

· 基础研究 ·

p38MAPK 在慢性鼻炎大鼠嗅黏膜中的表达及意义

赵琳¹, 张向红², 曹辉¹, 梁建民², 孙斌², 王波涛²

(1. 西安医学院附属医院耳鼻咽喉科, 陕西西安 710077; 2. 西安交通大学第二医院耳鼻咽喉科, 陕西西安 710004)

摘要: 目的 研究慢性鼻炎大鼠嗅黏膜 p38 信号蛋白的表达, 探讨慢性鼻炎嗅觉疾病的发病机制, 为临床治疗慢性鼻炎鼻窦炎症性嗅觉疾病提供理论依据。方法 采用免疫组化 S-P 法测定 20 例慢性鼻炎大鼠嗅黏膜(慢性鼻炎组)和 20 例正常对照组大鼠嗅黏膜中 p38 信号蛋白的表达。结果 慢性鼻炎组大鼠嗅黏膜上皮层和固有层嗅腺中 p38 丝裂原素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)的表达均高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。慢性鼻炎组大鼠嗅黏膜上皮层和固有层嗅腺中磷酸化的 p38 丝裂原素活化蛋白激酶(Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, Phospho-p38 MAPK)的表达均高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 p38 信号传导通路在慢性鼻炎大鼠嗅黏膜疾病的发生发展中具有重要的调控作用。

关键词: 慢性鼻炎; 嗅黏膜; p38 丝裂原素活化蛋白激酶; 信号传导通路

中图分类号: R765.25

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)04-0252-06

Expression of p38 signaling proteins in olfactory mucosa of rats with chronic rhinitis and its significance

ZHAO Lin, ZHANG Xiang-hong, CAO Hui, et al.

(Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China)

Abstract: **Objective** To study expression of p38 signaling proteins in olfactory mucosa of rats with chronic rhinitis, in order to elucidate the possible mechanism of olfactory diseases caused by chronic rhinitis, and to provide theoretical base for clinical treatment. **Methods** The expression of p38 signaling proteins in the olfactory mucosa of 20 rats with chronic rhinitis and that in 20 normal rats were studied by means of immunohistochemical S-P method. **Results** ① The expression of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the olfactory mucosa of the rats with chronic rhinitis was higher than that in the normal rat with statistical significance ($P < 0.05$). ② The expression of Phospho-p38 MAPK in the olfactory mucosa of the rats with chronic rhinitis was higher than that in normal rats also with a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The p38 signal transduction access plays an important regulatory role in the pathogenesis and development of olfactory mucosal diseases in rats with chronic rhinitis.

Key words: Chronic rhinitis; Olfactory mucosa; P38 mitogen-activated protein kinase; Signal transduction access

丝裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内主要的信

号转导系统,细胞运用这一转导系统将细胞外刺激信号传递到细胞核内,介导细胞产生反应。MAPK 是最近确定为 p38 的信号传导通路, p38 丝裂原素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)信

基金项目:陕西省攻关项目,编号 2005K12-G2(2)。

作者简介:赵琳,女,主治医师,硕士。

通讯作者:张向红, Email:myu@fmmu.edu.cn.

号转导通路在炎性反应性疾病的发生和发展中具有重要的调控作用。据此推测,慢性鼻炎引起的嗅觉疾病中也可能存在 p38MAPK 信号传导通路信号的干预和调控。本实验用免疫组化 S-P 法观察慢性鼻炎大鼠嗅黏膜和正常大鼠嗅黏膜组织中 p38MAPK 信号传导通路的表达情况,为临床治疗慢性鼻炎鼻窦炎嗅觉学疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

p38MAPK 单克隆抗体、Phospho-p38MAPK 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。免疫组化试剂盒购自中国迈新生物技术有限公司。

1.2 慢性鼻炎大鼠动物模型的建立

选用月龄 4~6 周、体重 120~160 g SD 大鼠 40 只,雌雄各半,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。动物一般状态良好,鼻周无分泌物,无喷嚏,无抓挠鼻现象,皮毛光滑,活动饮食正常。慢性鼻炎组(20 只):将 200 μ l 肺炎克雷伯氏杆菌(中国药品生物制剂鉴定所菌种库,批号 46117)滴入大鼠双侧鼻孔(每侧 100 μ l),每日 1 次,连续滴鼻 7 d 后改为隔日滴鼻,共 21 d。对照组(20 只):以生理盐水代替菌液,方法及滴鼻时间同慢性鼻炎组。

