ab9485)及兔抗 IL-9 多克隆抗体(货号 ab233706)购于英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购于北京博奥森生物技术有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 动物造模 选择 SD 大鼠建立变应性鼻炎(AR)动物模型,依据参考文献方法<sup>[9]</sup>,第一步为基础致敏:分别取 0.3 mg 的 OVA 与 30 mg 的[Al(OH)<sub>3</sub>],加入 1 mL 生理盐水将两者混匀成混悬液,通过大鼠腹腔注射,隔日注射 1 次,共注射 7 次,对照组同时注射等量生理盐水;第二步为鼻腔激发:取 50  $\mu$ L 的 2% OVA 滴鼻致敏后的大鼠,以微量进样器从双侧鼻腔滴入,每天 1 次,连续 7 天,对照组滴入等量生理盐水。

1.3.2 分组与药物处理 将 40 只大鼠按照数字随机表法分为 4 组,包括对照组、模型组、CKLF1 抗体组(AR+CKLF1-C19 组)、丙酸氟替卡松组(AR+FP 组),每组 10 只。除对照组外,其余 3 组大鼠均构建 AR 模型,CKLF1 抗体组 AR 激发前连续 10 天分别在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L CKLF1-C19 肽干预,丙酸氟替卡松组 AR 激发前连续 10 天分别在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L 丙酸氟替卡松喷雾剂干预,对照组和模型组均同时在双侧鼻腔滴 5  $\mu$ L 的生理盐水。

1.3.3 变应性鼻炎症状评分 末次鼻腔激发后,各

组大鼠均进行表观行为学评分,观察 30 min 内大鼠喷嚏、鼻溢和搔鼻动作行为,以叠加量化计分。具体评分:喷嚏,1~4 个,1 分;5~10 个,2 分;10 个以上,3 分;流鼻涕,流至鼻孔前,1 分;流出鼻孔,2 分;流至面部,3 分;挠痒:单前肢偶有挠鼻,1 分;双前肢挠鼻,2 分;双前肢不停挠鼻,3 分。

1.3.4 ELISA 法检测 IL-9、IgE、INF- $\gamma$  水平 各组大鼠禁食过夜,10%水合氯醛腹腔注射将其麻醉,腹主动脉采集血液,室温静置 2 h,4℃低温离心机上以 4000 r/min 离心 15 min,获取上清液,特异性 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-9、IgE、INF- $\gamma$  的水平,在酶标仪波长 450 nm 处检测各样品的 OD 值。

1.3.5 HE 染色检测大鼠鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞数 采血后处死各组大鼠,分离取出双侧鼻腔黏膜组织,清洗干净后,在 4%多聚甲醛中固定过夜。取固定好的组织,石蜡包埋,切成 5  $\mu$ m 厚的组织切片,进行苏木精-伊红染色。切片脱蜡脱水,加入苏木精染色 5 min,流水冲洗,加入伊红染色 3 min,流水再次冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,晾干,光学显微镜下观察鼻腔黏膜组织形态并捕获图像,随机选择 5 个不同视野计数嗜酸性粒细胞数目,结果取平均值。

1.3.6 瑞氏染色检测大鼠鼻腔分泌物嗜酸性粒细胞数目 取各组鼻腔分泌物,均匀轻薄地涂抹在载玻片上,自然干燥,滴加瑞氏染液染色于涂片上,使标本被染色液覆盖,接着滴加等量的磷酸盐缓冲液(pH 6.4),轻轻晃动玻片,静置 5 min,自来水冲洗干净,晾干,光学显微镜下观察嗜酸性粒细胞并捕获图像,随机选择 5 个不同视野计数嗜酸性粒细胞数目,结果取平均值。

