

针刺对哮喘大鼠肺组织 p38 蛋白激酶及 c-fos 蛋白表达的影响

杨晓溪, 崔建美*, 喇孝瑾, 孙娜, 刘慧娟, 王洪彬, 林清, 包巨太

(河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨针刺对哮喘大鼠肺组织中 p38MAPK、c-fos 蛋白表达的影响。方法 将 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组、哮喘模型组、哮喘模型针刺组 3 组, 每组 10 只。制作和蛋白组大鼠哮喘模型。采用 HE 染色法、免疫组化法, 观察 3 组大鼠肺组织病理变化及 p38MAPK、c-fos 蛋白的表达程度。结果 针刺组大鼠肺组织 HE 染色病理改变较哮喘模型组有所减轻, 但较空白组重。免疫组化结果显示, 针刺组大鼠肺组织 p38MAPK、c-fos 蛋白表达 (AOD 值) 低于哮喘模型组 ($P < 0.01$)。结论 针刺法具有良好抗炎作用, 能有效缓解大鼠哮喘发作。该法能明显抑制哮喘大鼠肺组织 p38MAPK、c-fos 的表达。其治疗作用机制: 可能与 MAPK 接受细胞外针刺刺激发生反应, 又参与细胞内的信息传递过程有关。

关键词: 哮喘; p38 丝裂原活化蛋白激酶; c-fos 蛋白; 针刺; 免疫组化

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2013.04.109

中图分类号: R2-03 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2013)04-1004-03

The Effects of Acupuncture on P38 MAPK and C-fos Expression in the Lung Tissues of Asthmatic Rats

YANG Xiao-xi, CUI Jian-mei*, LA Xiao-jin, SUN Na, LIU Hui-juan, WANG Hong-bin, LIN Qing, BAO Ju-tai
(Hebei United University, Tangshan, 063000, China)

Abstract: Objective To examine this mechanism, we observed the effects of acupuncture on p38 MAPK and c-fos expression in the lung tissues of asthmatic rats. **Methods** Thirty adult male rats SPF grade were randomly divided into blank group, asthmatic model group and acupuncture model group by random number table; each group consisted of 10. Asthma rat model sensitized and challenged by ovalbumin was established. Light microscope was used to observe the effects of acupuncture on p38 MAPK and c-fos expression with HE staining and immunohistochemistry method. **Results** HE staining of rat lung indicated that the pathological changes of acupuncture group were very slight than asthmatic model group, but were worse than those of blank group. Immunohistochemistry showed that the protein expression of p38 and c-fos (AOD) in lung tissue in acupuncture group were lower than that in the asthmatic model group ($P < 0.01$). **Conclusion** This needling has a significant anti-inflammatory effect, and can effectively relieve the clinical symptoms of asthmatic rats. This method can effectively decrease the lung tissues p38 MAPK and c-fos contents, and its mechanism perhaps is related to MAPK which plays an important role in the regulation of transferred signals between intracellular and extracellular by acupuncture stimulating.

Key words: Asthma; p38 MAPK; C-fos; Acupuncture; Immunohistochemistry

支气管哮喘 (bronchial asthma) 是以 IgE 介导的, 以嗜酸性粒细胞浸润为主的, 多种细胞、细胞因子及炎症介质参与的慢性呼吸道炎症^[1]。其发病率、病死率仍呈国际性增长趋势^[2-3], 是危害人类健康的常见疾病之一。有研究显示 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 与肥大细胞和嗜酸性粒细胞的活化密切相关, 在鸡卵蛋白 (OVA) 诱导的支气管哮喘中, 活化 p38 (p-p38) 在大鼠肺组织的表达显著增加, 并与气道阻力等呈正相关^[4]。原癌基因 c-fos 亦可受多种炎症介质、炎症细胞、细胞因子激活, 其在大多数正常细胞中表达水平较低, 激活后可参与哮喘的病理过程^[5]。本实验拟以免疫组化等方法分析, 针刺对大鼠哮喘模型肺组织 p38MAPK 及 c-

fos 蛋白表达的影响, 为探讨针刺治疗哮喘的机制, 提供微观的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (117 ± 8.93) g, 购于天津市山川红实验动物科技有限公司, 许可证号: SCXK (津) 2009-0001。动物饲养在河北联合大学实验动物中心屏障环境动物实验设施 [SYXK (冀) 2010-0028] 进行, 环境温度 20℃ ~ 25℃, 湿度 60% ~ 70%, 通风良好。实验动物均使用采取“3R”原则, 给予人道关怀。大鼠饲料: 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2009-0008。动物饮水采用超滤系统处理的无离子水。

