

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.24.003

SB239063 通过抑制 TNF- α 和 p38MAPK,减轻香烟烟雾暴露 变应性鼻炎大鼠 MKP-1 的表达*

左晶晶 陈金辉 明 伟 王 燕 陶泽璋 李紫荆

(武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:探讨 p38MAPK 抑制剂 SB239063 对香烟烟雾暴露变应性鼻炎大鼠 p38MAPK 信号通路、TNF- α 、MKP-1 表达的影响。**方法:**先构建变应性鼻炎(AR)大鼠模型,然后给予 AR 大鼠被动吸入香烟烟雾(CS),再行腹腔注射 AR 大鼠 SB239063(100 mg/kg),分为 AR 组、AR+CS 组、AR+CS+SB239063 组。造模后对各组大鼠进行症状学评分;苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠鼻黏膜的形态学变化;实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测鼻黏膜 p38MAPK、MKP-1 mRNA 的表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA) 分析外周血、脾脏 TNF- α 的含量;Western blots 检测鼻黏膜 p38MAPK、p-p38MAPK、MKP-1 蛋白的表达水平。**结果:**与 AR 组比较,AR+CS 组大鼠的过敏症状($P<0.05$)加重;鼻黏膜嗜酸性粒细胞($P<0.05$)、中性粒细胞浸润($P<0.01$)增多;MKP-1 mRNA 及其蛋白的表达水平均升高($P<0.001$);外周血、脾脏 TNF- α 的表达水平升高($P<0.001$);p-p38MAPK 蛋白的表达水平升高($P<0.001$)。与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组大鼠过敏症状评分下降($P<0.01$);鼻黏膜中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞计数下降(P 值均 <0.05);p38MAPK mRNA 的表达水平降低($P<0.05$),MKP-1 mRNA 及其蛋白的表达水平下降($P<0.001$);外周血、脾脏 TNF- α 的表达水平降低(P 值均 <0.001);p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白的表达水平降低,差异均具有显著统计学意义(P 值均 <0.001)。**结论:**SB239063 通过抑制 TNF- α 、p38MAPK 及其自磷酸化,减轻香烟烟雾暴露变应性鼻炎大鼠 MKP-1 的表达。

关键词:变应性鼻炎;香烟烟雾;p38 有丝分裂原活化蛋白激酶;炎症;抑制剂

中图分类号:R-33;R765.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)24-4612-06

SB239063 Attenuates the Expression Level of MKP-1 Via Suppressing TNF- α and p38MAPK in Rats with Allergic Rhinitis Exposed to Cigarette Smoke*

ZUO Jing-jing, CHEN Jin-hui, MING Wei, WANG Yan, TAO Ze-zhang, LI Zi-jing

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of p38 MAPK inhibitor SB239063 on p38 MAPK signal pathway, TNF- α and MKP-1 in cigarette smoke exposed allergic rhinitis (AR) rats. **Methods:** The AR model of rats was firstly established, and then was given passive inhalation of cigarette smoke (CS), and then was injected intraperitoneally with SB239063 (100 mg / kg). They were divided into AR group, AR + CS group and AR + CS + SB 239063 group. After modeled, the rats in each group were scored by symptomatology; The morphological changes in nasal mucosa of rats were observed by hematoxylin eosin (HE) staining; The expression levels of p38MAPK and MKP-1 mRNA in nasal mucosa were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR); TNF- α in peripheral blood and spleen was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); The expression levels of p38MAPK, p-p38MAPK and MKP-1 proteins in nasal mucosa were detected by Western blots. **Results:** Compared with AR group, the allergic symptoms of AR + CS group were aggravated ($P<0.05$); Eosinophils infiltration ($P<0.05$) and neutrophil infiltration ($P<0.01$) in nasal mucosa were increased; The expression levels of MKP-1 mRNA and its protein were increased ($P<0.001$); The expression level of TNF- α in the peripheral blood and spleen were increased ($P<0.001$); The expression level of P-P38MAPK protein was increased ($P<0.001$). Compared to AR + CS group, the score of allergic symptoms in AR + CS + SB 239063 group was decreased ($P<0.01$); The counts of eosinophils and neutrophils in nasal mucosa were decreased ($P<0.05$); The expression level of p38MAPK mRNA was decreased ($P<0.05$), and the expression level of MKP-1 mRNA and its protein were decreased ($P<0.001$); The expression of TNF- α in the peripheral blood and spleen were decreased ($P<0.001$); The expression of p38MAPK protein and p-p38MAPK protein were decreased, and the difference was statistically significant ($P<0.001$). **Conclusions:** SB239063 reduced the expression level of MKP-1 via inhibiting TNF- α , p38MAPK and its autophosphorylation in rats with allergic rhinitis exposed to cigarette smoke.

Key words: Allergic rhinitis; Cigarette smoke; p38MAPK; Inflammation; Inhibitor

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R765.21 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)24-4612-06

* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金项目(2042019kf0084);国家自然科学基金项目(81870705; 81670910)

作者简介:左晶晶(1983-),男,博士,主治医师,主要研究方向:鼻科学、咽喉科学,电话:15072986195,E-mail:zj.rm@163.com

(收稿日期:2022-04-30 接受日期:2022-05-28)