1.3.7 免疫组织化学染色检测鼻黏膜组织 IL-9 表达 取鼻黏膜组织石蜡切片,脱蜡脱水,置于 0.3%过氧化氢中孵育 30 min 阻断内源性过氧化物酶,微波炉高温(98℃)加热 5 min 修复抗原,加入 10%山羊血清室温孵育 1 h,接着将切片与兔抗鼠 IL-9 多克隆抗体(1:400)在 4℃下共同孵育过夜,次日,弃一抗液,PBS 清洗,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000),室温孵育 1 h,PBS 清洗,滴加 DAB 于切片上显色,自来水清洗干净,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片,晾干,光学显微镜下观察组织中蛋白阳性表达并捕获图像,随机选择 5 个视野,胞膜和胞浆内黄色至棕色为阳性染色,Image-Pro Plus 软件分析计算阳性表达面积。

1.3.8 实时荧光定量 PCR 检测大鼠鼻黏膜组织

MBP、ECP、EPO 表达 无菌环境下剪碎鼻腔黏膜组织,加液氮研磨,RNAiso Plus 试剂提取组织总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 纯度、浓度,根据逆转录试剂盒操作合成 cDNA,并以 cDNA 为模板,按照实时荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书,并通过实时荧光定量 PCR 系统进行扩增实验,检测基因的 mRNA 表达水平, $\beta$ -Actin 作为内参基因。扩增条件设置:95℃ 5 min(循环 1 次);95℃ 30 s,60℃ 30 s,58℃ 30 s,循环 40 次,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的 mRNA 相对表达水平。引物序列:MBP 正义链 5'-TGATGTGTTTGGGAGGCAGA-3',反义链 5'-AACCCATAGTTCC TCTACGCC-3';ECP 正义链 5'-ATCACTCATCTGCCAAGC-3',反义链 5'-CAGGGTTCACAAGGGACT-3';EPO 正义链 5'-TGGAAAGAGGCGTAATGG-3',反义链 5'-AAGGATGTAAGTGCGTTGAT-3'; $\beta$ -Actin 正义链 5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3',反义链 5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'。

1.3.9 Western blot 检测鼻腔黏膜组织抗 MBP、ECP、EPO 蛋白水平 将鼻腔黏膜组织在无菌环境下剪碎研磨匀浆,加入预冷的 RIPA 缓冲液提取组织总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。取等量各组蛋白样品,将其与 5×Loading buffer 混合,通过 10% SDS-PAGE 分离蛋白质 2 h,电转移至 PVDF 膜 1 h,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,TBST 洗膜,膜上加入兔抗 MBP、ECP、EPO 多克隆抗体,均按 1:1000 稀释,在 4℃下共同孵育过夜;次日,弃一抗液,TBST 洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000),室温孵育 1 h,TBST 再次洗膜,滴加 ECL 显色,凝胶成像系统拍照,Image-ProPlus 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白,蛋白相对表达量记为目的蛋白条带/GAPDH 条带灰度值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠表观行为学评分比较 对照组大鼠未见打喷嚏、流涕,偶有抓鼻;模型组大鼠出现打喷嚏、流涕以及频繁抓鼻的现象,且烦躁不安,行为学评分高于 5 分,较对照组显著升高( $P < 0.05$ ),由此说明 AR 模型构建成功。与模型组比较,AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组大鼠打喷嚏、流涕、抓鼻行为均减少,行为学评分较模型组均显著下降( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠行为学评分比较( $\bar{x} \pm s$ , 分)

Table 1 Comparison of behavioral scores of rats in each group

组别	n	行为学评分
对照组	10	0.45±0.04
模型组	10	7.87±0.81 <sup>①</sup>
AR+CKLF1-C19 组	10	3.04±0.30 <sup>②</sup>
AR+FP 组	10	2.96±0.30 <sup>②</sup>

注:与对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠血清 IL-9、IgE 及 IFN- $\gamma$  水平比较 与对照组比较,模型组大鼠血清中 IL-9、IgE 水平显著升高,IFN- $\gamma$  水平显著下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组大鼠血清中 IL-9、IgE 水平显著下降,而 IFN- $\gamma$  水平显著升高( $P < 0.05$ ),见图 1。

