

针刺对支气管哮喘大鼠肺组织 c-fos 蛋白表达的影响

虞跃跃 崔建美 李 双 韩君萍 杨金华 赵 叶 樊志忠

摘要 目的 探讨针刺对哮喘大鼠肺组织中 c-fos 蛋白表达的影响。**方法** 将 70 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组(A 组)、哮喘模型组(B 组)、空白针刺对照组(C 组)、哮喘模型针刺对照组(D 组)、哮喘模型针刺组(E 组)、哮喘模型假针刺组(F 组)和空白针刺组(G 组),每组 10 只。各组分别给予相应干预后,用免疫组化、Western blot 法检测大鼠肺组织 c-fos 蛋白的表达。**结果** 免疫组化示 A、C、G、E 组 c-fos 蛋白表达呈阴性,B、D、F 组呈弱阳性;Western blot 检测示 B 组 c-fos 蛋白表达较 A、E 组升高($P < 0.01$);E 组低于 D、F 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 针刺可降低大鼠肺组织中 c-fos 蛋白表达以减轻炎症反应。

关键词 针刺;哮喘;c-fos;免疫组化

Effect of Acupuncture on c-fos Expression in the Lung Tissue of Bronchial Asthmatic Rats YU Yue-yue, CUI Jian-mei, LI Shuang, HAN Jun-ping, YANG Jin-hua, ZHAO Ye, and FAN Zhi-zhong
Faculty of Acupuncture and Tuina, College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Technology, Hebei (063000)

ABSTRACT Objective To observe the effect of acupuncture on c-fos expression in the lung tissue of asthmatic rats. **Methods** Totally 70 SPF grade male SD rats were randomly divided into 7 groups, i.e., the blank group (A), the asthma model group (B), the blank control group (C), the asthma-model acupuncture control group (D), the asthma model acupuncture group (E), the asthma model sham-acupuncture group (F), the blank acupuncture group (G), 10 rats in each group. Corresponding interventions were performed to each group. The protein expression of c-fos in lung tissue of rats was detected using immunohistochemistry and Western blot respectively. **Results** Immunohistochemistry showed negative expression of c-fos protein in Group A, C, G, and E, and weakly positive in Group B, D, and F. Results of Western blot showed the protein expression of c-fos was higher in Group B than in Group A and E ($P < 0.01$). The protein expression of c-fos was lower in Group E than in Group D and F ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Acupuncture could reduce the protein expression of c-fos in lung tissue, thus attenuating inflammation reaction.

KEYWORDS acupuncture; bronchial asthma; c-fos protein; immunohistochemistry

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞包括气道的炎性细胞和结构细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞、气道上皮细胞等)和多种细胞因子、炎性介质参与的气道慢性炎症性疾病。针刺作为传统中医疗法,具有良好的抗炎作

用,能有效缓解大鼠哮喘发作^[1]。本实验采用免疫组化法、Western blot 法观察了针刺对哮喘大鼠肺组织 c-fos 蛋白表达的影响,以探讨针刺改善哮喘大鼠气道炎症的作用机制。

材料与方法

1 动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只,体重 100 ~ 130 g,4 周龄,购自天津市山川红实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(津)2009-0001,合格证号:0253756。大鼠适应性喂养 1 周,根据计算机随机数字表分为 7 组,每组 10 只。为保证组间只有一个不同处理因素,分组如下:(1)空白组(简称 A 组):未予任何处理。(2)哮喘模型组(简称 B 组):

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81303046);河北省自然科学基金资助项目(No. C2010001797)

作者单位:华北理工大学中医学院针灸推拿学系(河北唐山 063000)

通讯作者:崔建美, Tel: 0315-3725189, E-mail: cjm2188@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.09.1124

制作大鼠哮喘模型,不针刺。(3)空白针刺对照组(简称 C 组):不造模,隔日在针刺高台上放置 20 min,不针刺。(4)哮喘模型针刺对照组(简称 D 组):造模后,隔日在针刺高台上放置 20 min,不针刺。(5)哮喘模型针刺组(简称 E 组):自造模之日起,进行针刺干预。(6)哮喘模型假针刺组(简称 F 组):自造模之日起,穴位同针刺组,针刺时只刺入皮下,不留针,隔日针刺 1 次,共 7 次。(7)空白针刺组(简称 G 组):不造模,仅给予针刺,针刺方法同 E 组。