前言

变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)是由 IgE 介导特异性个体,在接触变应原后出现发作性喷嚏、鼻塞和流涕症状的 I 型变态反应性疾病,其发病率近年来出现增高的趋势^[1]。气源性致敏原在合并有吸烟的变应性鼻炎患者中发挥重要作用,变应性致敏作用与烟草烟雾暴露具有复杂的关系^[2]。研究表明哮喘大鼠肺组织 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)活化增强,抑制 p38MAPK 的活性可抑制哮喘大鼠气道炎症反应^[3]。肿瘤坏死因子(TNF- α)是一种具有促进炎症反应作用的细胞因子,可激活 p38MAPK 激酶,并与 NF- κ B 相互作用^[4]。丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)可引起 MAPKs 去磷酸化,内源性 MKP-1 的表达,受到转录及转录后等多个水平的调控^[5]。

p38MAPK 抑制剂不仅可用于一般的炎症性疾病,还可用于 COPD 和重度哮喘中糖皮质激素抵抗的治疗^[6]。研究发现同时予 p38MAPK 抑制剂和皮质类固醇与单独使用糖皮质激素相比,可明显减少由 LPS 刺激肺泡巨噬细胞产生的细胞因子,说明同时使用两者可增强抗炎效果,具有协同作用^[7]。第一代代表为 SB203580,因其副作用较大且抑制细胞色素 P450 有潜在致癌性而一直没有进入临床应用;第二代代表是 SB239063,其副作用已经有所改善,是实验常用的特异性抑制剂^[8]。本课题拟研究:香烟烟雾暴露变应性鼻炎大鼠 p38MAPK 信号通路、TNF- α 、MKP-1 的表达及经 p38MAPK 抑制剂干预后的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

红金龙牌过滤嘴香烟(每支香烟含尼古丁 0.6 mg,焦油 9 mg,一氧化碳 11 mg)购自于湖北省中烟工业有限责任公司,无水乙醇、二甲苯、盐酸、氨水、中性树胶、三氯甲烷、异丙醇购自于国药集团化学试剂有限公司。脱水机、包埋机、冻台、组织摊片机购自于武汉俊杰电子有限公司。苏木素、伊红染液、PBS 溶液、生理盐水、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒、Protease Inhibitor Cocktail、100*PMSF、磷酸化蛋白酶抑制剂、5*蛋白上样缓冲液、丽春红染液、TBS(粉剂)、PBS(粉剂)、电泳液(粉剂)、转膜液(粉剂)、一抗稀释液、二抗稀释液、抗体洗脱液、显影定影液、Tween-20、脱脂奶粉、HRP-Goat anti Rabbit、HRP-Goat anti Mouse 二抗购自于 ASPEN。蛋白 Marker 购自于美国 Thermo, 0.45 μ m PVDF 膜购自于 Millipore, 柯达医用 X 射线胶片购自于 Kodak。卵清蛋白、SB239063 购自于美国 Sigma 公司,氢氧化铝购自于美国 Pierce chemical 公司。p38MAPK、P-p38MAPK 一抗购自于美国 Cell Signaling、MKP-1 一抗购自于 Absin、GAPDH 一抗购自于 Abcam。TRIpure Total RNA Extraction Reagent、EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix、Rat TNF α ELISA Kit、Rat IL-1 β ELISA kit 购自于 ELK Biotechnology。电泳仪、转移电泳仪槽、垂直电泳槽、脱色摇床购自于北京市六一仪器厂。水浴锅购自于金坛市江南仪器厂,石蜡购

自于上海华申康复器材有限公司,病理切片机购自于上海徕卡仪器有限公司,烤箱购自于上海一恒科学仪器有限公司,载玻片及盖玻片购自于江苏世泰实验器材有限公司,台式离心机购自于上海安亭科学仪器厂,冷冻离心机购自于湖南湘仪实验室仪器,制冰机购自于常熟市雪科电器有限公司,PCR 仪购自于杭州博日科技,荧光定量 PCR 仪购自于 Life technologies,超净工作台购自于苏净安泰公司,酶标仪购自于 Diatek 公司,恒温培养箱购自于上海精宏实验设备有限公司,扫描仪购自于 Canon,暗匣购自于广东粤华医疗器械厂有限公司。

1.2 实验动物

6-8 周龄的 SPF 清洁级 SD 雄性大鼠 9 只,体重 250-300 g,购自于湖北省实验动物研究中心[许可号:SCXK(鄂)2020-0018],大鼠所在环境的室温为 18-22℃,湿度是 50%-60%,自由饮食。所有实验程序均得到武汉大学人民医院动物伦理委员会许可[伦理号:WDRY2018-K052]。实验动物使用得到湖北省疾病预防控制中心许可[许可号:SYXK(鄂)2017-0065]。

1.3 方法

1.3.1 造模方法 变应性鼻炎组(AR 组):于第 1、3、5、7、9、11、13 天腹腔注射 1 mL 含 300 μ g 卵清蛋白(OVA)及 30 mg 氢氧化铝的生理盐水混悬液,自第 14 天开始以 10% OVA 生理盐水滴鼻(每天一次、每侧 50 μ L/次)激发,连续 7 天,造成 AR 模型后,第 28 日处死大鼠、取材,采血,固定包埋、及冷冻标本。烟雾暴露的 AR 组(AR+CS 组):采用自制的有机玻璃烟熏箱(69 cm $\times$ 47 cm $\times$ 38 cm),玻璃箱 1/2 高度处置有机玻璃隔板(隔板上直径 1 cm 圆形通风孔,排布密度:1 个/6 cm²)将玻璃箱分为上下两部分,有机玻璃箱顶及四侧面下 1/2 均有圆形通气孔(箱顶:1 个/100 cm²;侧面下 1/2:1 个/250 cm²)。AR 造模成功后的第 1 日开始,将 AR 大鼠置于隔板上,于玻璃箱下 1/2 空间内点燃 1 只香烟(客户自备香烟),至香烟燃烧完全、烟雾基本消失,约 15 min;掀开箱盖休息 10 min,重复 4 次烟雾暴露。维持吸烟为 1 支/次,5 支/日,连续烟雾暴露 28 日。烟雾暴露期间重复 1 次基础致敏及鼻部激发。p38MAPK 抑制剂 SB239063 干预烟雾暴露的 AR 组(AR+CS+SB239063 组):前期制备同烟雾暴露的 AR 组,烟雾暴露前给予 AR 大鼠 0.2 mL SB239063(100 mg/kg)腹腔注射,1 次/日,隔日 1 次,共 14 次。