1.3 免疫组化染色

处死大鼠,解剖鼻腔,暴露筛板和鼻中隔,取紧邻筛板处鼻中隔嗅黏膜。将取出的嗅黏膜经 10% 甲醛固定后石蜡包埋,经 5 μ m 厚连续组织切片,分别用于 HE 染色及免疫组化染色。染色步骤:脱蜡和水化;高温高压抗原修复;滴加 3% 过氧化氢孵育 30 min,以消除内源性过氧化物酶活性;正常山羊血清(TBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min;p38MAPK 或磷酸化的 p38 丝裂原素活化蛋白激酶(Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, Phospho-p38MAPK) 7.0 μ l,37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 1.5 h,置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜;生物素标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min;辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(1:100 TBS 稀释)37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min;新配

制的 DAB 溶液,显微镜下观察 4~12 min 以控制显色时间;苏木素浅染,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。各步之间用 TBS 冲洗,3 min \times 3 次。TBS 代替第一抗体作为空白对照,乳腺癌组织 p38MAPK、活化的 p38MAPK(Phospho-p38MAPK)阳性标本作为阳性对照。

1.4 结果判定

p38MAPK 阳性主要表达于细胞质,Phospho-p38MAPK 阳性主要表达于细胞核,均呈黄色或棕黄色颗粒,400 倍光镜下观察每张切片,选取 5 个有代表性不同视野,每个视野计数 100 个细胞。根据细胞浆的染色程度及染色细胞百分率进行分析评分:基本不着色者为 0 分,浅黄色和黄色为 1 分,棕黄色为 2 分。着色细胞占计数细胞百分率 <5% 为 0 分, \geq 5%~25% 为 1 分, \geq 25%~50% 为 2 分, \geq 50% 为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分,0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4 分及 4 分以上为强阳性(++).

1.5 统计学处理

统计学分析采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件包,慢性鼻炎组大鼠嗅黏膜上皮层和固有层嗅腺中 p38MAPK、Phospho-p38MAPK 的表达与正常对照组比较,经 χ^2 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

典型的嗅黏膜结构是以基底膜为界,表面为上皮层,其下方为固有层。上皮层游离缘可见较多嗅毛,其嗅毛沐浴于黏液中。嗅细胞为细长梭形,含核的胞体位于上皮层中部。支持细胞位于嗅细胞周围和表面,呈高柱状,核卵圆形,含核的胞体位于上皮层表面。基底细胞位于上皮层深部,较紧密地排列于基底膜上,细胞呈圆形或者锥形。固有层为薄层结缔组织与深部骨膜相连,内含较多血管和浆液性 Bowman's 嗅腺。

慢性鼻炎大鼠的嗅上皮层萎缩变薄,细胞数量变少,有些只留下基底细胞,有部分

标本连基底细胞也有脱落。部分嗅上皮呈呼吸上皮化生,嗅上皮层可见有炎症细胞浸润。固有层中均见到嗅腺,为浆液性管状泡状腺,其中有不同程度的黏液腺化生,不同程度的组织水肿,大量的炎性细胞(包括淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞)浸润及纤维组织增生(图1)。正常对照组嗅上皮细胞呈现三层结构,排列较紧密,固有层炎症细胞少(图2)。

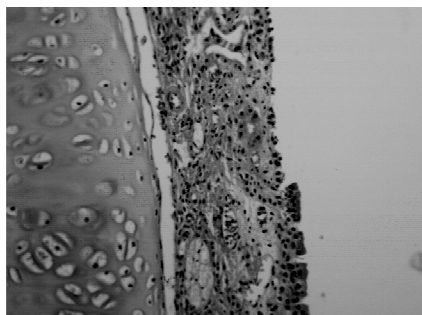


图1 慢性鼻炎组大鼠嗅黏膜 HE 染色上皮层萎缩并嗅毛脱落,固有层嗅腺不同程度黏液腺化生,较多炎细胞浸润(SP法, $\times 100$)