2 主要试剂与仪器 卵蛋白(A5503-10G,美国 Sigma 公司);兔来源 c-fos 第一抗体(BS6433,美国 Bioworld 公司);PV 6000 通用性试剂盒(K146819D,北京中杉金桥生物有限公司);DAB(Kit-0031,福州迈新生物公司);PVDF 膜(0.45 μm ,美国 Millipore 公司);以下产品均购自碧云天生物技术有限公司:Western 及 IP 细胞裂解液(P0013),PMSF(100 mmol/L, ST506),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型, P0010S),SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(P0012A),预染标准蛋白 Marker(P0068),超敏 ECL 化学发光试剂盒(P0018),GAPDH 小鼠单克隆第一抗体(AG019),辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(A0216),Western 一抗二抗去除液(强碱性)(P0025)。

一次性无菌针灸针(0.35 $\times$ 25 mm,华佗牌);切片刀(RM2235 型,德国莱卡公司);光学显微镜(BX51 型,日本 Olympus 公司);低温高速离心机(R134A 型,美国 Sigma 公司);多功能电泳仪(DYY-6c 型,北京六一仪器厂);匀浆机(PRO 200 型,美国 PRO Scientific 公司);水平摇床(WD-9405A 型,北京市六一仪器厂);化学发光成像仪(721BR08455 型,美国 Bio-Rad 公司)。

3 方法

3.1 模型制作 参照 Yin LM 等^[2]的哮喘模型制备方法,B、D、E、F 组 SD 大鼠分别一次性腹腔注射含 O(OVA)1 mg 和 Al(OH)₃凝胶 10 mg 的生理盐水 1 mL,2 周后颈外静脉内注射 OVA(5 mg/kg 体重)激发哮喘发作。

3.2 针刺干预 针刺取穴为大椎、肺俞(双)、风门(双)^[3]。将大鼠置于高台上进行针刺,平补平泻,每次留针 20 min,每隔 5 min 行针 1 次(200 次/min 捻针 20 次为行针 1 次),隔日针刺 1 次,共针 7 次。

3.3 标本采集 各组大鼠用 10%的水合氯醛按 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉。结扎大鼠右肺中叶,右心室头皮针插管并剪开左心耳,以无菌生理盐水进行肺循环灌注至双肺呈苍白色。整体取出心肺和气管,清

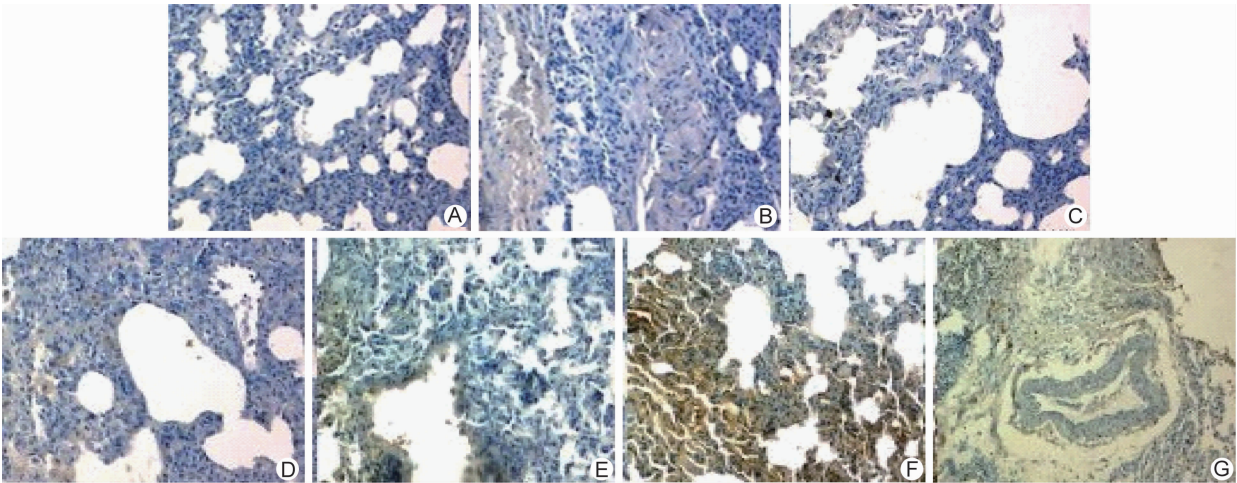
除心脏、气管、大血管和肺门周围结缔组织,剥离肺,生理盐水漂洗干净,吸水纸试干。右肺中叶于 4%多聚甲醛固定,剩余右肺液氮保存。

3.4 免疫组化法检测肺组织 c-fos 表达水平 肺组织标本经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,清水冲洗过夜,梯度酒精脱水,二甲苯透明,组织浸蜡,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 5 μm 。免疫组化采用两步法,其步骤如下:(1)石蜡切片常规脱蜡至水,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(2)将玻片浸泡在枸橼酸盐溶液中高压修复 1 min 20 s 后,冷水冷却,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(3)滴加 3% H₂O₂ 室温下孵育 20 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS 洗 3 次,每次 5 min。(4)滴加 1:100 兔抗大鼠 c-fos 多克隆抗体,置湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min。(5)滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(6)DAB 显色,镜下可见胞浆呈现棕色阳性反应时立即停止显色。(7)苏木素染色 1 min,分化,返蓝。(8)梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封固,显微镜下观察。阴性对照采用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