1.3.2 造模后观察 末次鼻腔激发后 30 分钟观察大鼠的生物学行为,如鼻痒(挠鼻)、喷嚏、流涕等行为表现,计分标准:A、鼻痒:轻挠鼻几次计 1 分,经常挠鼻面部计 2 分,不断挠抓鼻面部计 3 分。B、喷嚏:1-3 个计 1 分,4-10 个计 2 分,11 个以上计 3 分。C、流涕:流到前鼻孔计 1 分,流过前鼻孔计 2 分,流满面部计 3 分。以上各项指标均采用叠加量化计分法,总分大于 5 分表示 AR 模型造模成功。

1.3.3 症状评分 给予大鼠末次鼻腔激发 30 分钟后,观察大鼠的生物学行为包括挠鼻、打喷嚏、流涕鼻涕等行为表现,做行为学症状评分。

1.3.4 石蜡切片 HE 染色实验步骤 每只大鼠按 200 mg/kg 腹腔注射 2%戊巴比妥钠溶液实施麻醉,固定于操作台,分离大鼠头部皮肤,与硬腭垂直方向剪开鼻正中缝,取出鼻中隔和双侧鼻腔外侧壁,避免损伤鼻黏膜。分离的鼻黏膜分为三份,一份

鼻黏膜给予 4%多聚甲醛固定 24 小时后,换用 10%EDTA 脱钙液处理,组织经脱水、石蜡包埋、制片,切片厚 4 μm 。进行苏木精-伊红(HE)染色:石蜡切片经二甲苯、梯度递减浓度的乙醇脱蜡至水,切片入 Harris 苏木素染 3-8 min,自来水洗、盐酸酒精分化,再次水洗、氨水返蓝,伊红染细胞质,梯度递增浓度的乙醇、二甲苯脱水透明,中性树胶封片。在正置显微镜下见嗜酸性粒细胞胞质呈红色或粉红色,细胞核呈蓝色。任意取 5 个高倍(HP)视野($\times 400$)下做嗜酸粒细胞、中性粒细胞计数并取平均值。

1.3.5 RT-PCR 检测 取出液氮中保存的大鼠鼻黏膜组织,用已消毒的工具于冰上取约 20 mg 组织,于 1 mL 预冷的 TRIpure 中充分研磨,匀浆液小心倒入 1.5 mL EP 管中,加入 250 μL 三氯甲烷,充分混匀,冰上静置 5 min。混合液 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times g$, 10 min 离心。小心吸取上清 500 μL 于 1.5 mL EP 管中,加入等体积 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min。溶液 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times g$, 10 min 离心,小心倒掉液体,加入 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75%乙醇,颠倒数次,清洗 RNA 沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times g$, 5 min 离心,倒掉液体干燥数分钟,将乙醇充分挥发干净,加入 100 μL RNase-Free Water,充分溶解 RNA。第一链 cDNA 的合成采用 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行(ELK Biotechnology, EQ003)。引物 R-p38MAPK 的正义序列为:AGATGCCGAAGATGAACCTTCG, 反义序列为:GGTCAGGCTCTTCCATTCGT。引物 R-MKP1 的正义序列为:CAGAGGCGGAGTATTATCTCCC, 反义序列为:GGA-GACAGGGAAGTTGAAGACC。引物 R-GAPDH 的正义序列为:AACAGCAACTCCCATCTTCC, 反义序列为:TG-GTCCAGGGTTTCTTACTCC。实时荧光定量 PCR 是在 Life technologies 公司的 StepOne™ Real-Time PCR 仪上完成,每个样品均作 3 个复孔,使用 EnTurbo™ SYBR Green PCR Super-Mix 试剂盒进行(ELK Biotechnology, EQ001)。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 s, 重复 40 次。分析鼻黏膜组织中目的基因 mRNA 的表达水平。

1.3.6 ELISA 检测分析 TNF- α 的水平 将新鲜脾脏剪成小的组织块置于 300 目尼龙网上,并将尼龙网固定于组织培养皿上,滴少许生理盐水,用 5 mL 注射器针栓截面研磨组织。开胸行心脏采血,每只大鼠取血约 4 mL,用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。取 2 mL 采用 3000 r/min 离心 15 min,根据标本的采集情况可适当增加离心时间,见上层清亮液体即为血清,取血清在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书操作,检测分析脾脏、血清 TNF- α 表达水平。

1.3.7 Western blots 检测 鼻黏膜组织块用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2-3 次,去除血污,剪成小块置于匀浆器中。加入 10 倍于组织体积的组织蛋白提取试剂(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂,使其工作浓度为 1* 即可),冰浴彻底匀浆。将匀浆液转移至离心管中,振荡。冰浴 30 min,期间用移液器反复吹打,确保匀浆液完全裂解。4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm 离心 5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。根据样品浓度确定上样量,保证每个样品总蛋白上样量均为 40 μg 。在蛋白样品中加入适量的 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,