1.2 试剂和仪器 OVA 为美国 Sigma A5378。Al(OH)₃ 凝胶: 购于天津欧朋凯化工有限公司, 批号: 20110711。兔抗大鼠 p38、c-fos 多克隆抗体, 均为 Biogenet 公司产品。超敏 SP 试剂盒 (Kit-9910), DAB (Kit-0021) 均购于福州迈新生物公司。德国蔡司切片相机, 型号: RM2235。奥林巴斯光学显微镜, 型号: BX51。

2 方法

2.1 分组 将 30 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别为:

收稿日期: 2013-08-20; 修订日期: 2013-12-27

基金项目: 河北省自然科学基金 (No. C2010001797)

作者简介: 杨晓溪 (1980-), 女 (汉族), 河北唐山人, 现任河北联合大学讲师, 硕士学位, 主要从事中西医结合护理教学工作。

* 通讯作者简介: 崔建美 (1978-), 女 (汉族), 河北保定人, 现任河北联合大学中医学院副教授, 博士学位, 主要从事针灸教学及针灸的临床研究工作。

空白组:未予任何处理;哮喘模型组:复制哮喘模型,无针刺处理;哮喘模型针刺组:自造模之日起,按照下述针刺干预方法处理,皆遵照第 7.4 节以适应环境。

2.2 动物饲养饲养:参考文献方法[6],哮喘模型组及哮喘模型针刺组 SD 大鼠分别 1 次性腹腔注射含 OVA 1 mg 和 Al(OH)₃ 10mg 的生理盐水 1ml,两周后颈外静脉内注射 OVA (15 mg/kg),诱发哮喘发作。

2.3 针刺干预:取穴:据文献[6]取天枢(双)、津液(双)、风门(双),依照第 6 版《实验针灸学》[7]的大鼠常用穴位定位方法来确定此次穴位定位。天枢:第 7 胸椎与第 1 腰椎间,背部正中。津液:第 3 胸椎下两旁肋间。风门:第 2 胸椎下两旁肋间。

针刺方法:平补平泻,每次留针 20 min,每隔 5 min 行针 1 次(以 200 次/min 捻转速度,捻针 20 次为行针 1 次),隔日针刺 1 次,共计 7 次。

2.4 切片制备:参考文献方法[6],并略加修正。哮喘模型组及哮喘模型针刺组用 10%的水合氯醛按 3.5 ml/kg 腹腔注射麻醉,剖开大鼠右胸中叶,右心室头皮针插管并剪开心耳,以无白金针夹夹住右肺基底部至双肺呈苍白色。整体取出心肺和气管,清除心脏、气管、大血管和肺门周围结缔组织,剥离静,生理盐水漂洗干净,吸水纸拭干。剪出约 1.5 的右肺中叶,4% 甲醛固定,24 h 后石蜡包埋。

2.5 肺组织病理学观察:各组大鼠肺组织石蜡切片分别行苏木素伊红(HE)染色,显微镜下观察气道、肺组织病理学改变。

2.6 肺组织 p38MAPK 及 c-fos 蛋白表达的检测:免疫组织化学染色采用 SABC 法,实验操作按 S-P 试剂盒说明书进行,并略加修正。其步骤如下:①石蜡切片常规脱蜡至水,PBS 洗 3×5 min;②高压修复抗原,修复液按磷酸盐(自制),待煮气 1.5 min 后,冷水冷却,PBS 洗 3×5 min;③滴加内源性过氧化物酶抑制剂(S-P 试剂盒 A 试剂)室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 洗 3×5 min;④滴加非免疫性牛血清白蛋白(S-P 试剂盒 B 试剂),室温下孵育 20 min,以减少非特异性背景,去清冲洗,倒去多余血清;⑤滴加第一抗体(兔抗大鼠 p38 多克隆抗体,工作浓度 1:100;或兔抗大鼠 c-fos 多克隆抗体,工作浓度 1:100),置湿盒内 4℃ 冰箱过夜,PBS 洗 3×5 min;⑥滴加生物素标记的羊抗兔 IgG(S-P 试剂盒 C 试剂,工作浓度 1:500),置湿盒内,37℃ 恒温箱孵育 30 min,PBS 洗 3×5 min;⑦滴加过氧化物酶标记的链霉亲和素(S-P 试剂盒 D 试剂,工作浓度 1:500),室温下孵育 30 min,PBS 洗 3×5 min;⑧切片 DAB 染色 5 min,流水充分冲洗;⑨苏木素复染 1 min,分化:返蓝;⑩梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封固,光镜观察。

阴性对照采用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

2.7 免疫组织化学结果判断:细胞染色呈棕黄色为阳性细胞。根据刘月华等[8]免疫组织化学结果判断标准定性处理,阴性(-):阳性细胞数<5%;弱阳性(+):阳性细胞数 5%~25%;中度阳性(++):阳性细胞数 25%~50%;强阳性(+++):阳性细胞数>50%。以大鼠肺组织细胞胞浆核染色强度或背景非特异染色并 5% 以上为阳性。细胞不着色与背景一致为阴性。