免疫组化结果采用定性分析^[4],细胞染色呈棕黄色为阳性细胞,其中阳性细胞数 < 5% 为阴性;阳性细胞数 5% ~ 25% 为弱阳性;阳性细胞数 26% ~ 50% 为中度阳性;阳性细胞数 > 50% 为强阳性。以细胞胞浆胞核染色强度高于背景非特异染色并 5% 以上为阳性,细胞不着色与背景一致为阴性。

3.5 Western blot 法检测肺组织 c-fos 表达水平 取 100 mg 肺组织,加入 1 mL Western 及 IP 细胞裂解液(加入 10 μL PMSF)裂解组织。4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心提取组织总蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度。取 100 μg 蛋白,上样到 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(浓缩胶:80 V,0.5 h;分离胶:100 V,2 h),目的蛋白近分离胶上中 2/3 时,终止电泳。将蛋白质转移至 PVDF 膜上(100 mA,2.5 h)。分别用兔来源 c-fos 第一抗体孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。孵育辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔第二抗体,室温 2 h。ECL 染色,胶片曝光,显影、定影。将 PVDF 膜加入适量 Western 一抗二抗去除液洗脱后,重新孵育小鼠来源 GAPDH 第一抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。孵育 HRP 标记的山羊抗小鼠第二抗体,ECL 染色,胶片曝光,显影、定影。

约在 62 kD 分子量位置上出现阳性条带,即为 c-fos 蛋白条带;约在 36 kD 分子量位置上出现阳性条带,即为 GAPDH 蛋白条带。胶片扫描后,使用 Image J



注:A 为空白组;B 为哮喘模型组;C 为空白针刺对照组;D 为哮喘模型针刺对照组;E 为哮喘模型针刺组;F 为哮喘模型假针刺组;G 为空白针刺组;图 2 同

图 1 各组大鼠肺组织中 c-fos 蛋白表达结果 (免疫组化染色, ×400)

图 1 各组大鼠肺组织中 c-fos 蛋白表达结果 (免疫组化染色, ×400)

软件处理条带 OD 值,以 c-fos/GAPDH(OD 值)的形式表示结果。

3.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件包进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经正态分布及方差齐性检验后,多组间比较采用单因素方差分析。两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠免疫组化法检测肺组织 c-fos 蛋白表达比较(图 1) c-fos 细胞核染色呈蓝色,阳性表达呈棕黄色颗粒样。由图可知,A、C、E、G 组表达呈阴性。在 B、D、F 组表达呈弱阳性。

2 各组大鼠 Western blot 法检测肺组织 c-fos 蛋白表达比较(表 1,图 2) 与 A 组比较,B 组升高;与 B 组比较,E 组下降,差异均有统计学意义(F 分别为 1.537, 1.852, $P < 0.01$);A、G、C 组 3 组间 OD 值比较,差异无统计学意义($F = 1.630$, $P > 0.05$);但 E 组 OD 值低于 D、F 组,差异均有统计学意义($F = 1.170$, $P < 0.05$; $F = 1.396$, $P < 0.01$)。

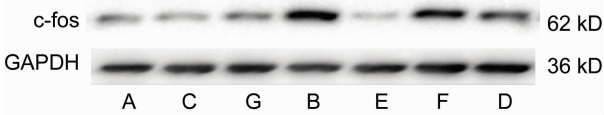


图 2 各组大鼠肺组织中 c-fos 蛋白表达电泳图 (Western blot)

讨 论

Wang Y 等^[5]运用蛋白组学对哮喘模型大鼠肺组

表 1 各组大鼠肺组织 c-fos/GAPDH 蛋白 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-fos/GAPDH(OD 值)
A	10	0.497 3 ± 0.136 3
B	10	2.034 8 ± 0.685 2 *
C	10	0.573 4 ± 0.084 8
D	10	1.352 6 ± 0.715 6 ▲
E	10	0.182 2 ± 0.038 3 △
F	10	1.578 5 ± 0.861 0 ▲▲
G	10	0.696 0 ± 0.233 0

注:与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,△ $P < 0.01$;与 E 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

织中差异表达的蛋白进行了筛选,并通过生物信息分析对筛选出的差异蛋白进行归纳,发现大部分差异蛋白均与炎症反应密切相关,针刺治疗后某些蛋白的表达差异消失或得到部分逆转。本次实验研究中选取了与炎症反应密切相关的信号分子 c-fos,观察其在哮喘模型大鼠肺组织中的蛋白表达变化以及针刺的干预作用。