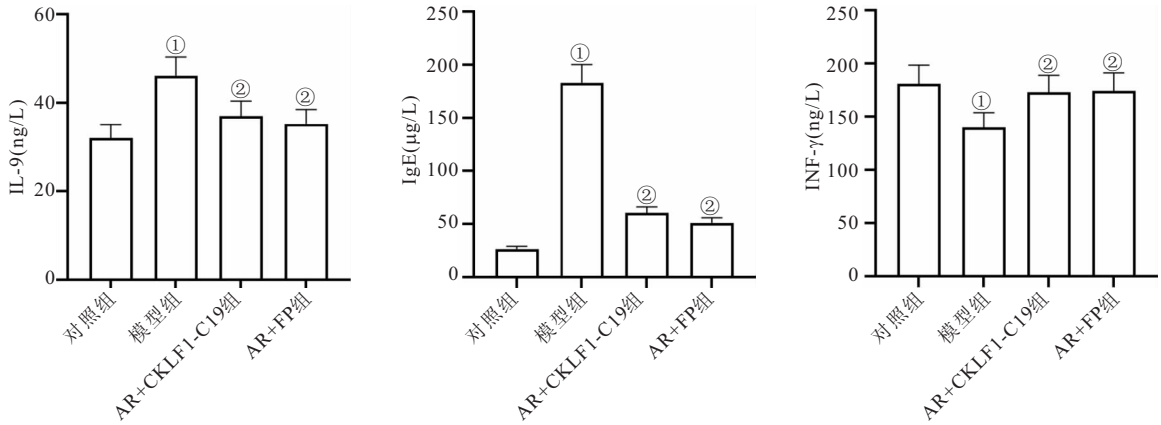


图 1 ELISA 检测各组大鼠血清 IL-9、IgE 及 IFN- $\gamma$  水平

Figure 1 ELISA detection of serum IL-9, IgE and IFN- $\gamma$  levels in each group of rats

注:与对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠 HE 染色结果 HE 染色结果显示,对照组大鼠鼻黏膜结构完整,未见损伤,偶见嗜酸性粒细胞;模型组鼻黏膜水肿,黏膜层增厚,黏膜上皮脱落,嗜酸性粒细胞及其他炎症细胞浸润明显,嗜酸性

粒细胞数目较对照组显著增加( $P < 0.05$ );AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组鼻黏膜水肿及炎症细胞浸润减轻,嗜酸性粒细胞数目均较模型组显著减少( $P < 0.05$ ),见图 2。

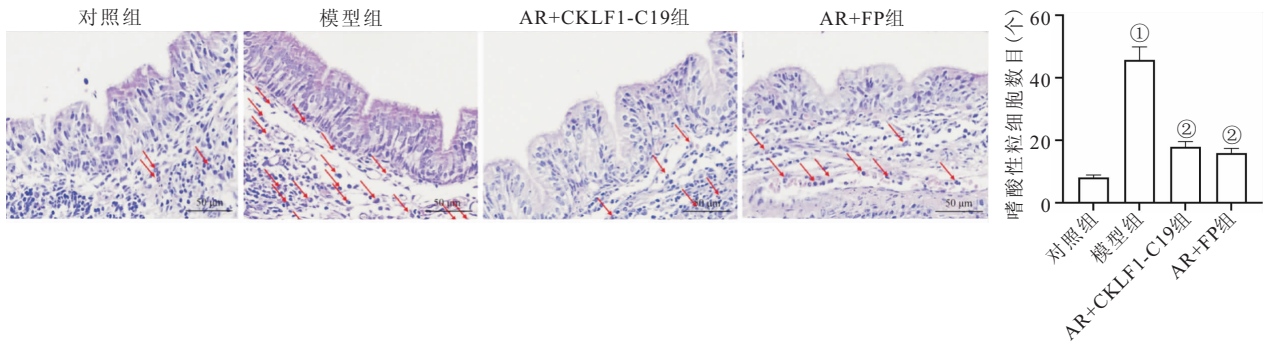


图 2 HE 染色检测各组大鼠鼻黏膜组织嗜酸性粒细胞数目

Figure 2 HE staining to detect the number of eosinophils in the nasal mucosa of rats in each group