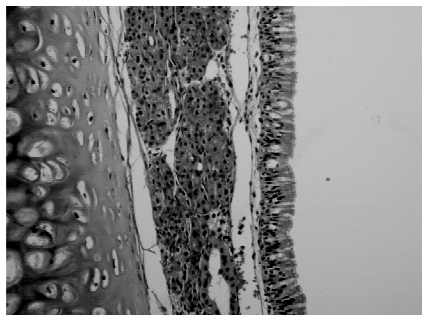


图2 正常对照组大鼠嗅黏膜 HE 染色嗅黏膜以基底膜为界,表面上皮层、下方固有层、上皮层游离缘有嗅毛,固有层中有血管和嗅腺(SP法, $\times 100$)

2.2 免疫组化结果

所有免疫组化染色片,阴性对照不着色,阳性产物呈棕黄色。慢性鼻炎组均有 p38 MAPK 和 Phospho-p38 MAPK 表达。阳性染色细胞主要集中在假复层无纤毛柱状上皮细胞及固有层嗅腺细胞中,少数出现在上皮间质、血管和炎性细胞中。阳性染色物呈棕黄色颗粒,位于上皮细胞的胞质和胞核中。p38 MAPK 主要分布在黏膜上皮和固有层嗅腺

细胞的胞质中(图3),而 Phospho-p38 MAPK 主要位于胞核中(图4)。正常对照组偶有阳性染色的上皮细胞和腺上皮细胞。

20例鼻炎组中16例 p38 MAPK 在嗅黏膜上皮中表达阳性,阳性率80%;对照组中3例阳性表达,阳性率15%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 16.94, P < 0.05$); P-p38 MAPK 在鼻炎组中阳性表达率75%,在对照组中阳性表达率30%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 8.12, P < 0.05$)。

20例鼻炎组中15例 p38 MAPK 在嗅腺中表达阳性,阳性率75%;对照组中7例表达阳性,阳性率35%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.8, P < 0.05$); Phospho-p38 MAPK 在鼻炎组中阳性表达率75%,在对照组中阳性表达率40%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.01, P < 0.05$)。

鼻炎组和正常组中 p38 MAPK 和 Phospho-p38 MAPK 表达情况比较见表1、2。

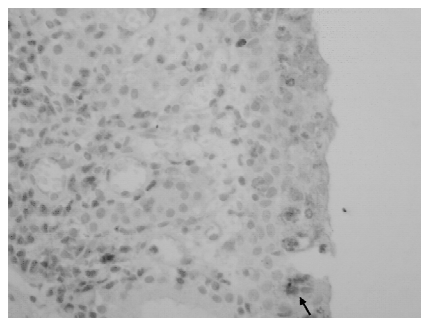


图3 慢性鼻炎组 p38 MAPK 染色棕黄色,主要分布在黏膜上皮和固有层嗅腺细胞的胞质中(SP法, $\times 200$)

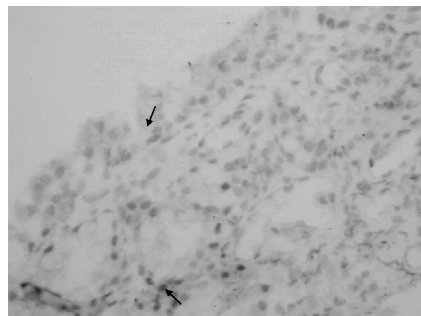


图4 慢性鼻炎组 Phospho-p38 MAPK 染色棕黄色,主要位于黏膜上皮和固有层嗅腺细胞的胞核中(SP法, $\times 200$)

表1 两组嗅黏膜上皮层中 p38 MAPK 及 Phospho-p38 MAPK 的阳性表达

分组	例数	p38MAPK	Phospho-p38MAPK
慢性鼻炎组	20	16	15
正常对照组	20	3	6
χ^2		16.94	8.12
<i>P</i>		<0.05	<0.05

注:慢性鼻炎组嗅黏膜上皮中 p38MAPK 及 Phospho-p38MAPK 的阳性表达明显高于正常组,经 χ^2 检验具有统计学意义 ($P < 0.05$)

表2 两组嗅黏膜固有层嗅腺中 p38 MAPK 及 Phospho-p38 MAPK 表达

分组	例数	p38MAPK	Phospho-p38MAPK
慢性鼻炎组	20	15	15
正常对照组	20	7	8
χ^2		4.80	5.01
<i>P</i>		<0.05	<0.05

