

• 实验研究 •

JNK 信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在变应性鼻炎大鼠鼻黏膜组织重塑中的作用*

李钦¹ 陈彦林¹ 马焱焱¹ 张永东² 孙崇伟³

[摘要] 目的:探讨 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在变应性鼻炎(AR)大鼠鼻黏膜组织重塑过程中的作用。方法:将 60 只 Wistar 大鼠以随机数字表法分为 AR 组(A 组)和对照组(B 组)。A 组以卵清蛋白(OVA)、氢氧化铝建立 AR 鼻黏膜重塑模型,根据致敏和激发时间不同,分为 4、8、12 周组(分别为 A4、A8、A12 组);同时设立相应对照组(分别为 B4、B8、B12 组),以生理盐水代替 OVA。苏木精-伊红染色观察 2 组大鼠各时期鼻黏膜组织的病理变化;免疫组织化学法检测鼻黏膜组织磷酸化 JNK(P-JNK)及磷酸化 c-Jun(P-c-Jun)蛋白的表达。结果:A 组大鼠 8 周时鼻黏膜水肿,黏膜层增厚,并有大量以 EOS 为主的炎性细胞浸润;随着致敏和激发时间的逐渐延长,上述炎症症状明显加重。A 组各时期 P-JNK 及 P-c-Jun(mA 值)均高于同期 B 组(均 $P < 0.01$),且 12 周时二者均高于 4、8 周时(均 $P < 0.01$)。结论:JNK 信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在 AR 大鼠鼻黏膜重塑组织中表达显著增高,提示 P-JNK 和 P-c-Jun 参与了 AR 大鼠鼻黏膜组织重塑的过程。

[关键词] 鼻炎,变应性;c-Jun 氨基末端激酶;重塑

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.23.011

[中图分类号] R765.21 **[文献标志码]** A

Role of P-JNK and P-c-Jun of JNK transduction pathway on the nasal mucosa remodeling in allergic rhinitis rats

LI Qin¹ CHEN Yanlin¹ MA Yanyi¹ ZHANG Yongdong² SUN Chongwei³

(¹Department of Otorhinolaryngology, Linyi People's Hospital of Shandong Province, Linyi, 276003, China; ²Department of Pharmacology, Shandong Medical College; ³Department of Immunology, Linyi People's Hospital of Shandong Province)

Corresponding author: LI Qin, E-mail: lq2842@163.com

Abstract Objective: To study the role of P-JNK and P-c-Jun of JNK (c-Jun N-terminal kinase) on nasal mucosa remodeling in allergic rhinitis rats. **Method:** Sixty male Wistar rats (weighing about 200–250 g) were randomly divided into AR group (A group) and B group (control group). The rats in A group were sensitized for inducing AR by intraperitoneal injection of ovalbumin and Al(OH)₃. Rats in group A were randomized into A4, A8 and A12 group (each had 10 rats). Ovalbumin was dropped in each nasal cavity of every rat for 4, 8, 12 weeks, respectively. Rats in group B were sensitized by saline instead of OVA, and were also divided into B4, B8 and B12 group. Each group had 10 rats. Pathological changes of nasal mucosa in each period were observed by hematoxylin and eosin stain dyeing. The phosphorylation of JNK and c-Jun were tested by immunohistochemistry. **Result:** In A8 group, mucosal congestion and edema thickening with inflammatory cells infiltration of eosinophils were observed in the eighth week, and the inflammatory changes were significantly increased as time went on. The mean absorbance values of P-JNK and P-c-Jun in A group were significantly higher than those in the corresponding B group (all $P < 0.01$). Moreover, the mean absorbance values of A12 group were significantly higher than A4 group and A8 group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of P-JNK and P-c-Jun in the process of nasal mucosa remodeling in allergic rhinitis rats were increased, which suggested that P-JNK and P-c-Jun played important roles in nasal mucosa remodeling of the allergic rhinitis rats.