注:红色箭头所指为嗜酸性粒细胞;与对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠瑞氏染色结果 瑞氏染色结果显示,对照组大鼠的鼻腔分泌物及下鼻甲黏膜刮片涂片可见少量的嗜酸性粒细胞;模型组内可见大量的嗜酸性粒细胞,数目较对照组显著增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组内嗜酸性粒细胞数显著减少( $P < 0.05$ ),见图 3。

显的黄色至棕色染色,颜色较深,IL-9 阳性表达较对照组显著升高( $P < 0.05$ );AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组内黄色至棕色染色变浅,IL-9 阳性表达均较模型组显著下降( $P < 0.05$ ),见图 4。

2.5 各组大鼠鼻黏膜组织 IL-9 表达比较 免疫组织化学染色结果显示,对照组大鼠鼻黏膜组织内黄色至棕色染色少,IL-9 阳性表达低;模型组内可见大量明

2.6 各组大鼠鼻黏膜组织 MBP、ECP、EPO 表达比较 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与对照组比较,模型组大鼠鼻黏膜组织 MBP、ECP、EPO mRNA 相对表达量显著上调( $P < 0.05$ );与模型组比较,AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组鼻黏膜组织 MBP、ECP、

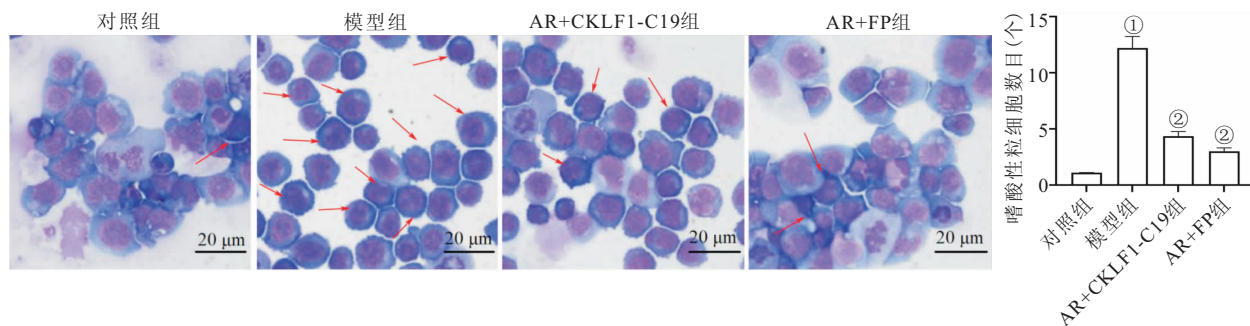


图3 瑞氏染色检测鼻腔内嗜酸性粒细胞表达

Figure 3 Wright staining to detect the expression of eosinophils in the nasal cavity

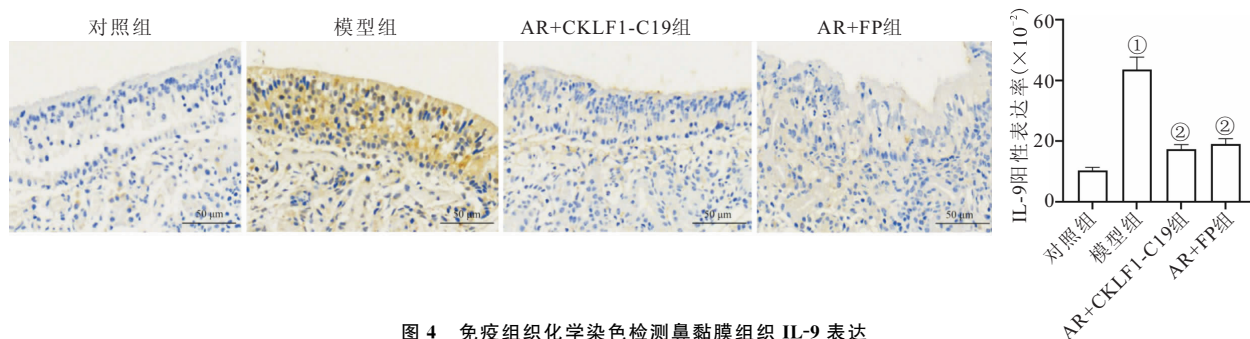
注:红色箭头所指为嗜酸性粒细胞;与对照组比较,① $P<0.05$ ;与模型组比较,② $P<0.05$ 