Ras 蛋白是细胞内的一种小分子 GTP 结合蛋白,它作为信号开关分子调节细胞的生长和分化,在细胞增殖分化信号从激活的跨膜受体传递到下游蛋白激酶的过程中起重要作用^[6]。Ras 通过 Raf-1 激活 ERK 级联反应途径^[7],只有活化的 Ras 能通过效应酶来调控细胞的生长、分化、增殖等细胞应答^[8]。研究表明致敏豚鼠被激发哮喘后,短小时内气道 Ras mRNA 表达水平明显上调,哮喘豚鼠 Ras 蛋白表达量明显高于正常对照组,主要分布于气管、支气管上皮细胞和平滑肌细胞,以及少数炎症细胞内,推测 Ras 蛋白水平升高与哮喘的气道重塑有着密切联系^[9]。

c-fos 是对细胞的生长分化有重要意义的核内原癌基因,是刺激作用下最早的反应基因,其表达产物 fos 蛋白能与 c-Jun 的产物 Jun 形成二聚体而构成有活性的转录因子 AP-1,与许多基因上游调控区的 AP-1 位点结合后调节靶基因的表达,因而是一种重要的基因表达和蛋白合成的调节因子,通常将 fos 认为是第 3 信使,在胞内合成后又转位入核发挥调节作用。在支气管哮喘发病过程中所产生的各种化学介质及细胞因子均能诱导 c-fos 表达,而 c-fos 的表达又通过调节炎症反应,损害支气管上皮细胞参与哮喘发作。Domely P 等^[10]通过研究发现,经过糖皮质激素治疗的哮喘病例中均无 c-fos 表达,而非糖皮质激素治疗的病例中 c-fos 表达明显增高,并说明了 c-fos 在炎症反应中的调节作用。c-fos 与 c-jun 形成 AP-1,与 IL-2 基因的 AP-1 位点结合,增高 IL-2 基因表达,增加其分泌,IL-2 与其受体结合,促使免疫细胞特别是 T 淋巴细胞增殖和分化,从而调节炎症及反应。另一方面 IL-2 的增加,又可促使 c-fos 的表达增高。此外,Colotta F 等^[11]通过研究发现,当 c-fos 在自然杀伤细胞或大吞噬淋巴细胞中表达增高时,可促使该细胞淋巴因子分泌增加,细胞毒性和趋化性增强,从另一个方面证实了 c-fos 对炎症反应的调节。本实验显示,哮喘模型大鼠肺组织 c-fos 蛋白表达明显上调,表明 c-fos 参与了哮喘发病,针刺干预后 c-fos 蛋白几乎不表达,提示 c-fos 是针刺治疗哮喘的作用靶点之一。

综上所述,针刺可降低与炎症密切相关的信号分子的蛋白表达,提示减轻炎症反应是针刺治疗哮喘的重要机制之一。

参 考 文 献

[1] 杨晓溪,崔建美,喇哮瑾,等. 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[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 1004-1006.

- [2] Yin LM, Jiang GH, Wang Y, et al. Serial analysis of gene expression in a rat lung model of asthma [J]. *Respirology*, 2008, 13(7): 972-982.
- [3] 崔龙莘,杨永清,陈汉平,等. 针刺对过敏性哮喘大鼠的影响[J]. 上海针灸杂志, 1999, 18(3): 35-37.
- [4] 沈丹华,廖晓耘,刘艳丽,等. 胎盘部位结节的临床病理分析[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(5): 441-444.
- [5] Wang Y, Cui JM, Ma SL, et al. Proteomics analysis of component in serum with anti-asthma activity derived from rats treated by acupuncture [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2009, 7(1): 326-331.
- [6] Masuelli L, Cutler ML. Increased expression of the Ras suppressor Rsu-1 enhances Erk-2 activation and inhibits Jun kinase activation [J]. *Molec Cell Biol*, 1996, 16(10): 5466-5476.
- [7] Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, et al. Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(1): 1-9.
- [8] Asha H, Nagy I, Kovacs G, et al. Analysis of Ras-induced over-proliferation in Drosophila hemocytes [J]. *Genetics*, 2003, 163(1): 203-215.
- [9] Carlo P, Gabriele D, Antonietta R, et al. ERK-mediated regulation of leukotriene biosynthesis by androgens: a molecular basis for gender differences in inflammation and asthma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19881-19886.
- [10] Demoly P, Chanez P, Pujol JL, et al. Fos immunoreactivity assessment on human normal and pathological bronchial biopsies [J]. *Respir Med*, 1995, 89(5): 329-335.
- [11] Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, et al. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(26): 18278-18283.

(收稿:2015-03-25 修回:2016-05-12)