95-100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴 5 min。将电泳架放入电泳槽中,加入电泳缓冲液,将样品加入点样孔中。按浓缩胶 80V、分离胶 120V 进行恒压电泳,至溴酚蓝到达胶板下沿。准备转膜滤纸和 PVDF 膜,PVDF 膜在使用之前先用甲醇活化,活化时间 3 min。按照正负极的方向摆放转膜"三明治"结构,从正极到负极依次为转膜海绵、3 层滤纸、PVDF 膜、胶、3 层滤纸、转膜海绵,摆放过程中要除尽各层中气泡。按 300 mA 恒流转膜,转膜时间根据目的蛋白分子量大小调整。将转好的膜加入封闭液室温封闭 1h。除去封闭液,加入用一抗稀释液稀释好的一抗(按照 1:3000 的体积比稀释 p38MAPK 一抗,1:500 的体积比稀释 p-p38MAPK 和 MKP-1,1:10000 的体积比稀释作为内参的 GAPDH 一抗)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 TBST 洗三次,每次 5 min。加入二抗稀释液稀释好的二抗,室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下摇床上洗四次,每次 5 min。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液(A:B=1:1)到膜的蛋白面侧,暗室中曝光。根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.4 统计学分析

实验数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,利用 GraphPad Prism 5 统计软件对实验数据做统计学分析,两组间的差异分析采用非配对 t 检验,三个及以上组间的差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为组间的差异性有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠鼻黏膜的形态学变化

与 AR 组比较,AR+CS 组大鼠的鼻黏膜可见嗜酸性粒细胞、中性粒细胞浸润增多,鼻黏膜水肿、见纤维索性渗出物,纤维组织增生,血管明显扩张(见图 1)。嗜酸性粒细胞计数升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中性粒细胞计数升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。由图 1 可知,与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞、中性粒细胞的浸润数量明显减少,纤维索性渗出物及纤维组织增生被吸收。嗜酸性粒细胞计数降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中性粒细胞计数下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各实验组大鼠的症状评分

由图 2 可知,与 AR 组比较,AR+CS 组的大鼠症状评分显著升高,评分差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明香烟烟雾暴露加重 AR 大鼠的过敏症状。与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组的大鼠症状评分显著降低,二者的评分差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),提示 SB239063 减轻烟雾暴露 AR 大鼠的过敏症状。

2.3 p38MAPK、MKP-1 mRNA 表达的比较

与 AR 组比较,AR+CS 组大鼠鼻黏膜 MKP-1 mRNA 的表达水平升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$,见图 3),两组间 p38MAPK mRNA 的表达水平未见明显差异。与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组大鼠鼻黏膜 p38MAPK mRNA 的表达水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),MKP-1 mRNA 的表达水平下降,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$)。

2.4 外周血、脾脏 TNF- α 含量的比较

由图 4 可知,与 AR 组比较,AR+CS 组大鼠外周血 TNF- α

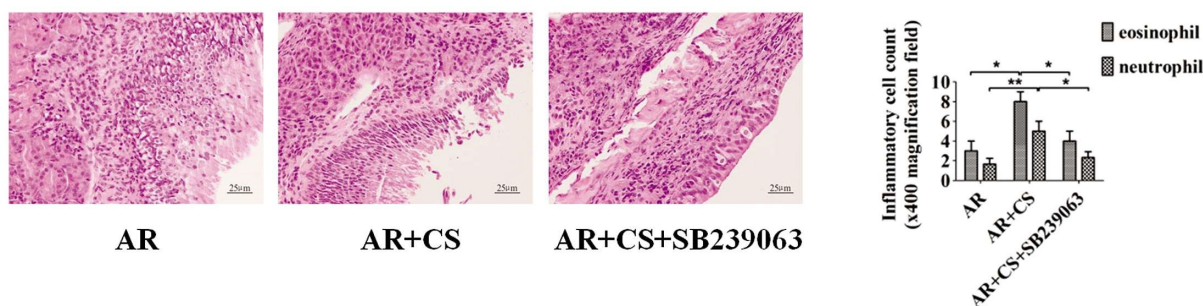
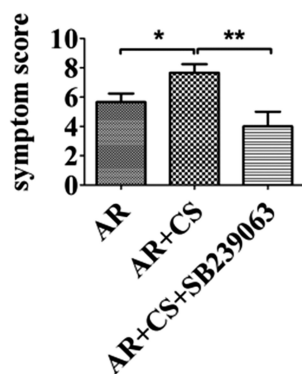
图1 大鼠鼻黏膜的形态学变化($\times 400$, 苏木精-伊红染色)Fig.1 Morphological changes in nasal mucosa of rats($\times 400$, HE staining). * $P < 0.05$ 

图2 各实验组大鼠的症状评分

Fig.2 The symptom scores of rats in each experimental group. * $P < 0.05$

的表达水平升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$),脾脏 TNF- α 的表达水平升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$)。与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组大鼠血清 TNF- α 的表达水平下降,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$),脾脏 TNF- α 的表达水平降低,差异具有显著统计学意义($P < 0.001$)。

2.5 p38MAPK、p-p38MAPK、MKP-1 蛋白表达的比较

与 AR 组比较,AR+CS 组大鼠鼻黏膜 p38MAPK 蛋白的表达水平升高(见图 5),差异具有统计学意义($P < 0.01$),由图 5、6 可知,p-p38MAPK、MKP-1 蛋白的表达水平升高,差异均具有显著统计学意义($P < 0.001$)。与 AR+CS 组比较,AR+CS+SB239063 组大鼠鼻黏膜 p38MAPK、p-p38MAPK、MKP-1 蛋白的表达水平降低,差异均具有显著统计学意义($P < 0.001$)。