图4 免疫组织化学染色检测鼻黏膜组织 IL-9 表达

Figure 4 Immunohistochemical staining to detect IL-9 expression in nasal mucosa

注:与对照组比较,① $P<0.05$ ;与模型组比较,② $P<0.05$ 

EPO mRNA 相对表达量均显著下调( $P<0.05$ ),见图5。Western blot 检测结果显示,模型组大鼠鼻黏膜组织 MBP、ECP、EPO 蛋白相对表达量较对照组显著上调( $P<0.05$ );而 AR+CKLF1-C19 组和 AR+FP 组鼻黏膜组织 MBP、ECP 及 EPO 的蛋白相对表达量均较模型组显著下调( $P<0.05$ ),见图6。

### 3 讨论

AR 是一种在世界范围内普遍流行的疾病,并且患病率呈持续上升趋势;尽管 AR 并不威胁生命,但对人们的生活质量产生了负面影响<sup>[2]</sup>。在变应性鼻炎患者中,变应原进入引起 I 型超敏反应,其主要作用是 IgE 抗体、肥大细胞、组胺、细胞因子与免疫细胞之间相互作用进一步诱发的炎症反应<sup>[4]</sup>。作为一种严重程度不一的异质性疾病,尽管对 AR 的病理和治疗机制进行了广泛研究,但仍有许多方面不清楚。目前,AR 的药物治疗主要是对症治疗,其目的是减轻相关症状。除了回避变应原,在 AR 治疗中使用药物取决于疾病的严重程度:在轻度或间歇性情况下,患者通常采用口服或鼻用第二代抗组胺药或鼻内皮质类固醇激素;在中度至重度条件下,通常使用包括白三烯拮抗剂和抗胆碱能药在内的其他药物作为抗组胺药或鼻内皮质类固醇激素的补充疗法,并使用其他一些药物,例如肥大细胞稳定剂和抗 IgE 单克隆抗体<sup>[10-11]</sup>。

然而,目前药物治疗的主要局限性在于其有益作用不会长时间持续,在停止用药时便会出现症状,并且会产生一定的副作用。因此,迫切需要鉴定和探索药物的特异性新靶标,以提高临床上 AR 的治疗效果。

细胞因子是由免疫细胞或其他细胞合成或分泌的小分子肽,机体内许多细胞因子之间相互促进或抑制,形成了复杂的细胞因子调节网络。细胞因子在宿主防御机制中起着至关重要的作用,通常被认为是分泌的“信使”蛋白,通过调节增殖和分化来调节免疫功能<sup>[12]</sup>。越来越多的证据表明,在一定条件下各种免疫介导性疾病的发生和发展涉及细胞因子的参与。CKLF1 是在使用植物血凝素刺激后从 U937 细胞中分离出的趋化因子新成员,定位于染色体 16q 22.1,由 4 个外显子和 3 个内含子组成,具有广泛的生物活性,除了具有趋化活性外,还对许多细胞如骨髓细胞具有明显的促增殖和分化作用,并可以刺激人造血干细胞的集落形成,增加粒细胞-单核细胞集落形成单位的增殖<sup>[13-14]</sup>。目前,关于 CKLF1 在过敏性疾病中的研究也在不断增加,例如特应性皮炎患者血清和皮肤中 CKLF1 水平均升高,并且 CKLF1 在特应性皮炎患者的皮肤病变中也呈现过表达<sup>[15]</sup>;在 AR 患者的鼻黏膜组织中检测到 CKLF1 的转录水平和蛋白水平均增强<sup>[16]</sup>;此外,CKLF1 还参与了一些自身免疫性疾病过