Key words rhinitis, allergic; c-Jun N-terminal kinase; remodeling

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)引起的鼻黏

膜组织重塑已逐渐被人们重视,其主要特征是鼻黏膜纤毛上皮损伤、杯状细胞增生,细胞外基质沉积等病理学改变^[1],但其确切的发生机制目前尚未清楚。许多研究已表明,信号转导通路参与了哮喘气道重塑的形成,其中 JNK 信号转导通路在哮喘气道重塑的过程中发挥着重要作用^[2]。2013-04—

* 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No: ZR2013HL020)

¹临沂市人民医院耳鼻咽喉科(山东临沂,276003)

²山东医学高等专科学校药理学教研室

³临沂市人民医院临床免疫科

通信作者:李钦, E-mail: lq2842@163.com

2014-10 我们通过建立 AR 大鼠鼻黏膜组织重塑模型,研究 JNK 信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在 AR 大鼠鼻黏膜重塑组织中的表达,旨在探讨 P-JNK 和 P-c-Jun 在 AR 鼻黏膜重塑过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

精选 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 200~250 g(由山东大学实验动物中心提供),在室温 22~24℃ 下饲养,自由进食水,每天光照 12 h,饲养于标准 II 级动物房。将大鼠称重,随机数字表法分为 AR 组(A 组)和对照组(B 组)2 组,根据致敏和激发时间不同,再将 A 组随机分为 4、8、12 周组(分别为 A4、A8、A12 组),同时随机设立相应对照组(分别为 B4、B8、B12 组),每组 10 只。除去 A4 组死亡 1 只、A8 组死亡 2 只,B4 组丢失 1 只,各组最后纳入实验的大鼠:A4 组 9 只、A8 组 8 只、A12 组 10 只、B4 组 9 只、B8 组 10 只、B12 组 10 只。

1.2 主要试剂及仪器

卵清蛋白(OVA)干粉剂(5 级, Sigma 公司, 美国);氢氧化铝粉剂(Sigma 公司, 美国);磷酸化 JNK (P-JNK)、P-c-Jun 多克隆抗体、10x 组织裂解液、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(CST 公司, 美国);HPIAS2000 型图像分析软件(武汉同济医科大学千屏影像公司);OLYMPUS 显微镜(JAPAN)。

1.3 大鼠 AR 鼻黏膜重塑模型的建立

建模方法参考文献[3],采用 OVA 为变应原致敏,用含 OVA 0.3 mg 及氢氧化铝 30 mg 的生理盐水混悬液 1 ml,对 A 组大鼠行腹腔内注射,隔日 1 次,共 7 次,作为基础致敏;从第 14 天起, A 组以 5% OVA 局部鼻腔滴入,每只每侧 50 μl,每日 1 次,共 7 次,为强化致敏;继续每周 2 次每只每侧鼻腔内以 1% OVA 50 μl 攻击,连续 9 周。B 组参照上述方法,致敏和激发时均以生理盐水代替 OVA。A4 和 B4、A8 和 B8、A12 和 B12 致敏和激发时间分别为 4、8、12 周。

1.4 鼻腔组织标本采集及处理

各组大鼠均于末次激发后 24 h,将大鼠颈椎脱臼处死,取其鼻中隔黏膜组织,用 1% 甲醛固定 24 h 后脱水,石蜡包埋,制备 4 μ 标准切片,常规行苏木精-伊红染色观察鼻黏膜组织病理学改变,并

行免疫组织化学检测。

1.5 免疫组织化学法检测鼻黏膜组织 P-JNK 和 P-c-Jun 蛋白的表达

一抗:P-JNK 和 P-c-Jun 多克隆抗体稀释度均为 1:50,二抗及检测试剂盒为 SP 工作液,DAB 显色,苏木精复染,显微镜下观察,以胞质染成棕黄色为阳性。采用 HPIAS2000 型图像分析软件在全自动图像分析系统上进行定量分析,每组标本随机选 10 张切片,每张切片 400 倍镜下随机计数 5 个视野测定阳性部位的平均吸光度(mean absorbance, mA),代表蛋白表达水平。

1.6 统计学处理

全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。多组样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);两两比较方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Dunnett'T3 检验。

2 结果

2.1 动物一般情况

A 组大鼠在激发时均出现不同程度的搔鼻、喷嚏、流涕等过敏症状,严重者躁动不安、呼吸节律不齐,而 B 组无上述表现。随着变应原致敏和激发时间的延长, A 组大鼠上述症状反而有所减轻,但体重增长缓慢,毛色无光泽。