3 讨论

p38MAPK 参与了肥大细胞、嗜酸性粒细胞的定位迁移、炎症介质释放及淋巴细胞的发育分化、成熟和活化的全过程。上游的酶激活 p38MAPK 之后,活化的 p38MAPK 能够引起自身的磷酸化,并激活下游的底物^[9]。与不吸烟变应性鼻炎患者比较,合并吸烟的 AR 患者易受吸烟的有害影响^[10]。例如吸烟是成人 AR 患者新发生哮喘的一个重要独立危险因素^[11]。

AR 患者中还存在糖皮质激素(CS)治疗抵抗现象,香烟烟雾暴露是否改变 AR 激素抵抗尚不清楚^[12]。香烟烟雾暴露增加 COPD 中 p38MAPK 的表达,香烟烟雾可增加 COPD 和哮喘患者肺炎的中性粒细胞数量^[13]。烟雾暴露的哮喘大鼠支气管腔内及周围可见大量嗜酸性粒细胞及中性粒细胞浸润^[14]。本研究的结果提示:香烟烟雾暴露引起 AR 大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞、

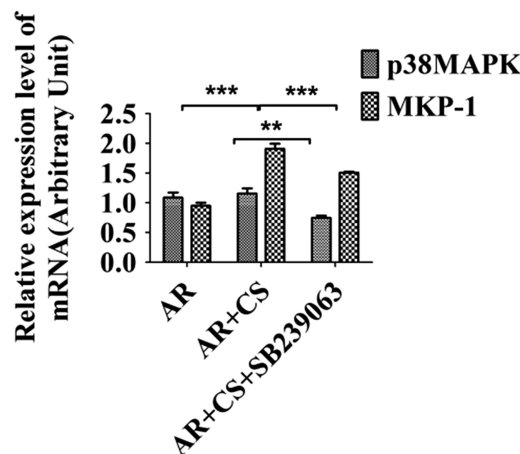
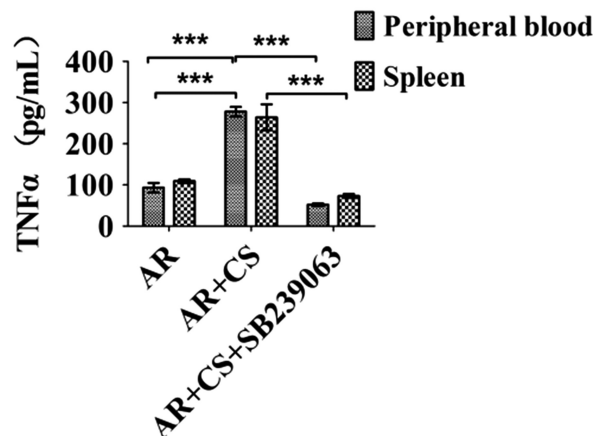


图3 p38MAPK 基因、MKP-1 基因在大鼠鼻黏膜中的表达

Fig.3 Expression of p38MAPK gene and MKP-1 gene in nasal mucosa of rats. * $P < 0.05$ 图4 TNF- α 在外周血、脾脏中的表达水平Fig.4 Expression of TNF- α in the peripheral serum and spleen. * $P < 0.05$

中性粒细胞浸润增多,鼻黏膜水肿及出现纤维性渗出物,纤维组织增生,血管明显扩张,香烟烟雾暴露加重 AR 大鼠的过敏症状。分子机制研究表明:香烟烟雾促进 AR 大鼠鼻黏膜 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白的表达水平升高。

已有实验证实 AR 患者血清中 TNF- α 含量增多,能通过诱导抗原特异性 IgE 产生以及 Th2 类细胞因子的表达,在 AR 的发生中起着不可替代的作用^[15]。实验提示 p38MAPK 通过激活 IL6 及 TNF- α 参与炎症反应,从而激发 AR^[16]。香烟烟雾协同 P 物质的分泌,并结合神经激肽 1 受体(neurokinin 1 receptor, NK1R)激活 NF- κ B,进而增强巨噬细胞分泌 TNF- α ^[17]。TNF- α