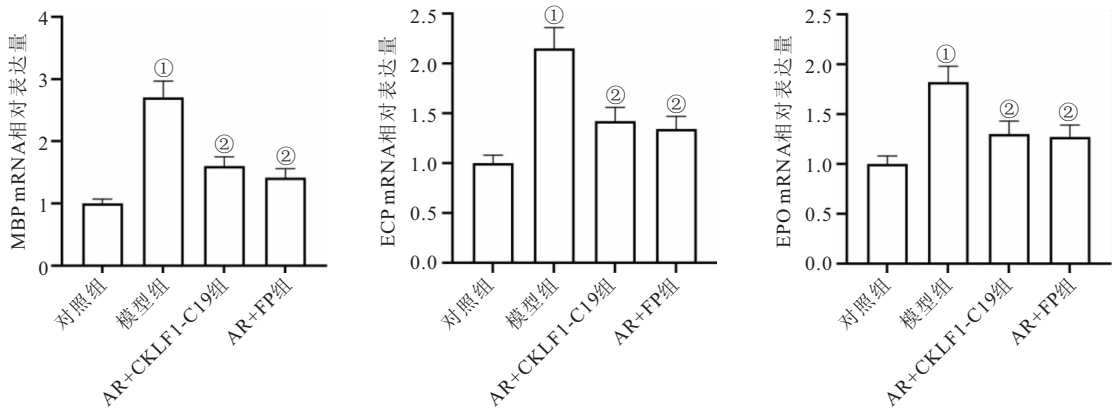


图 5 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠鼻黏膜组织内 MBP、ECP、EPO 的 mRNA 表达

Figure 5 Real-time fluorescence quantitative PCR to detect the mRNA expression of MBP, ECP, EPO in the nasal mucosa tissue of each group of rats

注:与对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

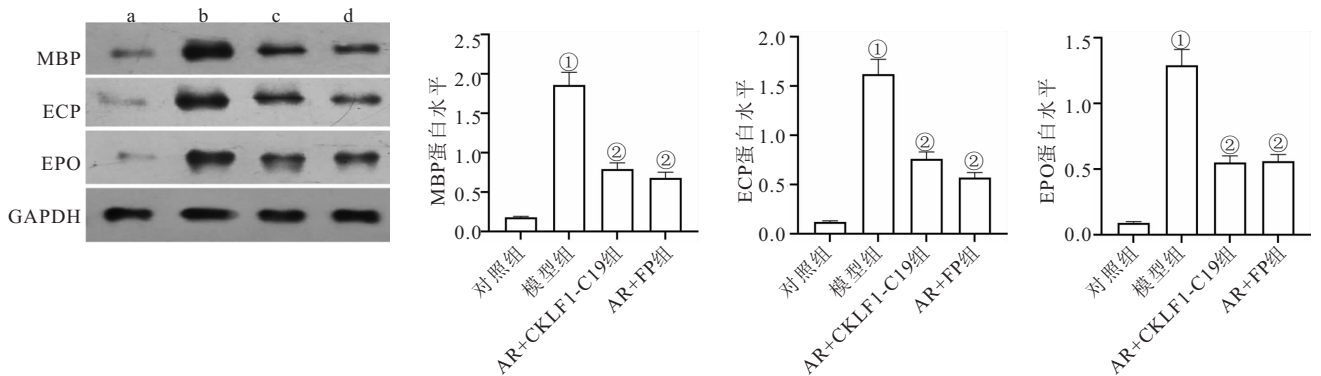


图 6 Western blot 检测各组大鼠鼻黏膜组织内 MBP、ECP、EPO 的蛋白表达

Figure 6 Western blot detection of the protein expression of MBP, ECP, EPO in the nasal mucosa tissue of each group of rats