半定量处理:运用 OLYMPUS BX51 型显微镜系统配有图像采集,用 Image pro plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司)图像分析软件,测定 p38MAPK 及 c-fos 阳性表达的平均光密度(Average optical density:AOD)。AOD=累计光密度(TOD)/图像面积-组织空白区面积。每张切片随机选择 5 个高倍视野(×400),计算其 AOD 均均值,作为该切片的代表值,反应其阳性表达的强度。

2.8 统计学处理:所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计

软件包进行分析。经正态分布及方差齐性检验后,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验其差异性。满足正态分布及方差齐性资料,多组间两两比较采用 LSD 法,Duncan 法分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肺组织病理学变化:石蜡切片 HE 染色镜下观察示,空白组大鼠仅偶见极少量炎性细胞,但未见嗜酸性粒细胞;支气管、肺组织结构正常。哮喘模型组大鼠气道腔内有嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等多种炎症细胞的浸润和聚集,可见支气管平滑肌增生,管腔狭窄;气道黏膜下组织水肿等病理改变。针刺组大鼠气道腔内仍有炎性细胞的浸润,但与模型组相比则明显减轻;支气管平滑肌增生,管腔狭窄有不同程度的好转。见图 1。



图 1 各组大鼠肺组织病理学变化(HE×400)

3.2 各组大鼠肺组织免疫组化染色结果

3.2.1 各组免疫组化图片:免疫组化染色结果显示,p38MAPK 阳性表达呈棕黄色或棕褐色,主要位于细胞浆、细胞核和细胞膜。p38MAPK 在空白组切片中,表达较少,呈阴性表达(-)。而在哮喘模型组切片中,其表达明显增多,呈弱阳性表达(+),弥漫或散在分布;主要分布在支气管黏膜等部位。针刺组 p38MAPK 的表达较哮喘模型组少,呈阴性表达(-)。c-fos 细胞核染色呈蓝色,阳性表达呈棕黄色或棕褐色。在空白组和针刺组表达很少,呈阴性表达(-)。在哮喘模型组表达良好,呈阳性表达(+)。见图 2~3。

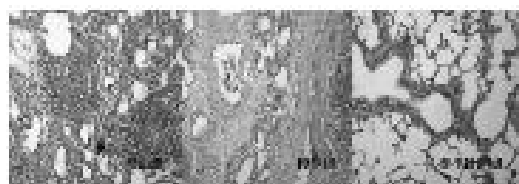


图 2 p38MAPK 大鼠肺组织中的表达(免疫组化×400)



图 3 c-fos 蛋白大鼠肺组织中的表达(免疫组化×400)

3.2.2 各组大鼠肺组织 p38MAPK 及 c-fos 蛋白阳性表达的 AOD 值:见表 1。p38MAPK 阳性表达 AOD 值比较:哮喘模型组明显高于空白组($P < 0.01$, $P = 2.07E-08$);针刺组亦高于空白组($P < 0.01$, $P = 0.001$);且针刺组阳性表达强度低于哮喘模型组($P < 0.01$, $P = 0.0002$),差异均具有统计学意义。c-fos 蛋白阳性表达 AOD 值比较:哮喘模型组高于空白组及针刺组($P < 0.01$; $P_{\text{空}} = 7.6E-19$; $P_{\text{针}} = 8.95E-18$),差异具有统计学意义;针刺组与空白组相比,其阳性表达强度高于空白组,但二者差异

不具有统计学意义 ($P > 0.05$, $P = 0.051$)。

4 讨论

p38MAPK 属于 MAPK 家族中的一个亚族, 是广泛存在于细胞核内的含有丝氨酸/苏氨酸残基的蛋白激酶。近年来研究发现^[16], p38MAPK 在急性炎症过程中被活化并参与炎症的形成与维持, 其活化与炎症引起的热、红、肿有密切关系^[10], 能对多种细胞外刺激发生反应, 又参与多种细胞内信息传递过程, 可磷酸化其它细胞质蛋白, 并能从胞浆移位至细胞核而调节转录因子的活性来改变基因的表达水平, 从而介导细胞生长、发育、分化及死亡的全过程。c-fos 原癌基因位于人类常染色体 14q24.3-q31 上, 其蛋白产物与 c-jun 蛋白组成稳定的异二聚体活性蛋白-1 (AP-1), 后者可与 DNA 分子特异的顺序 AP-1 位点结合, 属于转录因子, 所以 c-fos 基因与细胞生长、增殖活化密切相关。c-fos 在多数正常细胞中呈有表达, 在哮喘发病过程中, 白三烯、前列腺素、血小板活化因子等多种介质, 可能通过激活 MAPK 而使核内转录因子 c-fos 与 c-jun 磷酸化, 从而促进气道平滑肌细胞 (ASMC) 增生, 提示 c-fos 参与哮喘的气道重塑^[17]。此外, c-fos 表达增高还能调节炎症反应, 阻断髓鞘脂质素及其受体对某些基因转录的诱导, 进一步加重哮喘的发生。有研究表明, c-fos 蛋白的表达, 与细胞内钙离子的浓度呈正相关^[18]。