注:慢性鼻炎组嗅黏膜固有层嗅腺中 p38MAPK 及 Phospho-p38MAPK 的表达明显高于正常对照组,经 χ^2 检验具有统计学意义 ($P < 0.05$)

3 讨论

慢性鼻炎鼻窦炎约占嗅觉障碍病因的 45.6%。临床上继局部或全身皮质类固醇针对病因的治疗后^[1],外科治疗慢性鼻炎鼻窦炎嗅觉障碍取得了明显效果。但是即便通过综合治疗,去除鼻腔息肉和病变黏膜,恢复了嗅区通气,部分患者的嗅觉功能仍不能改善。提示治疗慢性鼻炎鼻窦炎嗅觉障碍不仅需要手术及围手术期药物的综合治疗,而且需要研究其发病机制,从而使治疗更具有针对性,效果更显著。

3.1 慢性鼻炎大鼠模型的成功建立

慢性鼻炎动物模型的建立,国内外鲜有报道,为了建立慢性鼻炎大鼠模型,魏领地等^[2]曾经试用多种细菌滴鼻造成鼻黏膜炎症模型,经过比较克雷伯氏肺炎杆菌的模型最明显,此种细菌造成的鼻炎大鼠模型,方法简单,炎症持续时间长,接近临床发病机制,红、肿、热、流涕及病理解剖等现象与临床症状基本一致。本实验即运用该方法制造慢性鼻炎大鼠模型。

模型鼠饲养初期一般状态良好,鼻周无

分泌物,无喷嚏,无抓挠鼻现象,皮毛光滑,活动饮食正常。予 200 μ l 肺炎克雷伯氏杆菌,滴入大鼠双侧鼻孔(每侧 100 μ l),每日 1 次,连续滴鼻 7 d 后,改为隔日滴鼻,共 21 d。模型鼠饲养晚期状态较差,活动减少,鼻周分泌物增多,可见抓挠鼻现象。取模型鼠嗅区黏膜作 HE 染色后发现嗅上皮层萎缩变薄,细胞数量变少,嗅腺出现了黏液腺化生,同时还有不同程度的组织水肿,大量的炎性细胞(包括淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞)浸润及纤维组织增生,与正常对照组大鼠嗅黏膜 HE 染色有明显的不同。说明慢性大鼠鼻炎模型建立成功。

3.2 p38 信号蛋白在慢性鼻炎大鼠嗅黏膜中的表达

近年的研究发现,在哮喘、慢性阻塞性肺病和变应性鼻炎中,丝裂原素活化蛋白激酶的活化与各种细胞因子、炎性递质释放有关^[3]。研究还表明,尽管多种炎性递质和细胞因子参与炎症反应,但进入细胞内信号传导通路,如 MAPK 信号转导通路却较少^[4],提示丝裂原素活化蛋白激酶信号转导通路参与了呼吸道黏膜炎症反应。

p38 MAPK 信号传导通路是 1993 年由 Brewster 等在研究高渗环境对真菌的影响时首先发现的。最初发现它是一 38 Kd 的多肽,是哺乳动物酵母菌同系 HOG 激酶。内毒素和高渗液作用下其酪氨酸磷酸化引起细胞反应。以后又发现广泛存在于哺乳动物细胞内,在将细胞外刺激信号传导至胞浆及胞核内,并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化、凋亡等)的过程中有重要作用,是细胞内信号传导通路的重要环节。

p38 MAPK 的激活除了能促进单核巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、白细胞介素-4、白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-12 等炎性因子外^[5],还可使抑炎因子白细胞介素-10 的产生明显增加。实验证明,白细胞介素-10 参与的免疫抑制反应是由 p38 途径介导的^[6]。p38 还可介导中性粒细胞的活化,用粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、肿瘤坏死因子- α 处理中性粒细胞后可致 p38 MAPK 的