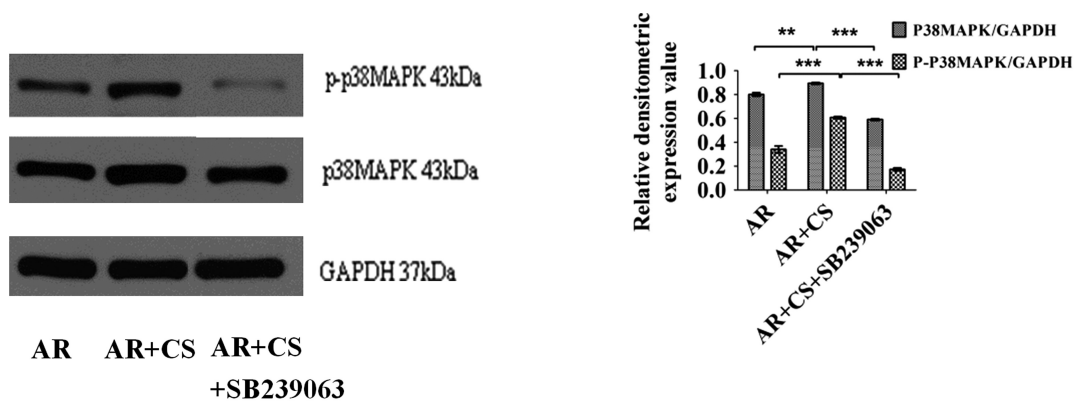


图 5 p38MAPK 蛋白、p-p38MAPK 蛋白在大鼠鼻黏膜组织中的表达

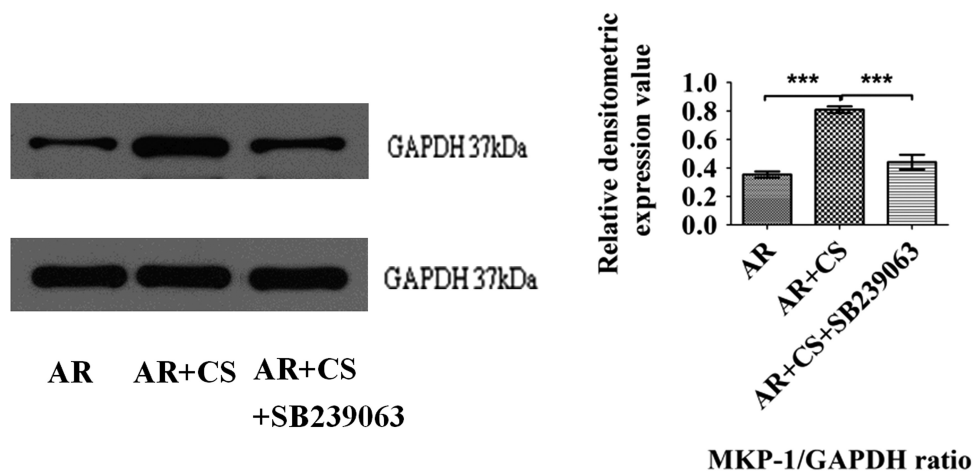
Fig.5 Expression of p38MAPK protein and MKP-1 protein in the tissue of nasal mucosa in rats. * $P < 0.05$ 

图 6 MKP-1 蛋白在大鼠鼻黏膜组织中的表达

Fig.6 Expression of MKP-1 protein in the tissue of nasal mucosa in rats. * $P < 0.05$

联合香烟烟雾可调节 p38MAPK 信号,增加 $GR\beta/GR\alpha$ 比值,导致糖皮质激素抵抗^[18]。本研究的结果也提示:香烟烟雾暴露促进 AR 大鼠血清及脾脏 TNF- α 的表达。香烟烟雾可诱导肺部发生活性氧应激,中性粒细胞增多及促炎因子(IL8、IL4、TNF- α)的释放,引起激素抵抗,人呼吸道平滑肌细胞中 TNF- α 可诱导 MKP-1 的表达^[19]。

MKP 是双重特异性(苏氨酸 / 酪氨酸)磷酸酶基因家族,是蛋白酪氨酸磷酸酶基因超家族的亚型,它们可对 MAPK 活化的 2 个关键性氨基酸残基,磷酸化苏氨酸及磷酸化酪氨酸残基选择性的去磷酸化^[20]。内源性 MKP-1 的表达,受到转录及转录后等多个水平的调控。处于磷酸化的 MKP-1 是稳定状态,非磷酸化的 MKP-1 容易被降解、它是短暂存在的^[21]。MKP-1 对 JNK 和 p38MAPK 的特异性可能优于 ERKs^[22]。MKP-1 对 MAPK 的调节作用因组织与细胞类型的不同而改变^[23]。MKP-1 的蛋白、mRNA 在空气暴露哮喘小鼠中的表达均是升高的,而臭氧暴露哮喘小鼠中 MKP-1 的 mRNA 表达是升高的,而 MKP-1 蛋白水平未见升高^[24]。本研究的结果提示:香烟烟雾暴露引起 AR 大鼠鼻黏膜 MKP-1 mRNA 及 MKP-1 蛋白的表达水平升高,可能的机制是:香烟烟雾暴露激活 AR 大鼠鼻黏膜 p38MAPK,并发生 p38MAPK 自磷酸化,二者正反馈参与 TNF- α 的合成,进而诱导 MKP-1 基因的转录及蛋白表达^[25]。

p38MAPK 的抑制剂是一类吡啶咪唑类复合物,可以与

ATP 竞争性结合 p38MAPK 一级结构的 T106 位点,减少 ATP 与 p38MAPK 的结合,阻断 ATP 的磷酸基团转移到底物上,从而阻断整个信号通路的传递^[26]。多数 p38MAPK 抑制剂通过竞争性结合 ATP 口袋而抑制 p38MAPK 的催化活性,可在转录、转录后、翻译、翻译后调节细胞因子和炎症介质,还可激活凋亡通路促进炎症细胞的凋亡^[27]。Jung 等的研究报告,通过抑制 p38MAPK 信号的磷酸化可减少炎症递质的产生及释放,减轻鼻黏膜的损害、黏膜下炎症细胞的浸润,改善鼻黏膜的变态反应^[28]。SB239063 能通过抑制嗜酸性粒细胞的趋化作用,并促进嗜酸性粒细胞的凋亡,降低气道疾病中嗜酸性粒细胞的数量^[6]。本研究的结果也提示:SB239063 可减少香烟烟雾暴露 AR 大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞、中性粒细胞的浸润数量,减轻烟雾暴露 AR 大鼠的过敏症状,同时观察到纤维蛋白渗出物及纤维组织增生被吸收,与 SB239063 能降低大鼠博来霉素引起的肺纤维化这一结果类似^[29]。SB239063 能抑制经脂多糖刺激的人外周血单核细胞产生 TNF- α 和 IL-1^[30]。在脂多糖诱导的小鼠慢性炎症反应中,SB239063 也能抑制 TNF- α 的产生^[31]。既往的研究报道 SB239063 可抑制 p38MAPK 的磷酸化、减轻气道中性粒细胞增多症,部分逆转被臭氧损害的地塞米松的效应^[32]。SB239063 能够减少臭氧暴露哮喘小鼠中 p38MAPK 的磷酸化比例,但不能改变 MKP-1 的 mRNA、蛋白水平^[33]。本研究的结果也提示:SB239063 抑制了烟雾暴露 AR 大鼠鼻黏膜

p38MAPK、MKP-1 基因及目的蛋白、p-p38MAPK 蛋白、血清及脾脏 TNF- α 的表达,作者推测:SB239063 通过抑制 p38MAPK 的激活及自身的磷酸化,后者正反馈促进 TNF- α 合成的作用下降,其诱导 MKP-1 蛋白的表达降低^[34]。