注:a. 对照组;b. 模型组;c. AR+CKLF1-C19 组;d. AR+FP 组;与对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

程,例如狼疮性肾炎和关节炎<sup>[17-18]</sup>。已知 C19 肽能够通过介导趋化因子受体从而对趋化性产生一定的抑制作用,针对鼻内和腹膜内的过敏症状,使用其治疗均可达到与布地奈德较一致的效果<sup>[19]</sup>。本研究结果同样显示,在 AR 激发前连续 10 天分别在双侧鼻腔滴入 C19 肽干预可明显减轻大鼠打喷嚏、流涕、抓鼻等行为,以及鼻黏膜组织水肿、黏膜层增厚等病理现象。因此推测,CKLF1 可能是治疗 AR 的有效靶标。

IL-9 属于 IL-2R $\gamma$ c 链家族成员,是一种多功能的细胞因子,可以调节多种细胞功能,起初被确定为 T 细胞和肥大细胞的生长因子<sup>[20]</sup>。IL-9 主要参与过敏性疾病、自身免疫性疾病和炎症疾病的发展,此外,其还能够直接影响肿瘤细胞的存活,或者间接地通过激活肥大细胞和招募树突状细胞参与肿瘤免疫过程<sup>[21]</sup>。IgE 是过敏性反应的关键免疫介质,而 IgE 介导的超敏反应可能是过敏原引起 AR 发生的机制,因此,IgE 是临床上 AR 诊断鉴别的指标之一。IFN- $\gamma$  是由 Th1 细胞分泌的细胞因子,能够拮抗 IgE 介导的反应。本

研究结果显示,在 AR 激发中抑制 CKLF1 能够降低血清和鼻黏膜组织中 IL-9 表达,同时抑制 IgE 表达,提高 IFN- $\gamma$  水平。

嗜酸性粒细胞不仅在嗜酸性粒细胞相关疾病的发病机理中起关键作用,而且还具有多种重要的生物学功能,包括维持体内平衡,宿主抵抗感染,通过规范 Th1/Th2 平衡进行免疫调节以及消炎和抗肿瘤活性<sup>[22]</sup>。嗜酸性粒细胞浸润是 AR 的特征之一,由 T 细胞、上皮细胞和肥大细胞产生的趋化因子能够将嗜酸性粒细胞募集到鼻黏膜组织。嗜碱性粒细胞脱粒是 AR 早期反应的关键机制,从血液渗入组织后也参与 AR 的后期反应<sup>[23]</sup>。此外,嗜酸性粒细胞能够合成并表达多种细胞因子,在 AR 炎症反应中发挥重要作用<sup>[24-25]</sup>。本研究结果显示,AR 大鼠的鼻黏膜中嗜酸性粒细胞浸润明显,MBP、ECP 及 EPO 的表达明显上调,而在 AR 激发中抑制 CKLF1 显著改善了嗜酸性粒细胞浸润的现象,同时降低了组织内 MBP、ECP 及 EPO 的表达。

#### 4 结论与启示

抑制 CKLF1 能够通过降低变应性鼻炎大鼠血清和鼻黏膜组织内 IL-9 表达以及嗜酸性粒细胞浸润,从而改善变应性鼻炎大鼠打喷嚏、流涕、抓鼻的行为,减轻鼻黏膜组织水肿和黏膜层增厚的现象。但作用的确切机制有待深入探究,以期为变应性鼻炎的诊治提供更明确的思路。