表 1 各组大鼠肺组织 p38MAPK 及 c-fos 蛋白阳性表达的比较 (AOD 值) ($\bar{x} \pm s$)

组别	p38MAPK	c-fos 蛋白
空白组	0.005 ± 0.001 01	0.002 7 ± 0.001 78
哮喘模型组	0.010 1 ± 0.001 98 [△]	0.013 9 ± 0.001 36 [△]
哮喘模型针灸组	0.007 3 ± 0.001 26 ^{△▲}	0.003 8 ± 0.001 16 [▲]

与空白组比较, [△] $P < 0.01$; 与哮喘模型组比较, [▲] $P < 0.01$; $n = 10$

实验结果显示, 哮喘模型组 HE 染色镜下观察, 炎症病理改变明显; 经本法针刺干预后, 炎症反应明显减轻, 但仍未达到正常组水平。哮喘模型组肺组织 p38MAPK, c-fos 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$); 针刺后 p38MAPK, c-fos 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), c-fos 蛋白降低至与正常组无统计学差异 ($P > 0.05$)。以上说明, 本取穴针刺法具有良好的抗炎作用, 能有效缓解大鼠哮喘发作。本法能明显抑制哮喘大鼠肺组织 p38MAPK, c-fos 蛋白的表达, 阻断细胞内某些信息的传递过程, 降低某些基因表达, 减少某些细胞增殖活化, 进而发挥其治疗作用。其机制可能与 MAPK 接受细胞外针刺刺激发生反应, 又参与细胞内的信息传递过程有关。c-fos 表达的降低, 亦可能与针刺抑制 ASMC 钙调蛋白 (Cav3.1 蛋白) 表达的作用有关^[19]。

与目前最有效治疗哮喘的糖皮质激素疗法相比, 本法具有副作用小, 操作简单, 可长期治疗等优点, 值得大力推广。对于其机制的研究亦应继续。当前, 对于针刺在信号转导通路方面的研究尚未深入开展, 文献仅见零星报道, 本实验可为下一步研究提供前期的准备和必要的思路。

参考文献:

- [1] Barthel SB, Johnson MW, McNamee DM, et al. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 1.
- [2] Dinmore R. The rising tide of asthma: A look at what is causing this epidemic [J]. *Asthma Mag*, 2005, 10(1): 14.
- [3] Sennhauser FH, Charlotte BF, Wildhaber JH. Mini-symposium: burden of asthma [J]. *Pediatr Respir Rev*, 2005, 6(1): 2.
- [4] Choudhury BK, Wilm JS, Akou R, et al. In Vivo Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Mediating the Anti-inflammatory Effects of CpG Oligodeoxynucleotide in Murine Asthma [J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(5): 5955.
- [5] Hessel NN, Dietz GB. Gene expression profiling in human asthma [J]. *Proceedings of the ATS*, 2006, 32(4): 156.
- [6] 崔晓军, 杨永清, 陈介华, 等. 针刺对过敏性哮喘大鼠的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 1999, 18(1): 15.
- [7] 沈开华, 梁晓红, 刘艳霞, 等. 针刺对松节油的临床疗效分析 [J]. *中华护理杂志*, 2004, 33(5): 441.
- [8] Sorenson GL, Moschis M, Westrich A, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing [J]. *Neurochem*, 2003, 86(6): 1534.
- [9] 杜佩霖, 万剑奇, 梁一平, 等. p38MAPK 通路参与炎症及电针干预的可能性 [J]. *医学信息*, 2011, 24(6): 3612.
- [10] McKay S, De Jonghe JC, Savaris PR, et al. Angiotensin II induces by genotoxicity of human airway smooth muscle cells expression of transcription factors and transforming growth factor-beta [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18(6): 823.
- [11] Walker VM, Moore SM, Jensen ME, et al. Protein-tyrosine kinase-3 and protein-tyrosine kinase-5 kinase in mediating airway smooth muscle proliferation [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 54(5): 1007.
- [12] Morgan JL, Cannon TN. Role of mitogen-activated protein kinase in the control of c-fos expression [J]. *Nature*, 1996, 322(6079): 552.
- [13] 王中, 孙健, 金融, 等. 针刺对哮喘大鼠气道炎症模型气道平滑肌细胞内钙调蛋白表达的影响 [J]. *中国针灸*, 2012, 32(6): 534.