2.2 AR 大鼠鼻腔黏膜组织的病理学变化

A 组大鼠 8 周时鼻黏膜充血、水肿,黏膜层增厚,并有大量以 EOS 为主的炎性细胞浸润;随着致敏和激发时间的逐渐延长,上述炎性改变明显加重。见图 1。

2.3 鼻组织 P-JNK、P-c-Jun 蛋白的表达

免疫组织化学结果显示 P-JNK 及 P-c-Jun 蛋白均表达于胞质,且主要表达于黏膜上皮细胞及散在的炎性细胞。二者表达呈明显的一致性:A 组 4、8、12 周时二者表达强度均高于同时期 B 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),随时间延长, A 组 12 周时二者表达均高于 4 周、8 周时(均 $P < 0.01$)。见表 1,图 2,图 3。

3 讨论

JNK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族成员,是重要的细胞信号分子之一,它在细胞分化、凋亡、应激反应以及人类多种疾病的发生发展中起着重要的作用。

表 1 各组大鼠 P-JNK 和 P-c-Jun 平均吸光度在不同时期的比较

mA, $\bar{x} \pm s$

组别	P-JNK			P-c-Jun		
	4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
A 组	0.244 ± 0.037 ¹⁾	0.275 ± 0.033 ¹⁾²⁾	0.340 ± 0.009 ¹⁾²⁾³⁾	0.226 ± 0.011 ¹⁾	0.279 ± 0.012 ¹⁾²⁾	0.356 ± 0.010 ¹⁾²⁾³⁾
B 组	0.111 ± 0.018	0.090 ± 0.009	0.095 ± 0.010	0.104 ± 0.012	0.105 ± 0.017	0.104 ± 0.011

与 B 组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 A 组 4 周比较,²⁾ $P < 0.01$;与 A 组 8 周比较,³⁾ $P < 0.01$ 。

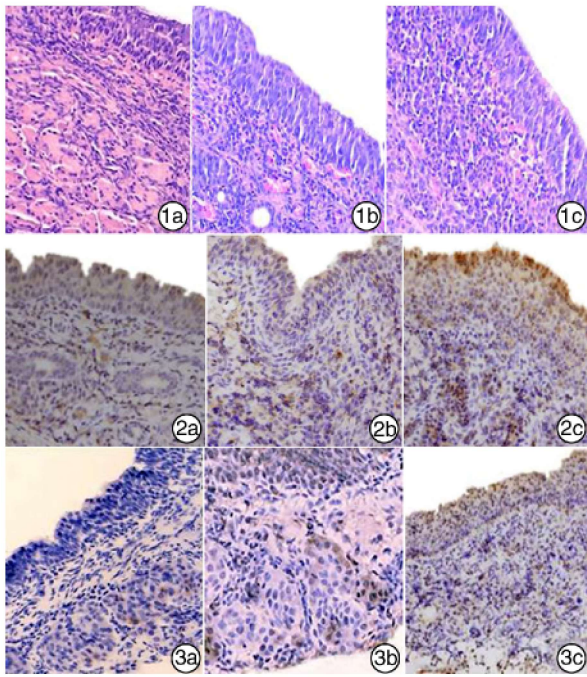


图 1 光镜下大鼠鼻黏膜的病理表现 1a: B 组 12 周大鼠鼻黏膜, 未见明显异常; 1b: A 组 8 周大鼠鼻黏膜充血、水肿, 黏膜层增厚, 并有大量以 EOS 为主的炎性细胞浸润; 1c: A 组 12 周大鼠鼻黏膜炎性改变明显加重, 伴有大量炎性细胞浸润; **图 2** 大鼠鼻黏膜组织中 P-JNK 的表达情况 SP 法 $\times 200$ 2a: B 组 12 周大鼠鼻黏膜组织中 P-JNK 的表达; 2b: A 组 8 周大鼠鼻黏膜组织中 P-JNK 的表达; 2c: A 组 12 周大鼠鼻黏膜组织中 P-JNK 强阳性表达; **图 3** 大鼠鼻黏膜组织中 P-c-Jun 的表达情况 SP 法 $\times 200$ 3a: B 组 12 周大鼠鼻黏膜组织中 P-c-Jun 的表达; 3b: A 组 8 周大鼠鼻黏膜组织中 P-c-Jun 的表达; 3c: A 组 12 周大鼠鼻黏膜组织中 P-c-Jun 强阳性表达。