激活,粒-巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子- α 可明显增强中性粒细胞的呼吸爆发作用^[7]。而中性粒细胞的呼吸爆发依赖细胞内信号转导系统,中性粒细胞炎性聚集很大程度上依赖 p38 的激活,应用 p38 抑制剂可明显缓解中性粒细胞呼吸爆发产生过量氧自由基所致的肺损伤^[8]。具体机制:首先是淋巴细胞 L-选择素(CD62-L)同内皮细胞结合,此过程伴随白细胞黏附分子(CD11b/CD18)的表达和淋巴细胞 L-选择素的下调,内皮细胞的表达细胞间黏附分子-1 需要 p38 的作用,高渗、细菌脂多糖所致的淋巴细胞 L-选择素的下调同样需要 p38 的激活,白细胞黏附分子 CD11b 的上调也需要 p38 激活^[9]。另外,中性粒细胞的化学趋化作用也同样需要 p38 途径的参与,这可能同分裂原素激活的蛋白激酶活化蛋白激酶 2 使热休克蛋白磷酸化有关,中性粒细胞到达炎症区后,p38 可继续起作用,如通过还原型辅酶 II (reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NAD-PH) 氧化酶产生活性氧、免疫球蛋白 G、补体等^[10]。现在知道 p38 MARK 是分裂原素激活的蛋白激酶家族中最重要的信号分子,研究表明 p38 MAPK 的活化引起呼吸道黏膜上皮细胞细胞因子、炎症递质的释放,是导致哮喘、变应性鼻炎等呼吸道炎性疾病发生和加剧的重要机制^[11]。

信号经分裂原素激活的蛋白激酶转导的机制本质上是其被缉获的过程。细胞外的刺激如炎性介质、细胞因子、细菌脂多糖、紫外线光、生长因子、渗透压和休克等通过三级“级联”程序,使 p38 MAPK 磷酸化而被激活^[12],磷酸化的 p38 MAPK (Phospho-p38 MAPK) 从胞质进入胞核,介导前炎症细胞因子(白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6)的生成、酶的诱导(如环氧化酶 2)和细胞内酶(如诱导型一氧化氮合酶)的表达,诱导黏附蛋白(如血管细胞黏附因子)和许多其他炎症反应相关分子的产生,引导和加剧黏膜炎症反应的发生和发展^[13]。

本实验结果显示:慢性鼻炎组大鼠嗅黏膜上皮和腺上皮细胞中存在大量的 p38 MAPK 和 Phospho-p38 MAPK 阳染颗粒,

p38 MAPK 主要位于胞质,Phospho-p38 MAPK 主要位于胞核。因此鼻黏膜炎症反应机制中确实存在 p38 MAPK 信号传导通路,且表明其处于激活状态,提示 p38 MAPK 信号传导通路在慢性鼻炎发生和发展中可能具有介导作用,p38 MAPK 的活性变化可能在慢性鼻炎黏膜炎症反应中起调控作用。本研究表明,p38 MAPK 信号传导通路在慢性鼻炎大鼠嗅黏膜疾病的发生发展中可能占据着重要的调控作用。但这种调控作用的确切机制还有待进一步深入研究,该炎症造成大鼠的嗅觉疾病是否导致嗅觉功能异常,尚缺乏理论及实验依据,有待进一步论证。

参考文献:

- [1] Lee SH, Lim HH, Lee HM, et al. Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000, 109 (8): 720 - 725.
- [2] 魏领地,苗培,马豹山,等. 大鼠鼻炎模型的建立及通窍滴鼻液的治疗作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1996, 2(6): 17 - 19.
- [3] Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAPkinase: key signaling molecules as the therapeutic targets for inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(9): 717 - 726.
- [4] Lewis AJ, Manning AM. New targets for anti-inflammatory drugs [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3(3): 489 - 494.
- [5] Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated [J]. *J Biol*, 1995, 270(25): 14843 - 14846.
- [6] Song GY, Chung CS, Schwacha MG, et al. Splenic immune suppression in sepsis: a role for IL-10-induced changes in p38 MAPK signaling [J]. *Journal of Surgical Research*, 1999, 83(1): 36 - 43.
- [7] Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils [J]. *J Immunol*, 1999, 162(3): 1692 - 1700.
- [8] Yaffe MB, Xu J, Burke PA, et al. Priming of the neutrophil respiratory burst is species-dependent and involves MAP kinase activation [J]. *Surgery*, 1999, 126(2): 248 - 254.
- [9] Tamura DY, Moore EE, Johnson JL, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Surgery*, 1998, 124(2): 403 - 407.

(下转第 260 页)