综上所述,本研究表明,SB239063 可能通过抑制 p38MAPK 及其自磷酸化,减轻香烟烟雾暴露变应性鼻炎中 MKP-1 的表达。香烟烟雾暴露是否引起糖皮质激素受体 GR β /GR α 比值异常或其他糖皮质激素治疗抵抗现象,是本课题组进一步的研究方向。

参考文献(References)

- [1] Gomez RM, Croce VH, Zernotti ME, et al. Active smoking effect in allergic rhinitis[J]. World Allergy Organ J, 2021, 14(2): 100504-100513
- [2] Wang J, Janson C, Jogi R, et al. A prospective study on the role of smoking, environmental tobacco smoke, indoor painting and living in old or new buildings on asthma, rhinitis and respiratory symptoms[J]. Environ Res, 2021, 192(1): 110269-110278
- [3] Marengi G, Clementino AR, Fioni A, et al. Pulmonary delivery of a p38 alpha/beta MAP kinase inhibitor: bioanalytical method validation and biodistribution in rat plasma and respiratory tissues [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 149(1): 105341-105348
- [4] Whitmore HAB, Amarnani D, O'Hare M, et al. TNF-alpha signaling regulates RUNX1 function in endothelial cells[J]. FASEB J, 2021, 35(2): 21155-21171
- [5] Hoppstadter J, Ammit AJ. Role of Dual-Specificity Phosphatase 1 in Glucocorticoid-Driven Anti-inflammatory Responses [J]. Front Immunol, 2019, 10(1): 1446-1453
- [6] Mei D, Tan WSD, Wong WSF. Pharmacological strategies to regain steroid sensitivity in severe asthma and COPD [J]. Curr Opin Pharmacol, 2019, 46(1): 73-81
- [7] Gao X., Li N, Zhang J. SB203580, a p38MAPK inhibitor, attenuates olfactory dysfunction by inhibiting OSN apoptosis in AR mice (activation and involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase in olfactory sensory neuronal apoptosis of OVA-induced allergic rhinitis) [J]. Brain Behav, 2019, 9(6): 01295-01303
- [8] Qi S, Wang Q, Xie B, et al. P38 MAPK signaling pathway mediates COM crystal-induced crystal adhesion change in rat renal tubular epithelial cells[J]. Urolithiasis, 2020, 48(1): 9-18
- [9] Bezerra Barros GC, Paiva Ferreira LKD, Ferreira L, et al. 4-Carvomenthenol ameliorates the murine combined allergic rhinitis and asthma syndrome by inhibiting IL-13 and mucus production via p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway axis [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 88(1): 106938-106949
- [10] Ueha R, Ueha S, Kondo K, et al. Effects of Cigarette Smoke on the Nasal Respiratory and Olfactory Mucosa in Allergic Rhinitis Mice[J]. Front Neurosci, 2020, 14(1): 126-137
- [11] Bontinck A, Maes T, Joos G. Asthma and air pollution: recent insights in pathogenesis and clinical implications[J]. Curr Opin Pulm Med, 2020, 26(1): 10-19
- [12] Lee YG, Lee PH, Choi SM, et al. Effects of Air Pollutants on Airway Diseases[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(18): 9905-9921
- [13] Chung SJ, Kim BK, Oh JH, et al. Novel tobacco products including electronic cigarette and heated tobacco products increase risk of allergic rhinitis and asthma in adolescents: Analysis of Korean youth survey[J]. Allergy, 2020, 75(7): 1640-1648
- [14] Pelaia C, Vatrella A, Sciacqua A, et al. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in COPD: pathobiological implications and therapeutic perspectives [J]. Expert Rev Respir Med, 2020, 14(5): 485-492
- [15] Nie Y, Wang Z, Chai G, et al. Dehydrocostus Lactone Suppresses LPS-induced Acute Lung Injury and Macrophage Activation through NF-kappaB Signaling Pathway Mediated by p38 MAPK and Akt[J]. Molecules, 2019, 24(8): 1510-1526
- [16] Xu L, Li T, Chen Q, et al. The alpha2AR/ Caveolin-1/ p38MAPK/ NF-kappaB axis explains dexmedetomidine protection against lung injury following intestinal ischaemia-reperfusion[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(13): 6361-6372
- [17] 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
- [18] Nie N, Bai C, Song S, et al. Bifidobacterium plays a protective role in TNF-alpha-induced inflammatory response in Caco-2 cell through NF-kappaB and p38MAPK pathways [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 464(1-2): 83-91
- [19] Jiao F, Wang Y, Zhang W, et al. AGK2 Alleviates Lipopolysaccharide Induced Neuroinflammation through Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2020, 15(2): 196-208
- [20] Koyanagi M, Arimura Y. Comparative Expression Analysis of Stress-Inducible Genes in Murine Immune Cells [J]. Immunol Invest, 2020, 49(8): 907-925
- [21] Ju J, Hou R, Zhang P. D-allose alleviates ischemia/reperfusion (I/R) injury in skin flap via MKP-1[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 21-29
- [22] Leng Y, Ren L, Niu S, et al. In vitro and in silico investigations of endocrine disruption induced by metabolites of plasticizers through glucocorticoid receptor[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 155(1): 112413-112421
- [23] Francisco S, Arranz A, Merino J, et al. Early p38 Activation Regulated by MKP-1 Is Determinant for High Levels of IL-10 Expression Through TLR2 Activation [J]. Front Immunol, 2021, 12(1): 660065-660075
- [24] Enweasor C, Flayer CH, Haczku A. Ozone-Induced Oxidative Stress, Neutrophilic Airway Inflammation, and Glucocorticoid Resistance in Asthma[J]. Front Immunol, 2021, 12(1): p. 631092-631105
- [25] Qiu S, Liu B, Mo Y, et al. MiR-101 promotes pain hypersensitivity in rats with chronic constriction injury via the MKP-1 mediated MAPK pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(16): 8986-8997
- [26] Yadav J, Goel P, Mandal KD, et al. Protein Kinase Inhibitors Arrested the In-Vitro Growth of Theileria equi [J]. Acta Parasitol, 2020, 65(3): 644-651
- [27] Ren Z, Chen S, Pak S, et al. A mechanism of perhexiline's cytotoxicity in hepatic cells involves endoplasmic reticulum stress and p38 signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2021, 334(1): 109353-109371
- [28] Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, et al. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review [J]. Front Public Health, 2020, 8(1): 14-26