JNK 信号转导通路可以被细胞外多种信号激活, 如各种细胞因子 (TNF、EGF、IL-1)、电离辐射、氧化应激、热休克以及某些 G 蛋白偶联受体等^[4-5]。JNK 的活化是通过其氨基末端残基磷酸化实现的, 经上游激酶激活后 JNK 由胞质移位至胞核, 活化的 JNK 可调控转录因子 AP-1 蛋白, 如 c-Jun、JunB、JunD 和 ATF2, 提高其转录活性, 促进基因的表达和蛋白质的合成, 从而参与细胞增殖和凋亡的调节^[6]。

重塑是机体对损伤组织进行异常修复的结果, 由于反复损伤而导致正常组织结构不能恢复, 或不正常的修复过程本身导致的永久性结构异常。当组织重塑发生后, 其靶器官的组织结构变化往往很难逆转, 从而给疾病的治疗造成一定困难。近年来, 随着对下气道重塑的深入研究, 哮喘引起的组织重塑已被广泛理解, JNK 信号通路在哮喘发病过程中的作用及以 JNK 为切入点的治疗思路已备受重视^[2]。研究表明, 无论黏膜上皮结构还是对抗原

刺激的反应上呼吸道都与下呼吸道极为相似, 引起 AR 与哮喘的免疫学过程也基本相同^[7]。通过观察长期鼻黏膜抗原暴露 (8 周以上) 的豚鼠慢性 AR 动物模型, 发现上皮细胞损伤, 鼻黏膜上皮杯状细胞化生和细胞外基质沉积等与哮喘具有相似的组织病理学变化, 证实在 AR 大鼠中存在着鼻黏膜组织重塑^[1]。

我们通过逐渐延长变应原激发时间, 建立 AR 大鼠鼻黏膜重塑模型, 研究各时期 JNK 通路途径蛋白 P-JNK 及 P-c-Jun 的变化规律。结果发现, A 组各时期大鼠 P-JNK 和 P-c-Jun 蛋白表达均显著高于同时期 B 组, 且随变应原激发时间的延长, P-JNK 和 P-c-Jun 表达逐渐增加, A 组 12 周时二者的表达均高于 4、8 周 (均 $P < 0.01$)。与之相对应, 此时可见鼻黏膜组织显著增厚, 伴有大量炎性细胞浸润的形态学改变, 且随着致敏和激发时间的逐渐延长, 上述炎性改变明显加重。以上实验结果表明: JNK 信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在 AR 大鼠鼻黏膜重塑组织中表达显著增高, 提示 P-JNK 和 P-c-Jun 参与了大鼠 AR 鼻黏膜组织重塑的进程, 并起到了一定的作用。

当然, AR 鼻黏膜组织重塑的形成是一个复杂的病理过程, 本研究只是探讨了 JNK 信号途径蛋白 P-JNK 和 P-c-Jun 在其发生机制中的作用, 很多机制还有待于进一步研究和完善。

参考文献

- [1] 余文煜, 董震. 实验性变应性鼻炎鼻黏膜组织重塑的特点[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41(1): 48-53.
- [2] BLEASE K, LEWIS A, RAYMON H K. Emerging treatments for asthma[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2003, 8: 71-81.
- [3] 李钦, 孔平, 武彩霞, 等. 鼻腔吸入 γ 干扰素对大鼠变应性鼻炎转化生长因子 β_1 /Smad 信号通路的影响[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 46(1): 59-62.
- [4] XUE L, IGAKI T, KURANAGA E, et al. Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila[J]. Dev Cell, 2007, 13: 446-454.
- [5] JIANG Q, YUAN Y, ZHOU J, et al. Apoptotic events induced by high glucose in human hepatoma HepG2 cells involve endoplasmic reticulum stress and MAPK's activation[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399: 113-122.
- [6] 魏娜, 贺海波, 张长城, 等. JNK 信号通路及细胞凋亡关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(7): 807-812.
- [7] 刘建国, 刘月辉. 上下呼吸道炎性黏膜重塑病理形态研究进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(15): 717-720.

(收稿日期: 2015-07-28)