#### 【参考文献】

- [1] BROWN T. Diagnosis and management of allergic rhinitis in children[J]. *Pediatr Ann*, 2019, 48(12):e485-e488.
- [2] MENG Y, WANG C, ZHANG L. Advances and novel developments in allergic rhinitis [J]. *Allergy*, 2020, 75 (12): 3069-3076.
- [3] 孔勇刚, 焦沃尔, 陶泽璋, 等. 变应原免疫治疗对变应性鼻炎的作用机制研究进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2021, 512(12):1149-1152.
- [4] 梁斌, 王年青, 管宏智, 等. 过敏性鼻炎临床症状观察及抗过敏治疗的效果研究[J]. *中国医药指南*, 2018, 16(35):138-139.
- [5] EGUILUZ-GRACIA I, MATHIOUDAKIS AG, BARTEL S, *et al.* The need for clean air: The way air pollution and climate change affect allergic rhinitis and asthma[J]. *Allergy*, 2020, 75 (9):2170-2184.
- [6] CAI X, DENG J, MING Q, *et al.* Chemokine-like factor 1: A promising therapeutic target in human diseases[J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2020, 245(16):1518-1528.
- [7] LIU X, QU C, ZHANG Y, *et al.* Chemokine-like factor 1(CKLF1) aggravates neointimal hyperplasia through activating the NF- $\kappa$ B / VCAM-1 pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(9): 1880-1890.
- [8] 陶可, 李虎. CKLF1 在关节炎发病过程中作用的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2020, 4(4):419-424.
- [9] 苗明三, 项丽玲, 苗艳艳. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. *中草药*, 2018, 49(1):50-57.
- [10] KLIMEK L, SPERL A, BECKER S, *et al.* Current therapeutic strategies for allergic rhinitis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20(1):83-89.
- [11] 李崇妮, 赵长青, 安云芳. 组胺受体及抗组胺药的分类及其在变应性鼻炎中的应用[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2021, 142(4):372-377.
- [12] MATIKAINEN S, JOKIRANTA S, EKLUND K K. Role of cytokines and their blocking in immune-mediated inflammatory diseases[J]. *Duodecim*, 2016, 132(4):349-354.
- [13] 韩文玲, 芮珉, 张颖妹, 等. 趋化素样因子(CKLF1)对骨髓细胞增殖活性的研究[J]. *中国医学科学院学报*, 2001, 23(2): 119-122.
- [14] ZHANG K, SHI S, HAN W. Research progress in cytokines with chemokine-like function[J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15 (7): 660-662.
- [15] BROCKS T, FEDORCHENKO O, SCHLIERMANN N, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor protects from nonmelanoma epidermal tumors by regulating the number of antigen-presenting cells in skin[J]. *FASEB J*, 2017, 31(2):526-543.
- [16] PEASE J E, HORUK R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(5): 467-483.
- [17] TAO K, TANG X, WANG B, *et al.* Distinct expression of chemokine-like factor 1 in synovium of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36(1):70-76.
- [18] 季迎, 张浩, 袁洪, 等. 趋化素样因子-1 在狼疮性肾炎患者肾组织中的表达[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(3): 490-493.
- [19] ZHENG Y, GUO C, ZHANG Y, *et al.* Alleviation of murine allergic rhinitis by C19, a C-terminal peptide of chemokine-like factor 1(CKLF1)[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(12): 2188-2193.
- [20] ANGKASEKWINAI P, DONG C. IL-9-producing T cells: potential players in allergy and cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(1):37-48.
- [21] 罗江伟, 张磊昌. Th9 细胞与肿瘤免疫的研究进展[J]. *右江医学*, 2018, 46(5):606-609.
- [22] ROSENBERG H F, DYER K D, FOSTER P S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(1):9-22.
- [23] 高雅丽, 王威清, 吕威. 外周血嗜酸性粒细胞相关复合指标对嗜酸性粒细胞型慢性鼻窦炎伴鼻窦炎的预测价值[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2021, 28(10):603-607.
- [24] SHAH K, IGNACIO A, MCCOY K D, *et al.* The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis[J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(4):574-583.
- [25] 李迪, 杨琳红. 嗜酸性粒细胞和 IL-33/ST2 水平与变应性鼻炎的相关性[J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2020, 35(6): 599-600,603.

(收稿日期:2021-10-30;修回日期:2022-06-08;编辑:黎仕娟)