- inhibits Pam3CSK4-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages through suppressing TLR1/TLR2-mediated NF-kappaB activation[J]. *Chin Med*, 2018, 13(1): 37
- [18] Zhong Z, Zhang Q, Tao H, et al. Anti-inflammatory activities of *Sigesbeckia glabrescens* Makino: combined in vitro and in silico investigations[J]. *Chin Med*, 2019, 14(4): 35
- [19] Jin Z, Chenghao Y, Cheng P. Anticancer effect of Tanshinones on female breast cancer and gynecological cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 824531
- [20] Nizamutdinova IT, Lee GW, Son KH, et al. Tanshinone I effectively induces apoptosis in estrogen receptor positive (MCF-7) and estrogen receptor-negative (MDA-MB-231) breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(1): 485-491
- [21] Li YL, Gong Y, Li LL, et al. Bioactive Tanshinone I inhibits the growth of lung cancer in part via downregulation of Aurora A function[J]. *Mol. Carcinog*, 2012, 52(4): 535-543
- [22] Gong Y, Li Y, Abdolmaleky HM, et al. Tanshinones inhibit the growth of breast cancer cells through epigenetic modification of Aurora A expression and function[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e33656
- [23] Filardo EJ, Quinn JA, Blank KI, et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G Protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF[J]. *Narnia*, 2000, 14(10): 1649-1660
- [24] Castillo Sanchez R, Gomez R, Perez Salazar E. Bisphenol A induces migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(3): 285-295
- [25] Dennis MK, Burai R, Ramesh C, et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(6): 421-427
- [26] Shi D, Li H, Zhang Z, et al. Cryptotanshinone inhibits proliferation and induces apoptosis of breast cancer MCF-7 cells via GPER mediated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0262389
- [27] Shi D, Zhao P, Cui L, et al. Inhibition of PI3K/AKT molecular pathway mediated by membrane estrogen receptor GPER accounts for cryptotanshinone induced antiproliferative effect on breast cancer SKBR-3 cells[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2020, 21(5): 32
- [28] Im NK, Jang WJ, Jeong CH, et al. Delphinidin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the NF- κ B activation through MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells[J]. *J Med Food*, 2014, 17(8): 855-861
- [29] Pittayapruke P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 868
- [30] Dofara SG, Chang SL, Diorio C. Gene polymorphisms and circulating levels of MMP-2 and MMP-9: A review of their role in breast cancer Risk[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(7): 3619-3631
- [31] Zhang XL, Liu N, Weng SF, et al. Bisphenol A increases the migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via oestrogen-related receptor gamma [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 119(4): 389-395
- [32] Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, 80(2): 231-238

(上接第 4617 页)

- [29] Liang L, Gu X, Shen HJ, et al. Chronic Intermittent Hypoxia Reduces the Effects of Glucocorticoid in Asthma via Activating the p38 MAPK Signaling Pathway[J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1): 703281-703289
- [30] Viegi G, Maio S, Fasola S, et al. Global Burden of Chronic Respiratory Diseases [J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2020, 33(4): 171-177
- [31] Akamine T, Takaku S, Suzuki M, et al. Glycolaldehyde induces sensory neuron death through activation of the c-Jun N-terminal kinase and p-38 MAP kinase pathways[J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153(2): 111-119
- [32] Urzua CA, Chen P, Chaigne-Delalande B, et al. Glucocorticoid Receptor-alpha and MKP-1 as Candidate Biomarkers for Treatment Response and Disease Activity in Vogt-Koyanagi-Harada Disease[J]. *Am J Ophthalmol*, 2019, 207(1): 319-325
- [33] Hoving AL, Schmitz J, Schmidt KE, et al. Human Blood Serum Induces p38-MAPK- and Hsp27-Dependent Migration Dynamics of Adult Human Cardiac Stem Cells: Single-Cell Analysis via a Microfluidic-Based Cultivation Platform [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(8): 708-723
- [34] Gladys A, Vandebroek A, Yasui M. Human keratinocyte-derived extracellular vesicles activate the MAPKinase pathway and promote cell migration and proliferation in vitro [J]. *Inflamm Regen*, 2021, 41(1): 4-12